

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN
DE CADMIO ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE CACAO DESARROLLADO
EN LA CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB)**

Rosa Antonia Alzate de Oro

**Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Pamplona
2021**

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN
DE CADMIO ASOCIADOS A LA FERMENTACIÓN DE CACAO DESARROLLADO
EN LA CORPORACIÓN PARA INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB)**

Rosa Antonia Alzate de Oro

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de microbióloga

Líder del grupo

Sinar David Granada García, PhD

Tutor Científico

Johanna Hurtado Dávila

Tutor Académico

Ramón Ovidio García, PhD

**Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Pamplona**

2021

Dedicatoria

Todos estos años de esfuerzo van dedicados a mi familia. A mis padres, que son lo más grande que tengo, sé que para ellos culmina también una etapa pues hoy sus cuatro mujeres han logrado salir adelante, a mis hermanas, que son el motor y la luz de mi vida. Y Al amor que me ha quedado para siempre, WM.

Agradecimientos

A la Universidad de Pamplona, en especial al programa de Microbiología, por crear en mí un inmenso amor por la Ciencia y la Investigación. A los profesores del programa de Microbiología, en forma especial a los Profesores Ovidio García, Francisco Rincón y Lady Suarez, que con sus acertadas sugerencias hicieron posible la culminación exitosa de este trabajo de investigación.

Un agradecimiento a la Corporación para las Investigaciones Biológicas (CIB) por abrirme las puertas y depositar en mí la confianza suficiente para apoyarlos en este proyecto. Agradezco a Johanna Hurtado y Juan Diego Medina por brindarme sus conocimientos y contribuir a mi formación académica y personal.

Agradezco con todo el corazón a mis padres y mis hermanas, su infinito amor y apoyo fueron fundamentales para culminar exitosamente mi carrera.

Gracias a todos esos amigos que me dejó la Microbiología, amigos de verdad; gracias por creer en mis capacidades, por el apoyo y el ánimo para seguir adelante. Gracias a mi amiga Andreína por la amistad sincera y la compañía, ella más que nadie sabe todo lo que nos costó llegar hasta acá y lo grande que es este momento para nosotras.

Y a mi querido Walter, gracias por ver lo que yo muchas veces no veía en mí, gracias por alentarme a seguir cuando no creía ser capaz, pero sobre todo gracias por el amor incondicional.

Tabla de contenido

Lista de tablas	7
Lista de Figuras	7
INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBJETIVOS.....	3
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. MARCO REFERENCIAL	5
4.1. Historia del Cacao	5
4.2 Botánica y cultivo de cacao.....	6
4.3 Condiciones climáticas para el cultivo de cacao según ICCO	6
4.4 Técnicas de propagación de cacao (Infocafes, 2013).....	7
4.5 Enfermedades el cacao	8
4.6 Composición nutricional del fruto de cacao.....	10
4.7 Variedades del cacao	10
4.8 Proceso de fermentación de los granos de cacao	11
4.9 Cadmio en suelo y su relación con las plantas de cacao.....	13
4.10 Toxicidad del cadmio	13
4.11 Fuentes de acumulación del cadmio en el suelo (Meter A., 2019).....	14
4.12 Efectos del cadmio en la salud humana	14
4.13 Mecanismos de biosorción microbiana.....	15
4.14 Factores ambientales que influyen en la biosorción microbiana de cadmio	17
4.15 Estructura microbiana para la biosorción de cadmio.....	18
4.16 EPS y remoción de metales.....	19
4.17 Técnicas analíticas para la determinación de cadmio en alimentos	20

4.18 Producción de Cacao.....	21
5 MARCO LEGAL	22
5.1 Normativa del cadmio.....	22
6. METODOLOGÍA	24
6.1 Aislamiento de microorganismos tolerantes a cadmio a partir de muestras de grano de cacao durante el proceso de fermentación.....	24
6.2 Evaluación de la capacidad de biosorción de cadmio en medio acuoso de las levaduras y bacterias aisladas del proceso fermentativo del cacao	24
6.3 Identificación molecular	25
7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	27
8. RESULTADOS.....	28
8.1 Aislamiento de microorganismos tolerantes al cadmio del proceso fermentativo del cacao	
28	
8.2 Identificación molecular de las levaduras y bacterias aisladas	33
8.3 Evaluación de la capacidad de biosorción de cadmio en medio acuoso.....	35
9. DISCUSIÓN.....	37
10. CONCLUSIONES.....	39
11. RECOMENDACIONES.....	40
12. GLOSARIO	41
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

Lista de tablas

Tabla 1. Producción a nivel nacional de cacao en Colombia por diferentes departamentos en el año 2019.	21
Tabla 2. Contenido máximo permisible de cadmio en el chocolate reglamento (UE) N° 488/2014 de la comisión de 12 de mayo de 2014.	23
Tabla 3. Valores propuestos de niveles máximos para el Cadmio en chocolate y productos derivados del cacao de Colombia.	23
Tabla 5. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas levaduras aisladas de la fermentación del cacao.	29
Tabla 6. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de bacterias aisladas de la fermentación del cacao.	31
Tabla 7. Identificación de las levaduras asociadas a la fermentación del cacao a partir de análisis por BLAST de secuencias NL.	34
Tabla 8. Identificación de las bacterias asociadas a la fermentación del cacao a partir de análisis por BLAST de secuencias 16S.	35

Lista de Figuras

Figura 1. Moniliasis en el fruto de cacao.	8
Figura 2. Escoba de bruja en el fruto de cacao	9
Figura 3. Mazorca negra en el fruto de cacao	9
Figura 4. Mal de machete en el cacao	10
Figura 5. Principales variedades de cacao.....	11
Figura 6. Microorganismos involucrados en la fermentación del cacao.....	12
Figura 7. Mecanismos de biosorción de metales pesados por biomasa microbiana.	16
Figura 8. Pared celular de las bacterias Gram Negativas.....	18
Figura 9. Pared celular de las bacterias Gram Positivas	19
Figura 10. Pared celular de levaduras.	19
Figura 11. Producción mundial de cacao durante 2018-2019.....	22
Figura 12. Electroforesis gel de agarosa set de levaduras.....	33
Figura 13. Electroforesis gel de agarosa set de bacterias.....	34
Figura 14. Capacidad de remoción de Cd ²⁺ en medio acuoso por levaduras.	36
Figura 15. Capacidad de remoción de Cd ²⁺ en medio acuoso por bacterias.	36

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha visto una gran preocupación por la presencia de metales pesados en los alimentos y las consecuencias que generan al ser humano, la seguridad alimentaria y el rendimiento de los cultivos (Raju Maddela, 2020). El cadmio se encuentra de forma natural en el medio ambiente en su estado inorgánico y como resultado de emisiones volcánicas y meteorización de las rocas. También, las fuentes antropogénicas han incrementado los niveles de cadmio en el suelo, agua y organismos vivos. Esto da como resultado la absorción de cadmio por las plantas afectando de esta manera los alimentos. Organismos como las plantas, mariscos, crustáceos y hongos son acumuladores naturales de este metal pesado (Jan Alexander, 2009). La contaminación antropogénica de Cd generada por procesos industriales se da principalmente en galvanoplastia, minería, fabricación de baterías y plásticos, pigmentos para crear tintes, pinturas y cerámica de color amarillo brillante (sulfito de cadmio), naranja, rojo (selenito de cadmio) y marrón (Jianyou Long, 2021; Pérez García, 2012).

El Cadmio (Cd) es un metal traza altamente tóxico y no tiene ninguna función biológica en los seres humanos. Se acumula en el cuerpo y puede permanecer de 10 a 35 años (Ruth Vanderschueren, 2021). La exposición al Cd está dada principalmente por la dieta, causando diferentes enfermedades como disfunción renal, cálculos renales, alteración del metabolismo del calcio, daños endocrinos, reproductivos y respiratorios (David Romero, 2019). Según el Instituto Nacional del Cáncer, la exposición de personas no fumadoras a este elemento puede ocasionar la muerte por Cáncer de pulmón (INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER, 2015). El Cd al ser un metal traza no esencial, invasivo y tóxico, se acumula fácilmente en las partes comestibles de las plantas de cacao y genera serios problemas de salud en las personas que consumen los productos derivados de este fruto. Debido a los daños causados a la salud humana, el medio ambiente y a la calidad de los alimentos, existe una gran preocupación global siendo uno de los contaminantes prioritarios por varias organizaciones internacionales. Por lo que organizaciones como la UE, Agencia internacional sobre el Cáncer (IARC) y la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) catalogan al Cd como metal cancerígeno categoría 1B, grupo 1 y clase B, respectivamente (Raju Maddela, 2020).

La seguridad e inocuidad alimentaria son factores determinantes en la calidad y aceptación de un producto en el mercado, pruebas para la detección de residuos y sustancias nocivas, en este caso, presencia de metales pesados como cadmio y plomo son el interés principal (Recknagel, 2020). Según la opinión científica del panel sobre contaminantes de la cadena alimentaria (CONTAM) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre el Cd en los alimentos, los que más generan una alta exposición debido a su consumo por la mayoría de la población, son los cereales y sus derivados, hortalizas, frutos secos, legumbres, carne y productos cárnicos. Los alimentos que más cantidad de cadmio presentaron son los mariscos, peces y chocolate. La exposición a pequeñas cantidades de Cd es un problema grave en los niños. Los niños son los principales consumidores de chocolate y los productos del cacao son una fuente directa de Cd (Raju Maddela, 2020).

Teniendo en cuenta esta fuerte problemática, se han implementado diversas técnicas convencionales para el tratamiento de ambientes contaminados con metales pesados, como son filtración por membrana, osmosis inversa, nanofiltración, electrodiálisis, intercambio iónico,

adsorción usando carbón activado y precipitación química (Caviedes Rubio, 2015), esto sobre todo en el tema de aguas residuales. Sin embargo, estas técnicas son costosas, los métodos se ven afectados por las condiciones de procesamiento, por lo que se hace difícil aplicarlos a gran escala (Huang, 2020). Aquí es donde entran a participar los microorganismos, ellos juegan un importante papel en la biorremediación de ambientes contaminados, pues son capaces de remover los metales pesados en el ambiente, pues cuentan con una maquinaria enzimática y no enzimática muy poderosa (Beltrán-Pineda, 2016). Se está apostando por este tipo de técnicas, pues son sostenibles y conscientes del cuidado al medio ambiente. Se han estudiado los mecanismos de acción que tienen los microorganismos para la biosorción de metales pesados, se sabe que la pared celular es fundamental para llevar a cabo el proceso, siendo el intercambio iónico el principal y más estudiado mecanismo que usan los microorganismos para captar metales pesados (Sala, 2010). El Cadmio no solo es encontrado en el agua, está presente en los alimentos que consumimos, llegando a ellos por el suelo y por las fuentes hídricas. La presencia de metales pesados tales como mercurio, plomo, cadmio y níquel, en los alimentos constituye un serio problema de salud pública. A nivel mundial se han establecido y puesto en marcha normativas como: la Normativa del Codex Alimentarius para contaminantes de Alimentos y el Reglamento 488/2014 de UE, los cuales establecen los niveles de residuos máximos (NRM) para metales pesados en una serie de productos alimenticios con base a la ingesta semanal tolerable (CAF, 2020, pág. 5). *Theobroma cacao* es una industria con alta importancia a nivel mundial, en los últimos años, Colombia ha incrementado la producción de cultivos de cacao y la producción de chocolate de exportación de las variedades Criollo y Trinitario con cualidades de sabor y aroma especiales (Feria, 2021).

El cacao es un acumulador de Cadmio, por lo tanto, se acumula en el fruto que posteriormente se convertirá en chocolate. En este estudio, llevado a cabo por la CIB y en asociación con el SENA, se propone aislar microorganismos de los procesos fermentativos de granos de cacao provenientes de centrales de beneficio de este fruto en Cimitarra, Santander y Maceo, Antioquia; con el fin de determinar la capacidad de biosorción de Cadmio, pues se quiere proporcionar más información acerca de esta técnica y poder mejorar la calidad de los productos derivados del cacao, incrementando de esta manera la producción libre de metales pesados en Colombia y contribuyendo sobre todo, a la inocuidad alimentaria. Como microbióloga, este trabajo no solo me permitió ampliar mis conocimientos académicos, sino que además de eso, poder generar un gran impacto social en la comunidad cacaotera de la región dando a conocer la realidad actual sobre la contaminación ambiental, pues la mayoría de nuestros agricultores no tienen conocimiento acerca del Cadmio y lo que este compuesto puede causar a sus cultivos de cacao.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

- Identificar los microorganismos con capacidad de biosorción de Cadmio, asociados a la fermentación del cacao.

1.2. Objetivos específicos

- Aislar microorganismos tolerantes al cadmio del proceso fermentativo del cacao.
- Caracterizar a nivel molecular las bacterias y levaduras aisladas.
- Evaluar la capacidad de remoción de Cadmio (Cd) en medio acuoso de las bacterias y levaduras aisladas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La toxicidad y bioacumulación de metales pesados son algunas de las preocupaciones globales emergentes que afectan las diversas formas de vida, incluidas las plantas, los animales y los seres humanos. En la mayoría de los países desarrollados y en vía de desarrollo, las actividades, especialmente de industrialización, urbanización y métodos agrícolas han causado graves daño a la tierra y el medio ambiente. La naturaleza persistente y no biodegradable de los metales pesados en la cadena alimentaria, plantea un serio problema de salud pública (Ibha Suhani, 2021). El Cadmio es un metal pesado altamente tóxico que no tiene ninguna función biológica conocida en los seres humanos. Se acumula en el cuerpo y puede permanecer de 10 a 35 años. Las fuentes de Cadmio pueden ser naturales, por la meteorización de las rocas, por actividades volcánicas, incendios forestales. También, las fuentes antropogénicas contribuyen a la acumulación de este metal pesado en el suelo, como es la minería, fundición de metales, fabricación de pigmentos y plásticos. Las plantas de cacao (*Theobroma cacao L*) pueden absorber el Cadmio presente en el suelo a través de sus raíces y distribuirlo hasta acumularse en los frutos. Estudios demuestran que los cultivos de cacao latinoamericanos tienden a acumular mayores cantidades de cadmio, así como chocolates de origen especial.

Se han reportado efectos tóxicos como síntomas gastrointestinales agudos, síntomas respiratorios por la inhalación o la ingesta de cadmio. En Japón se registró el síndrome de Itai-Itai, que es una enfermedad ósea, generada por consumo de arroz contaminado con Cd (Jiménez, 2015). El cadmio puede causar severos problemas en el riñón como la insuficiencia renal, problemas respiratorios e incluso Cáncer. Según la UE, a partir del 1 de enero del 2019 empezó a regir el reglamento No. 488 /2014 que tiene como objetivo regular el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, en este caso, el Cadmio en el chocolate. En el caso de Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en el periodo comprendido entre el 2016-2017 implementó un programa de vigilancia y control de cadmio en productos derivados del cacao, como son: licor de cacao, chocolate de mesa, cocoa en polvo y chocolatina de leche; estableciendo los niveles máximos (INVIMA, 2016).

En Colombia, los principales departamentos productores de cacao son Santander, Antioquia y Arauca. En un boletín informativo elaborado por investigadores (UDES & FEDECACAO) reportaron concentraciones de cadmio en el suelo de Santander de 0,33 a 6,0 mg/kg de suelo. En el municipio de San Vicente de Chucurí, se reportó una concentración de cadmio en los granos de cacao de 7mg/kg de muestra. Son niveles que sobrepasan significativamente los límites permitidos por la normativa Internacional y Nacional. En Antioquia, se realizó un estudio por investigadores de AGROSAVIA mostrando resultados de la distribución de cadmio en la producción de cacao. En los granos de cacao el contenido de cadmio osciló entre 0,07 y 1,44 mg/kg. En los suelos se reportó cadmio entre 1,22 y 2,03 mg/kg (Gil, 2021).

Los microorganismos pueden ser una alternativa sostenible y amigable con el medio ambiente para disminuir los niveles de metales pesados de los granos de cacao, esto se conoce como biosorción. Actualmente, en Colombia se están llevando a cabo investigaciones en torno a la presencia del cadmio en el cacao en diferentes Universidades e instituciones del país. Como es el caso de la Universidad de Medellín, la Universidad EAFIT y la Institución Universitaria Pascual Bravo, investigan conjuntamente el desarrollo de materiales que se puedan aplicar al suelo para disminuir la cantidad de Cd en el suelo y evitar que la planta lo siga absorbiendo. AGROSAVIA, investiga sobre las concentraciones de Cd en diferentes regiones de Colombia (Santander, Antioquia,

Arauca, Boyacá) y las diferencias sobre la acumulación de este metal en diferentes variedades de cacao. Además, está desarrollando un subproducto a base de bacterias tolerantes al Cd para su aplicación en suelos (AGROSAVIA, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia de acceder a una agricultura orgánica y sana es un derecho del que todos debemos disfrutar, sentir la confianza de consumir nuestros alimentos con la seguridad que ninguna enfermedad nos van a transmitir. Actualmente, la agricultura convencional no puede proporcionarnos alimentos completamente sanos, pues los cultivos están expuestos a contaminantes ya sean de origen natural o antropogénicos. El cultivo de cacao está en la mira de muchas organizaciones, pues como se ha dicho anteriormente, se constituye una fuente directa de Cadmio a las personas que consumen regularmente el cacao en sus diferentes presentaciones, amenazando la seguridad alimentaria, la salud humana y las chocolaterías.

El cultivo de cacao en Colombia tiene un alto valor e importancia a nivel socio-económico. El grano colombiano es reconocido a nivel mundial como fino de sabor y aroma, características que solo posee el 5% de la producción mundial. Por esta razón, se ha generado la necesidad de lograr una producción de cacao eficiente y segura, mejorando la calidad del producto final y la inocuidad alimentaria para posicionarse en el mercado Nacional e Internacional. Para ello, se requieren granos libres de contaminantes como metales pesados, en este caso libres de Cd, pues esto atenta contra la salud y disminuye la oportunidad de que nuestros campesinos puedan exportar sus granos y que su duro trabajo sea mejor reconocido y remunerado.

Este proyecto plantea una alternativa biológica, como es la biosorción usando bacterias y levaduras aisladas directamente de granos de cacao fermentados. Los microorganismos tienen la capacidad de mitigar los niveles de Cd mediante diferentes mecanismos celulares, en los que la pared celular está involucrada directamente, pues es la que va interaccionar con los iones metálicos presentes en el medio atrapándolos en la superficie celular. Es una técnica que debe ser más estudiada a fondo en este trabajo. Por ahora, se aislarán y seleccionarán los microorganismos con las mejores capacidades para crecer en medios con Cd y serán adicionados a granos de cacao que posteriormente pasarán por el proceso de fermentación, con el fin de evaluar la remoción de los iones metálicos en los granos.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Historia del Cacao

La palabra cacao proviene del maya “Kaj”, que significa amargo y “kab” que quiere decir jugo. Estas dos palabras, al pasar fonéticamente por el castellano, sufrieron una serie de cambios que terminaron en “cacaotal”, que luego pasó a ser cacao (Enríquez G. , 1983). El nombre científico del cacao se incluye en la familia *Sterculiáceas*, pertenece al género *Theobroma*, y a la especie *cacao*. Por sus características genéticas, el cacao se ha clasificado en dos tipos: el criollo y el

forastero. Se han clasificado a su vez como criollos los cacaos de buen sabor y los forasteros de mal sabor. Entre los tipos de cacao criollo y forastero, se sitúa el trinitario, que es el más se cultiva en América y es el resultado de una mezcla de los dos anteriores (Enríquez G. A., 1985).

Los aztecas creían que el árbol del cacao era de origen divino y que su bebida proporcionaba sabiduría. Es por eso que Linneo asignó a la especie el nombre de *Theobroma*, que significa alimento de los dioses (Batista, 2009).

El cacao se originó hace muchos años en América del Sur, al este de los Andes. *Theobroma* se divide en 22 especies de las cuales *T. cacao* es la más conocida. Evidencias arqueológicas encontradas al sur de Ecuador indican que el cacao en grano ya era utilizado hace más de 5.300 años por la población nativa. Desde ese entonces, las semillas de *T. cacao* había sido utilizado por varias civilizaciones precolombinas incluyendo los mayas (México, Guatemala y Honduras), los incas (abarcando Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia) y los aztecas (incluyendo el actual sur de México). Los granos del cacao fueron utilizados para preparar bebidas y también como moneda para el comercio. El primero en beber chocolate fue Cristóbal Colón, que llegó a Nicaragua en 1502 en busca de una ruta marítima. Aunque fue Hernán Cortés, el líder de la expedición en 1519 al imperio azteca, quien regresó a España en 1528 llevando la receta del *xocolatl* (bebida de chocolate). La bebida fue bien recibida y cuando se le agregó azúcar se terminó de convertir en una popular bebida en las cortes españolas y posteriormente en las europeas. Con el fin de satisfacer la creciente demanda europea, el cultivo de cacao se fue extendiendo durante el periodo de colonización a las principales zonas productoras de cacao: Asia, África y América latina y el Caribe (ICCO, 2021).

4.2 Botánica y cultivo de cacao

El árbol *Theobroma cacao L.* es una especie originaria de Centro y Sudamérica, específicamente de la cuenca del Amazonas. Es una planta amante de la sombra y puede alcanzar entre 4 y 10 m de altura. *Theobroma cacao L.* comienza la formación de los frutos a los 3 años y alcanza su máximo rendimiento y productividad después de 8-9 años. El fruto se desarrolla en el tronco y en las ramas del árbol de cacao. El cacao es parecido a una baya y alcanza una longitud de 15 a 25 cm y un diámetro de 8 a 13 cm. Al madurar, la vaina contiene entre 20 y 40 almendras, recubiertas por una pulpa mucilaginosa. Las almendras y la pulpa se extraen del fruto y se utilizan como la principal materia prima para la producción de chocolate (Vásquez Z. C., 2019)

4.3 Condiciones climáticas para el cultivo de cacao según ICCO

Los factores climáticos son puntos clave para el desarrollo del cacao. La temperatura, la lluvia, la luz solar y el viento. El cacao es una planta que se desarrolla bajo sombra. La humedad relativa es importante también porque puede contribuir a la propagación de algunas enfermedades. Es por estas exigencias climáticas que el cultivo de cacao se concentra en las tierras bajas tropicales (Vilchez. C, 2021). Para lograr estas estrictas condiciones edafoclimáticas, las plantaciones de cacao generalmente se encuentran entre los 20°N y 20°S del Ecuador (Vásquez Z. C., 2019, pág. 73).

4.3.1 Hábitat: El hábitat natural del cacao es al interior de bosques lluviosos subtropicales sudamericanos. El hábitat comprende zonas secas a húmedas. El cacao se cultiva normalmente a elevaciones bajo los 300 msnm, y en ambientes boscosos abrigados de Colombia puede alcanzar los 900 msnm.

4.3.2 Temperatura: El cacao no soporta temperaturas muy bajas, siendo su límite los 21°C. A temperaturas altas responde bien, en promedio a 30 – 32°C. Es un cultivo que debe estar bajo sombra para que los rayos solares no incidan directamente y haya un aumento de la temperatura. La temperatura determina la floración.

4.3.4 Humedad: En los países productores la humedad relativa es alta, llegando al 100% durante el día y desciende a 70-80% durante la noche.

4.3.5 Lluvias: El cacao es una planta sensible a la escasez del agua, pero también al encharcamiento, es por esto que el cultivo debe contar con un buen drenaje del agua. Las precipitaciones deben ser abundantes y bien distribuidas a lo largo del año. Se prefiere un nivel de lluvia anual entre 1.55 mm y 2.000 mm. Los periodos secos no deben exceder los tres meses.

4.3.6 Luz y sombra: El árbol de cacao tendrá un óptimo crecimiento si se cultiva a la sombra. Su entorno natural es la selva amazónica. El sombreado es indispensable en los primeros años de cultivo de un árbol de cacao.

4.3.7 Suelos: El suelo debe contar con buenas cantidades de nutrientes, a una profundidad de 1,5 para permitir el desarrollo de un buen sistema radicular. Los suelos deben ser profundos, francos arcillosos y deben contar con buena capacidad de retención y drenaje de agua. El cacao puede crecer en suelos con pH entre 5.0 a 7.5 y se debe evitar una acidez o alcalinidad excesiva. El suelo debe tener una buena cantidad de materia orgánica: 3,5% en los 15 cm superiores del suelo.

4.4 Técnicas de propagación de cacao (Infocafes, 2013)

4.4.1 Reproducción sexual: Es la forma más fácil de reproducir el cacao. Se debe seleccionar la semilla de los mejores árboles, a estos se les llama arboles madres o árboles productores de semillas porque presentan mejores características en cuanto a vigor y forma de desarrollo, la producción y la resistencia a plagas y enfermedades. La semilla de cacao se produce a partir de la polinización natural de las flores de cacao. La flor es hermafrodita, lo que quiere decir que la misma flor tiene el polen y el pistilo. El polen es el que fecunda al ovario que está dentro del pistilo. El órgano masculino está formado por estambres los cuales portan el polen. El órgano femenino es el pistilo, formado por el estigma, el estilo y el ovario. La función de estas flores es la reproducción. El grano de polen cae sobre el estigma y baja por el estilo hasta el ovario. A esto se le llama fecundación y empieza la formación del fruto. En las mazorcas maduras se encuentran las semillas listas para germinar. A partir de estas se generan nuevas plantas con características variadas por lo que hace que el cultivo de cacao sea diverso.

4.4.2 Reproducción asexual: Es un método de reproducción del cacao que utiliza tejidos vegetativos de las plantas elite, que pueden ser yemas, ramas o estacas. A partir de estos tejidos se forma la nueva planta de cacao. El método que más se utiliza es el injerto. El injerto es un método donde se aprovechan las cualidades de la planta seleccionada por su alta capacidad productiva y

calidad, para que se pueda desarrollar sobre otra planta llamada base o patrón. Con este método se evitan las grandes variaciones a nivel de cultivo a diferencia de la propagación con semillas. Las yemas son pequeños brotes que surgen en la base de las hojas y tienen la capacidad de reproducir las características de la planta de donde procede.

4.5 Enfermedades del cacao

El cacao se ve afectado por una variedad de plagas y enfermedades, siendo un problema creciente en el mundo. Se estiman pérdidas entre el 30% y 40% en la producción global. La productividad también se ha visto afectada a causa de la fertilidad del suelo, aumento de enfermedades a raíz de las condiciones climáticas que son cada vez más duras (Antolinez, 2020). Las principales enfermedades que atacan el cultivo de cacao son la moniliasis, escoba de bruja, mazorca negra y mal de machete.

4.5.1 Moniliasis: También conocida como pudrición de la vaina helada, monilia, mancha helada, nieve o pasmo, es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (figura 1), siendo la principal enfermedad que afecta los cultivos de cacao en Colombia y otros países de América central y Suramérica. En Colombia puede generar pérdidas de hasta un 40% en la producción nacional (Antolinez, 2020, pág. 8). El hongo infecta solamente los tejidos de las vainas en crecimiento. El tiempo que transcurre entre la infección y la aparición de los primeros síntomas es de aproximadamente 1 a 3 meses. El síntoma más destacado es la aparición de una capa blanca del hongo en la superficie de la mazorca.

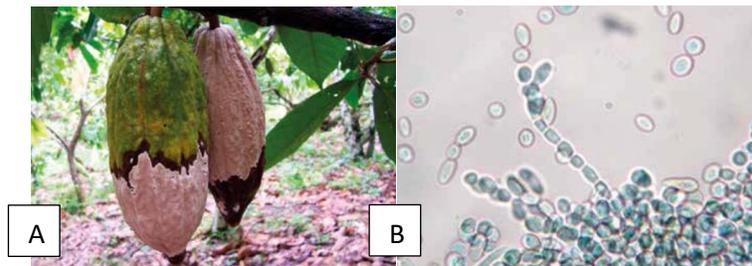


Figura 1. Moniliasis en el fruto de cacao.

Nota: (A) Frutos de cacao esporulados por el hongo y (B) morfología microscópica de las colonias de *Moniliophthora roreri*. Fuente: (Compañía Nacional de Chocolates S.A.S, 2019) (Lozada, 2012)

4.5.2 Escoba de bruja: Es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa*, ataca solo el tejido en crecimiento como brotes, flores y vainas (Figura 2). Los principales síntomas son las escobas en las ramas de la planta, constituyendo la mayor fuente de propagación de la enfermedad. Cuando los cojines florales son infectados, no nacen mazorcas sino brotes vegetativos a manera de ramas con apariencia de escoba. Los frutos pueden tomar forma de chirimoyas, fresas o zanahorias. Las escobas producen estructuras reproductivas, en forma de paraguas y producen millones de esporas (ICA, 2012, págs. 8-9).

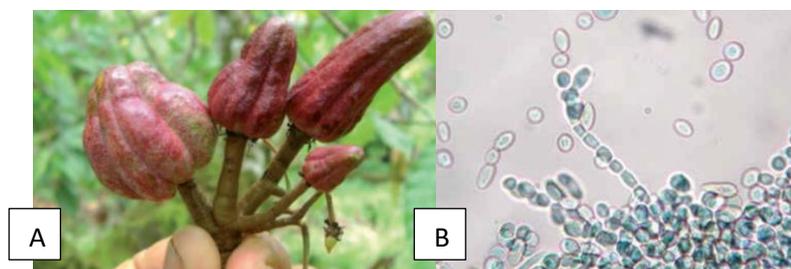


Figura 2. Escoba de bruja en el fruto de cacao

Nota: (A) Brotes vegetativos con apariencia de escoba y (B) morfología microscópica de las colonias de *Moniliophthora perniciosa*. Fuente: (ICA, 2012) (Lozada, 2012)

4.5.3 Mazorca negra o fitoptora: Es una enfermedad causada por el hongo *Phytophthora sp.* Ataca las raíces, hojas, tallos, frutos y ramas del cacao. Se han reportado siete especies patógenas en cacao: *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* var. *Parasitica*, *P. megasperma* y *P. arecae*. Los síntomas varían según el lugar de la planta. Las plántulas de vivero son afectadas principalmente por *Phytophthora palmivora*, secando las hojas y el tallo. En los frutos inicia en la cáscara de la mazorca con una mancha descolorida; sobre ella desarrolla una coloración negra (Figura 3), a diferencia de la monilia, las manchas presentan unos límites bien definidos. Los granos de las mazorcas enfermas permanecen sin daño por varios días. El patógeno aparece sobre la superficie de la mazorca como una pelusa blanca. La mazorca se ennegrece y marchita. En la raíz se presenta un necrosamiento de color marrón. Cuando invade todo el perímetro radical, el resto de la raíz se seca, causando la muerte del árbol. En los tallos también se presenta necrosis y puede causar la muerte total del árbol (ICA, 2012, págs. 10-11).

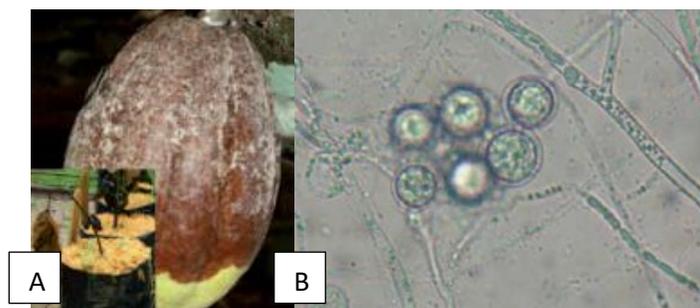


Figura 3. Mazorca negra en el fruto de cacao

Nota: (A) Manchas en el fruto y (B) morfología microscópica de las colonias de *Phytophthora sp.* Fuente: (ICA, 2012) (Torres, 2008)

4.5.4 El mal de machete: Es una enfermedad causada por el hongo *Ceracystis fimbriata*. El hongo afecta la planta de cacao en el tronco y las ramas principales. Los primeros síntomas son marchitez y amarillamiento de las hojas, estas quedan adheridas a las ramas, aun después de muerto el árbol. En un lapso de 15-30 días, la copa del árbol se seca y muere. El hongo invade por lesiones o heridas en la planta causadas por herramientas infectadas por el insecto del género *Xileborus*, perforador del tronco. Figura 4 (OIRSA, 2016).

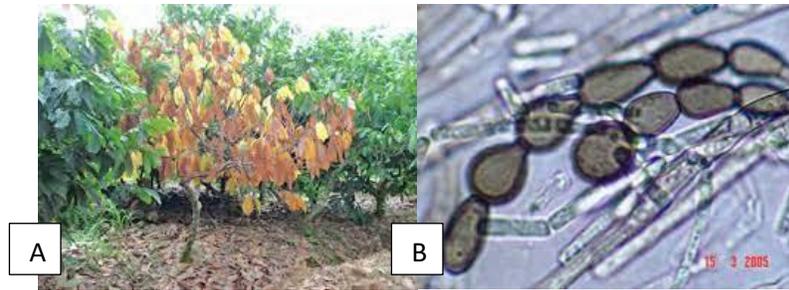


Figura 4. Mal de machete en el cacao

Nota: (A) Marchitez y amarillamiento de las hojas y (B) morfología microscópica de las colonias de *Ceracystis fimbriata*. Fuente: (ICA, 2012)

4.6 Composición nutricional del fruto de cacao

El cacao es un producto básico importante en el mundo y constituye el ingrediente principal en la elaboración del chocolate. Cada variedad es la que aporta al frijol las características sensoriales específicas relacionadas con el origen, condiciones ambientales y la fermentación, por lo tanto, se han identificado muchos compuestos volátiles como alcoholes, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, ésteres y pizarinas como componentes olorosos en el cacao. Las semillas se pueden tostar y moler para producir el licor de cacao, una fuente de compuestos bioactivos como los polifenoles, principalmente flavonoides (flavanoles, procianidinas y antocianinas) y metilxantinas (cafeína y teobromina) (Cinar. Z, 2021).

Los granos de cacao están compuestos por un embrión, dos cotiledones y la pulpa mucilaginosa que rodea las semillas. La pulpa del cacao está compuesta por azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa), ácido cítrico y pectina que funcionan como sustratos para los microorganismos involucrados durante la fermentación (Domínguez, 2020). Desde el punto de vista nutricional, los granos de cacao están compuestos principalmente por agua 32-39%, grasas totales (30-32%), de las cuales 65% son grasas saturadas, proteínas (8-10%), celulosa (2-10%), almidón (4-6%), sacarosa (2-3%), polifenoles (5-6%), ácidos orgánicos, principalmente cítrico, oxálico y málico (1%), teobromina (1-3%) y cafeína (0,2-0,1%) (Figueroa, 2019).

4.7 Variedades del cacao

Existen tres variedades de cacao cultivadas en todo el mundo, existen otros cultivares que se han obtenido por la manipulación genética o cruzamiento de estas variedades. Las principales son (Mudiaga, 2021):

4.7.1 Criollo

La variedad de cacao criollo se cultiva principalmente en América del Sur (América Latina). Las mazorcas en su mayoría son rojas, blancas, verdes o amarillas con piel áspera o verrugosa y puntas puntiagudas. Los granos son de color violeta claro a blanco, y tienen el mejor sabor entre todas las variedades de cacao existentes. Las variedades criollo poseen los frijoles más finos y con mejor

sabor, por lo que tienen un precio muy alto en el mercado global, pero su producción es mínima debido al bajo nivel de resistencia a enfermedades y plagas.

4.7.2 Forastero:

Se cultiva generalmente en África, en países como Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Camerún, Santo Tomé y Príncipe. Representa la mayor población de granos de cacao en circulación en todo el mundo (70-75% de la producción mundial). El color de la vaina varía de rojo a amarillo. Este árbol es mucho más resistente, duradero y un poco resistente a las enfermedades en comparación con otras variedades y produce frijoles con mal sabor, astringentes y de baja calidad. Las vainas lisas de piel gruesa producen frijoles planos de color violeta.

4.7.3 Trinitario:

Esta variedad es un cruce involuntario entre la variedad de cacao criollo y el forastero que tuvo lugar en Trinidad y Tobago aproximadamente en 1730. Debido a su fino sabor, se utiliza principalmente como sustituto de la variedad Criollo en la elaboración de chocolates. Las vainas son suaves, en su mayoría rojas, blancas, verdes o amarillas con piel áspera.



Figura 5. Principales variedades de cacao

Fuente: Antolinez, 2020.

4.8 Proceso de fermentación de los granos de cacao

Las mazorcas deben cosecharse cuando están maduras, no se deben dejar sobre madurar o cosechar cuando están verdes porque el mucílago no se ha terminado de formar y no se fermentarán. Se deben separar las mazorcas sanas de las enfermas, para que no interfieran en el proceso de fermentación y por ende en la calidad del producto. Las mazorcas generalmente se parten con un machete. Los granos se extraen con los dedos dejando la placenta pegada a la mazorca y se eliminan

los residuos de hojas o corteza. Se recomienda realizar el desgrane sobre un plástico para que los granos no entren en contacto con tierra o mugre (Cubillos, 2008, págs. 14-16)

La fermentación es el proceso que sigue después del desgrane. En este paso se amontonan los granos durante varios días con el fin de que los microorganismos degraden el mucílago, aumente la temperatura y se produzca la muerte del embrión y se dé inicio a los cambios bioquímicos y reacciones enzimáticas en el interior de las almendras, que serán los responsables de la formación de compuestos precursores del sabor a chocolate. El tiempo de fermentación puede ir de 2 a 6-7 días aproximadamente. Es importante mezclar o voltear la masa de granos durante el proceso con el propósito de facilitar aireación, romper los granos adheridos, prevenir la formación de mohos y hacer más uniforme el proceso. El primer volteo se hace a las 48 horas y después cada 24 horas hasta terminar el proceso. El sistema más práctico para realizar la fermentación son los cajones de madera resistentes a la humedad y que no desprendan olores fuertes. Los cajones llevan perforaciones para facilitar la salida de los exudados. Una señal de que el proceso de fermentación está en marcha es el aspecto de los granos que muestran una coloración púrpura. La fermentación termina cuando el cacao ha escurrido, los granos se hinchan y toman color pardo rojizo o canela (Cubillos, 2008, págs. 18-20).

La fermentación es un proceso complejo en el que participan microorganismos autóctonos que se originan a partir de procesos postcosecha (cuchillos, hojas de plátano), superficies de las vainas, manos de los trabajadores y de la superficie del recipiente donde se realiza el proceso de fermentación. En la figura 2 se puede observar las fases del proceso de fermentación, los microorganismos involucrados, las condiciones ambientales que se generan y los productos generados por las reacciones enzimáticas.

Fase de levadura	Fase LAB	Fase AAB	Fase de bacterias formadoras de esporas
<ul style="list-style-type: none"> • Fase anaeróbica: 0-24h • Rango de temperatura: 25°C - 45°C • Generos principales: <i>Hanseniaspora</i>, <i>Saccharomyces</i> y <i>Pichia</i> • Principales actividades: Metabolismo de azúcar en alcohol, producción de precursores aromáticos, degradación de la pulpa de cacao por enzimas pectinolíticas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fase anaeróbica o microaerofílica: 24-48h • Rango de temperatura: 25-45°C • Principales generos: <i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i> • Principales actividades: Metabolismo de los carbohidratos disponibles y ácido cítrico produciendo ácido láctico, reducción de fructosa a manitol, acidificación de tejidos de las semillas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fase aeróbica: 48 h hasta el final de la fermentación • Rango de temperatura: 42-52°C • Principales generos: <i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i> • Principales actividades: Oxidación del alcohol para producir ácido acético, acidificación del tejido de la semilla por el efecto del calor. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fase aeróbica: 120 h hasta el final de la fermentación. • Rango de temperatura: 42-52°C • Principales géneros: <i>Bacillus</i> y <i>Paenibacillus</i> • Principales actividades: Producción de tetrametilpirazina y otras pirazinas, componentes del aroma del cacao.

Figura 6. Microorganismos involucrados en la fermentación del cacao

Fuente: Figueroa 2019

Nota: Condiciones físicas y características bioquímicas del crecimiento microbiano de levaduras, bacterias del ácido láctico (LAB), bacterias del ácido acético (AAB) y los géneros *Bacillaceae* durante la fermentación del grano de cacao.

4.9 Cadmio en suelo y su relación con las plantas de cacao

El cadmio puede llegar al suelo de forma natural por erupciones volcánicas, incendios forestales, meteorización, erosión y sedimentos de los ríos, o por procesos antropogénicos, estos últimos son la fuente que mayor cadmio proporciona al suelo, como actividades mineras e industriales, prácticas agrícolas de riego y fertilización.

Las concentraciones de cadmio en los cultivos también dependen de la disponibilidad del cadmio que hay en el suelo, el aumento de la acidez del suelo, la disminución de la materia orgánica del suelo y en algunos casos la deficiencia de zinc. El zinc y el cadmio se consideran análogos, por lo que se ha sugerido que el bajo contenido de Zn disponible en el suelo desencadena la absorción de Cd en la planta. Se han realizado estudios donde se comprueba que la absorción de Cd en el cacao de las capas más profundas del suelo fue mejorada por el encalado superficial y relacionaron esto con una mayor actividad de las raíces más profundas para hacer frente a la deficiencia de micronutrientes en la capa superior del suelo (es decir, Zn) causada por el encalado de la superficie (Vanderschueren., 2021).

4.10 Toxicidad del cadmio

Las plantas de cacao expuestas a suelos contaminados con cadmio, presentan modificaciones en la apertura estomática, fotosíntesis y transpiración. El cadmio al ser absorbido por las plantas causa deficiencia de nutrientes, altera el metabolismo, generalmente en las enzimas del ciclo de Krebs y la fotosíntesis, lo que se relaciona con la aparición de clorosis por la deficiencia de hierro, necrosis y enrojecimiento de las venas, además altera la fisiología de la planta relacionada con la absorción de Fe, Zn, Mn, Cu, P, K, Ca, Mg y S (Chica, 2020). El tratamiento con cadmio produce reducción de la actividad ATPasa y alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática y en la actividad de las enzimas implicadas en la fijación de CO₂. La toxicidad de metales pesados se debe en mayor parte al estrés oxidativo por las especies de oxígeno reactivo (ROS). Los cationes metálicos como el Cd²⁺ y Pb²⁺ no experimentan cambios redox por lo que no actúan directamente en la generación de ROS. Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del contenido de GSH, necesario para la síntesis de fitoquelatinas (PCs), disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante (Rodríguez-Serrano, 2008).

4.11 Fuentes de acumulación del cadmio en el suelo (Meter A., 2019)

4.11.1 Fuentes naturales

En los suelos naturales, es decir, no contaminados con cadmio, la concentración de este metal pesado está determinada por la cantidad de cadmio en la roca madre y por las condiciones de meteorización, así como el transporte en los sedimentos y el agua de los ríos. Dependiendo los tipos de suelos, la concentración de cadmio puede variar. Los suelos derivados de rocas ígneas contienen bajas cantidades de cadmio, los derivados de rocas metamórficas son intermedios y los suelos derivados de rocas sedimentarias (lutitas) contienen altas cantidades.

4.11.2 Fuentes antropogénicas de cadmio

4.11.2.1 Prácticas agrícolas

Los materiales aplicados directamente al suelo son una fuente importante de cadmio, como lodos de aguas residuales, el compost, estiércol animal y fertilizantes de fosfato.

Los fertilizantes de fosfato son claves en el proceso de contaminación con cadmio en los suelos, ya que estos fertilizantes se producen a base de las rocas de fosfato las cuales contienen altas concentraciones de cadmio. La cantidad de cadmio que se acumula al suelo por medio de estos fertilizantes depende del plan que se sigue en el cultivo y de los antecedentes de la tierra en cultivos anteriores.

4.11.2.2. Agua de riego

Los ríos y los arroyos que recorren áreas con altos niveles de cadmio pueden suministrar metales pesados a las zonas agrícolas mediante aguas superficiales y subterráneas o a través de sistemas de riego. La meteorización de las rocas proporciona cadmio y estas concentraciones aumentan por las operaciones de minería.

4.11.2.3 Contaminación atmosférica

Las emisiones de cadmio a la atmósfera llegan por procesos industriales como la minería y la fundición de zinc, la producción de hierro y acero, el petróleo y gas, la quema de desechos y la producción de cemento.

4.12 Efectos del cadmio en la salud humana

La exposición continua a metales pesados constituye un riesgo considerable en la salud. Las manifestaciones clínicas de la exposición al cadmio pueden clasificarse de acuerdo con el tiempo y la dosis de exposición, en agudas, crónicas y si son por inhalación o ingestión. La inhalación de altas cantidades de cadmio puede producir fiebre, alteraciones digestivas, dolor torácico, disnea y edema agudo de pulmón, el cual puede ocasionar la muerte por insuficiencia respiratoria. También se puede producir irritación en la piel, en los ojos y en las mucosas. Las manifestaciones clínicas

que se presentan por ingestión son náuseas, vómitos, dolores abdominales, diarrea intensa con colapso. Cuando la exposición es prolongada aparece el síndrome que incluye enfisema pulmonar y enfermedad de los túbulos renales con proteinuria. Además, existen riesgos potenciales que pueden ocurrir años después de la exposición al cadmio y es el cáncer y daños en la salud reproductiva (Pérez-García, 2012)

El cadmio tiene efectos bien establecidos en los riñones, los huesos y los pulmones; se tiene evidencia de sus efectos neurotóxicos, teratogénicos o alteradores del sistema endocrino. El cadmio se almacena en los riñones y el hígado, la excreción es lenta, con una media de vida de hasta décadas en el cuerpo humano; se acumula en los tejidos durante el envejecimiento. La población que tiene mayor riesgo de contraer estos daños por la exposición al cadmio son aquellas con deficiencias nutricionales, con bajas concentraciones de hierro o trastornos renales, los fetos y los niños con bajas reservas corporales de hierro (Pérez García, 2012)

4.13 Mecanismos de biosorción microbiana

El mecanismo de biosorción es un proceso complejo que usa biosorbentes para la unión de sorbatos. La biomasa microbiana como bacterias, hongos, levaduras, algas, son muy utilizados como biosorbentes. La biosorción puede eliminar contaminantes que se encuentren en bajas concentraciones. Las bacterias se adaptan a varias formas para absorber metales y el proceso depende o no del metabolismo celular. Según la ubicación de la absorción o acumulación de metales, la biosorción se clasifica como precipitación extracelular, sorción en la superficie celular y acumulación intracelular. En la biosorción dependiente del metabolismo, la acumulación intracelular de metales se produce a través de la membrana celular, llevada a cabo únicamente por células viables. La captación de metales en la biosorción independiente del metabolismo se produce por interacción físico-química entre los grupos funcionales de la superficie de las bacterias y los iones metálicos. La unión de iones metálicos a la superficie de una bacteria en la biosorción independiente del metabolismo se realiza por mecanismos como interacción electrostática o de van der Waals o interacción química por desplazamiento de cationes metálicos unidos por intercambio iónico, complejación, difusión, superficie por adsorción o precipitación. *Figura 3* (Das., 2021).

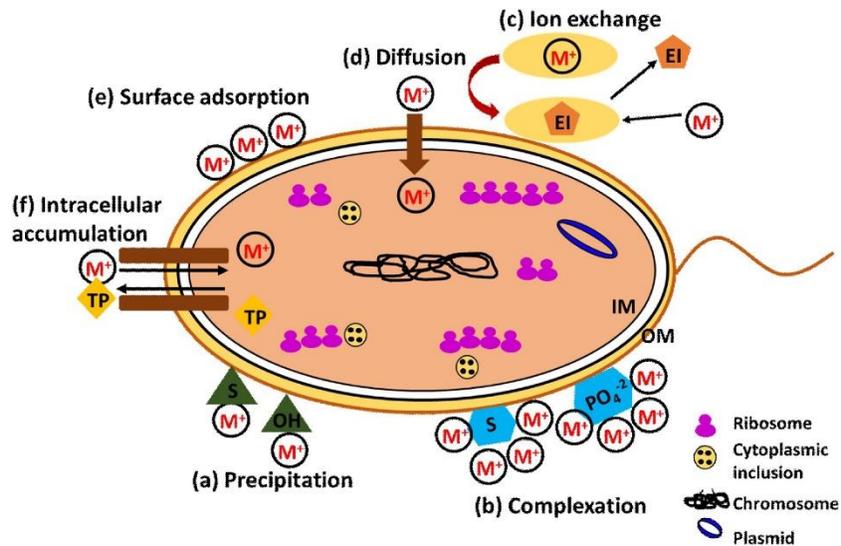


Figura 7. Mecanismos de biosorción de metales pesados por biomasa microbiana.

Nota: Mecanismos implicados en la biosorción de metales pesados por biomasa microbiana. (a) La precipitación implica la interacción química entre la superficie celular y las especies metálicas, (b) la complejación de los metales pesados se produce por la interacción de los iones metálicos con los grupos tensioactivos de la biomasa bacteriana, (c) El intercambio de iones metálicos bivalentes se produce con iones contrarios presentes en la célula bacteriana, (d) La difusión es el proceso simple de biosorción sin la participación de ningún paso que limite la velocidad, (e) La adsorción superficial es un proceso rápido y reversible en el que los cationes metálicos se unen a los aniones de la superficie bacteriana a través de fuerzas de atracción inespecíficas, y (f) la acumulación intracelular de metales pesados tiene lugar por el transporte de iones metálicos a través de la membrana celular. SOY- Membrana interna, OM- Membrana externa, EI, iones intercambiables, TP- Proteínas de transporte. Fuente: Das, 2021.

La complejación es asociar dos o más especies, es decir, iones metálicos con los grupos funcionales de la superficie celular bacteriana, mediante enlaces covalentes. En el mecanismo de intercambio iónico, el intercambio de cationes metálicos binarios se produce con el ion contrario que reside en la superficie del biosorbente. El mecanismo de precipitación se produce por la reacción de iones metálicos con los grupos funcionales presentes en la superficie celular bacteriana, generando precipitados metálicos orgánicos insolubles que permanecen unidos a las células microbianas. La adsorción física de metales en la superficie celular se lleva a cabo mediante fuerzas de Van der Waals entre la biomasa y los iones metálicos. El proceso de transporte de metales pesados a través de la membrana celular por microorganismos se puede dar de dos formas. Una independiente del metabolismo, que implica la unión de metales pesados a la superficie celular. Otra es la internalización de los iones metálicos a través de la membrana. Es un mecanismo similar a la captación por las células de algunos iones esenciales como Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+} . Por lo tanto, los canales iónicos pueden confundirse con los cationes metálicos que tienen una carga idéntica asociada con los iones esenciales. Hay muchos factores que influyen en el mecanismo de biosorción: las propiedades de los biosorbentes, las características de los metales pesados, el tipo de sitios de unión

a estos metales y parámetros como temperatura, pH, tiempo de contacto, cantidad de sorbente y sorbato (Das., 2021, pág. 3).

4.14 Factores ambientales que influyen en la biosorción microbiana de cadmio

4.14.1 pH

El pH de la solución juega un papel importante en la biosorción de metales pesados. La biomasa microbiana contiene grupos funcionales ácidos y básicos débiles que permiten la unión y solubilidad de los iones metálicos (Priyadarshane, 2021). El género *Bacillus sp* es ampliamente usado como biosorbente de metales pesados, al igual que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (Kim, 2015) Se encontró que *Bacillus subtilis* posee grupos funcionales carboxilo, fosfato, hidroxilo y amino en la pared celular. *B. subtilis* es una bacteria aeróbica grampositiva cuya superficie no está cargada por debajo de un pH de 2,2, pero se vuelve cada vez más cargada negativamente a valores de pH altos. Esto explica porque el pH es un factor determinante en el proceso de remoción de metales pesados por biomasa microbiana. En un estudio realizado sobre biosorción de Cd^{2+} de una cepa de *Pseudomonas* (Xu, 2020), indicaron que el pH de las soluciones acuosas afecta la carga superficial y la actividad de los grupos funcionales del biosorbente e influye en la solubilidad del metal. Ellos reportaron que a un pH de 7 se optimizó el proceso, mientras que a pH de 4 a 6 la biosorción por parte de la cepa no aumentó. Esto pudo haber ocurrido porque los iones hidrogeno y los iones de Cd^{2+} compiten por los sitios de unión en soluciones acuosas a pH bajo.

4.14.2 Temperatura

La temperatura es un factor que puede afectar directamente la funcionalidad de los biosorbentes microbianos. Generalmente, la biosorción aumenta cuando se aumenta la temperatura debido al aumento de la energía cinética y la actividad superficial del soluto. Pero cuando la temperatura está por encima de la óptima para el crecimiento, se pueden destruir los sitios de unión disponibles para la unión de iones metálicos y la distribución de los grupos funcionales también se verá afectada. Por lo tanto, la temperatura debe elegirse de acuerdo a cada microorganismo. (Yuan, 2019) (Priyadarshane, 2021).

4.14.3 Concentración de cadmio y de biosorbente

La concentración de metales pesados a la que se exponen los microorganismos, también influye en la eficacia del proceso. (Yuan, 2019) Las altas concentraciones iniciales de Cd^{2+} pueden proporcionar una fuerza que impulsa a los iones metálicos a interactuar con los sitios de unión de metales y provocar la adsorción por la biomasa microbiana. Sin embargo, estas altas concentraciones pueden provocar una saturación en el biosorbente limitando los sitios de unión. Es por esto que se hace necesario encontrar una concentración adecuada para cada metal, ya que el número de grupos funcionales con los que interacción en la superficie celular es finito (Moreno, 2018, págs. 57-58)

Otro parámetro importante es la dosis del biosorbente. En muchos casos, las dosis más bajas producen una mayor absorción. Un factor importante en dosis altas de sorbente es que el soluto

disponible es insuficiente para cubrir completamente los sitios intercambiables disponibles en el biosorbente, lo que resulta en una baja absorción de soluto (Yeoung-SangYun, 2008).

4.15 Estructura microbiana para la biosorción de cadmio

4.15.1 Bacterias Gram negativas

Las bacterias gramnegativas cuentan con una membrana plasmática, un espacio periplásmico que incluye una fina capa de peptidoglicano y la membrana externa. La membrana externa es exclusiva de las bacterias gramnegativas, es una bicapa lipídica que está constituida por una molécula anfipática: el lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. A parte del LPS, la membrana externa contiene fosfolípidos y proteínas que la unen al peptidoglicano. El LPS está constituido por el lípido A, el polisacárido central y la cadena lateral O. El polisacárido O por su variabilidad es usado frecuentemente para la clasificación serológica de las bacterias. La membrana externa cumple una de las funciones más importantes y la de servir como barrera protectora. Regula la entrada de sales biliares, antibióticos o sustancias tóxicas que puedan afectar la bacteria (Pírez, 2006).

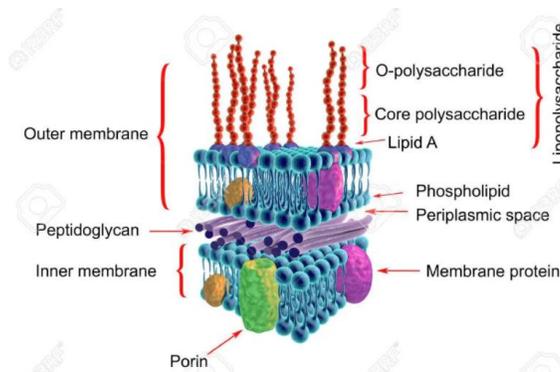


Figura 8. Pared celular de las bacterias Gram Negativas.

Fuente: Drmicrobe, 2021.

4.15.2 Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram-positivas están compuestas por una capa gruesa de peptidoglicano (90%) conectados por puentes de aminoácidos. Incrustados en la pared celular se encuentran los polialcoholes, conocidos como ácidos teicoicos, algunos de los cuales están ligados a lípidos para formar ácidos lipoteicoicos. Debido a que los ácidos lipoteicoicos están unidos covalentemente a los lípidos dentro de la membrana citoplasmática, son responsables de unir el peptidoglicano a la membrana citoplasmática. Las moléculas de peptidoglicano forman una red que cubre la célula como una rejilla. Son los ácidos teicoicos los que le confieren a la pared celular Gram-positiva una carga negativa global, debido a la presencia de enlaces fosfodiéster entre los monómeros del ácido teicoico (Yeoung-SangYun, 2008, pág. 271).

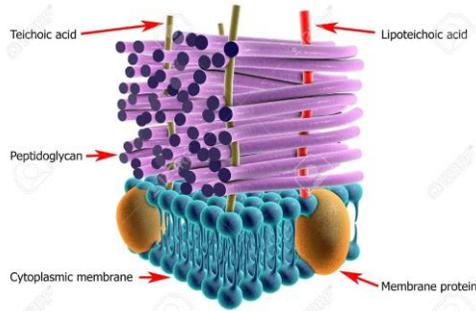


Figura 9. Pared celular de las bacterias Gram Positivas

Fuente: Drmicrobe, 2021.

4.15.3 Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares. Su reproducción puede ser sexual mediante esporulación formando esporas haploides que luego podrán conjugarse para producir células diploides y seguir con el ciclo de reproducción o reproducción asexual por gemación, fisión y por reproducción de blastoconidias. En presencia de oxígeno, todas las levaduras son aeróbicas ya que pueden crecer eficientemente por la presencia de carbohidratos del medio para la producción de biomasa y CO₂. Sin embargo, sin la presencia de oxígeno o su disminución, las levaduras cambian a su metabolismo anaerobio o fermentativo, y, por ende, menor cantidad de biomasa y producción de alcohol (León, 2021). La pared celular de la levadura está compuesta principalmente de complejos de polímeros de B-glucanos, α-mananos, manoproteínas y en menor cantidad quitina. Los mananos y manoproteínas representan el 30-40% de la pared celular y determinan las propiedades de la superficie celular.

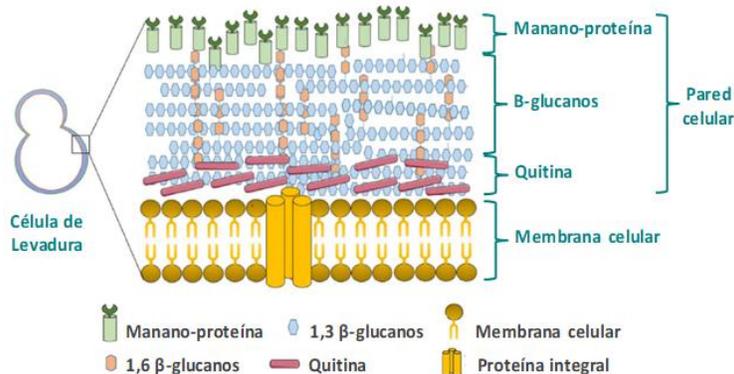


Figura 10. Pared celular de levaduras.

Fuente: Drmicrobe, 2021.

4.16 EPS y remoción de metales

Existe un mecanismo de interacción entre metales pesados y microorganismos, y es la producción de exopolisacáridos (EPS). Los EPS se acumulan en la superficie de la célula microbiana y brinda

protección a las células al estabilizar la estructura de la membrana contra el duro ambiente externo. La naturaleza aniónica de los exopolisacáridos debido a la presencia de sulfatos incrementa la interacción con cationes como metales (Kambourova, 2015). Los EPS se ubican en la superficie externa de las bacterias y se componen de macromoléculas orgánicas como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. Este mecanismo es independiente del metabolismo e implica la interacción de grupos funcionales cargados negativamente en la capa de EPS y metales catiónicos (Priyadarshane, 2021). Estos exopolisacáridos fueron encontrados en cepas de *Bacillus*, aumentando la capacidad de remoción de Cd en el medio.

La biorremediación de metales pesados en el suelo, en el agua y en productos alimenticios se ha estudiado durante varios años. Los mecanismos que utilizan los microorganismos incluyen la movilidad de los metales pesados mediante la unión y acumulación de metales en su superficie; el transporte activo o bioacumulación, secuestrando los metales dentro de la célula microbiana y la sustancia polimérica extracelular y la exudación los cuales pueden disminuir la cantidad de metales pesados por la formación de complejos. Es por esto, que el Cd se puede someter a un rápido proceso de adsorción por medio de microorganismos (Xie, 2021)

4.17 Técnicas analíticas para la determinación de cadmio en alimentos

Los métodos analíticos para la detección de cadmio en alimentos, agua y materiales biológicos están bien establecidos. Las técnicas de detección incluyen la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), electrotermico (horno de grafito y el horno de Zeeman), espectrometría de absorción atómica (ETAAS), espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS), espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y espectrometría de emisión de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-MS). La espectrometría es una técnica instrumental que permite determinar el mayor número de elementos en una gran variedad de matrices, basada en la identificación de analitos mediante el espectro emitido o absorbido por los mismos, pudiéndose diferenciar entre atómica y de masas (Barrueta, 2013).

La preparación de muestras para el análisis de cadmio depende del tipo de alimento o matriz, así como el método de cuantificación. Las dos técnicas más usadas son la digestión húmeda usando ácidos y la incineración seca después de la lixiviación. La técnica de digestión húmeda, utiliza la combinación de ácidos de alta pureza (nitríco, clorhídrico, sulfúrico) junto con oxidantes como el peróxido de hidrógeno para ayudar a la digestión, han sido ampliamente utilizados para la preparación de muestras. La digestión acida asistida por microondas, es una técnica que permite el uso de muestras grandes, masas 1-2 g. La técnica de lixiviación se utiliza de forma limitada, ya que las calcinaciones a temperaturas superiores a 400°C pueden inducir pérdidas de cadmio (FAO/WHO , 2011).

4.17.1 Espectrofotometría de absorción atómica

Es un método sensible y específico para la determinación de más de 60 metales o metaloides. Se basa en la cantidad de radiación absorbida por átomos en estado libre, para que ello ocurra se necesita que la longitud de onda del haz del incidente, coincida con la frecuencia de resonancia del

elemento que se está analizando y que los átomos del analito estén en estado libre. Esta técnica tiene un amplio campo de aplicación como son las áreas de alimentos, aguas, geología, industria, farmacéutica y medicina (Castelo, 2015).

4.18 Producción de Cacao

En Colombia, existen aproximadamente 65 mil familias productoras de cacao siendo una alternativa rentable. El grano colombiano es reconocido a nivel mundial por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como fino de sabor y aroma, características que solo posee el 5% de la producción mundial (FINAGRO, 2020, pág. 2). Según (MADR, 2020) en el periodo comprendido entre 2015 y 2019, el área sembrada en cultivos de cacao en Colombia ha crecido un 11% y la producción se ha incrementado en un 9%. Para el año 2019, el área se incrementó en 7.447 hectáreas sembradas, para una tasa del 4% con respecto al año anterior y la producción del 2019 en 2.873 toneladas para un aumento del 5%. La producción de grano de cacao para Colombia ha presentado un comportamiento positivo en los últimos años. Las exportaciones en el 2019 superaron las 9 mil toneladas, siendo los principales destinos México, Bélgica, EE. UU, Argentina, Holanda e Indonesia. Las importaciones fueron de 402 toneladas por valor de 1 millón USD, provenientes de Perú y Ecuador (FINAGRO, 2020, pág. 3).

El departamento de Santander es el principal productor de cacao a nivel nacional, con una producción del 42%, seguido por Antioquia con una producción del 9%, Arauca y Huila 8% cada uno, Tolima con 7% y Nariño con un 5% (MADR, 2020).

Según un informe de FEDECACAO, la producción durante el primer trimestre del 2021 fue de 38.573 toneladas de cacao, evidenciando un crecimiento alrededor del 11%, respecto a las 34.871 toneladas del año 2020.

Tabla 1. Producción a nivel nacional de cacao en Colombia por diferentes departamentos en el año 2019.

<i>Departamento</i>	<i>Toneladas</i>
<i>Santander</i>	25158
<i>Antioquia</i>	5229
<i>Arauca</i>	4546
<i>Huila</i>	4051
<i>Tolima</i>	3928
<i>Nariño</i>	3285
<i>Cesar</i>	1531
<i>Meta</i>	2124
<i>Cundinamarca</i>	2211
<i>N. de Santander</i>	1512
<i>Bolívar</i>	463

Fuente: Fedecacao, 2019



Figura 11. Producción mundial de cacao durante 2018-2019.

Fuente: Fedecacao, 2019.

En la actualidad, África, América del Sur y Asia son las principales regiones productoras y exportadoras de cacao. Costa de Marfil, Ghana, Camerún y Nigeria en África occidental son los mayores productores de cacao del mundo (Vásquez Z. C., 2019). En la figura 3 tomada de la página de Fedecacao, se puede observar la producción mundial de cacao expresada en toneladas en el periodo de 2018-2019.

5 MARCO LEGAL

5.1 Normativa del cadmio

El crecimiento productivo de las industrias procesadoras de cacao ha generado una dinámica mundial activa de este producto, incentivando a los productores colombianos y con ayuda de la Federación nacional de cacaoteros FEDECACAO a posicionar y que se dé reconocimiento a la calidad del cacao a nivel internacional, lo que significa nuevas oportunidades en el mercado para los granos de altísima calidad que producen nuestros cacaoteros en las diferentes regiones del país. Tras la importancia social y económica que está tomando el cacao se hace importante cumplir con la normativa vigente para la exportación de los granos. El reglamento de la comisión europea N°488/2014 ha establecido unos límites máximos con respecto al contenido permitido de plomo y cadmio en los productos alimenticios, el cual empezó a regir desde 1 de enero del 2019 (Castebianco, 2018).

Tabla 2. Contenido máximo permisible de cadmio en el chocolate reglamento (UE) N° 488/2014 de la comisión de 12 de mayo de 2014.

Producto	% Total de materia seca	Límite máximo de cadmio permitido
Chocolate con leche	<30	0.10mg/kg
Chocolate con leche	≥ 30	0,30 mg/kg
Chocolate	<50	0,30 mg/kg
Chocolate	≥50	0,80 mg/kg
Cacao en polvo	-	0,60 mg/kg

En el caso de Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en el 2016-2017 generó un programa nacional de vigilancia y control de Cd en productos derivados del cacao estableciendo los niveles máximos permitidos (*Tabla 2*). En Colombia, la población consume 13,5 g diariamente de cacao y sus derivados, por lo que se están adelantando estudios para informar sobre las concentraciones de Cd presentes en estos productos (INVIMA, 2016).

Tabla 3. Valores propuestos de niveles máximos para el Cadmio en chocolate y productos derivados del cacao de Colombia.

Productos	Nivel máximo de Cadmio mg/kg
Licor de cacao	5
Cacao en polvo sin adición de azúcar	4
Cacao en polvo con adición de azúcar	0.4
Chocolate (Chocolatina) con leche con un contenido de materia seca total de cacao <30%	0.2
Chocolate (chocolatina) con un contenido de materia seca total de cacao <50%; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 30%	0.4
Chocolate (chocolatina) con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50%	2.5

Fuente: INVIMA, 2016

6. METODOLOGÍA

6.1 Aislamiento de microorganismos tolerantes a cadmio a partir de muestras de grano de cacao durante el proceso de fermentación

A partir de los procesos de fermentación de granos de cacao desarrollados en las zonas de producción ubicadas en la Hacienda Monteoscuro en Cimitarra, Santander; Hacienda Betulia y La Central en Maceo, Antioquia. Se recibieron muestras de grano de cacao de diferentes días de fermentación. De estas muestras se tomaron 5 granos, se llevaron a 10mL de solución salina y se agitaron en vortex durante 1 minuto. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas hasta 10⁻⁴ de cada una de las muestras de grano y se sembraron por duplicado en los medios de cultivo YPD (Peptona 20g/L, extracto de levadura 10g/L, glucosa 20g/L, agar 15g/L, cloranfenicol 100mg/L) y TSA (Tryptic Soy Agar) con 20ppm de cadmio llevándose a incubar a 37°C durante 24 horas. A partir de las morfoespecies diferenciadas que tuvieron la capacidad de crecer en estas condiciones, se realizó la purificación de cada una de estas en los medios de cultivo YPD y TSA, cumpliendo el mismo periodo de incubación descrito anteriormente. Método modificado de (Huang, 2020).

De estos microorganismos aislados y que presentaron crecimiento en medio de cultivo con adición de 20ppm de Cadmio, se tomó por asada una colonia y se evaluaron diferentes concentraciones de cadmio en microplatos: 60 ppm, 80 ppm y 120ppm (filtro cualitativo). Este ensayo se realizó para ejercer presión en la selección de los microorganismos aislados y por cuestión de recursos solo trabajar con una población pequeña. Por lo tanto, la máxima concentración y la que presentó resultados consistentes fue la de 120 ppm. Posterior a esto, se llevaron los microplatos que contenían medio de cultivo líquido de TSB y YPD, se incubó a 37°C en el caso del medio de cultivo TSB y a 30°C para el medio YPD por 24 horas. A partir de estos aislamientos que crecieron bajo estas condiciones se realizó una descripción de la morfología macroscópica y microscópica de las colonias mediante tinción de gram.

6.2 Evaluación de la capacidad de biosorción de cadmio en medio acuoso de las levaduras y bacterias aisladas del proceso fermentativo del cacao

Partiendo de los microorganismos seleccionados, se preparó un pre-inóculo, tomándose una colonia aislada y depositándose en un Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo YPD y 50 mL de medio TSB, para levaduras y bacterias, respectivamente, se dejaron de 18h-24h en agitación a 150rpm y 35°C. Posteriormente, el caldo de fermentación se centrifugó a 12.100g durante 10 min a 4°C para recuperación de la biomasa. Para realizar la inoculación, se pesaron 50mg de biomasa húmeda y se depositaron en tubos falcón que contenían 10mL de una solución de cadmio estéril y se evaluaron concentraciones de 2mg/L, 5mg/L y 10mg/L (filtro cuantitativo). Se seleccionó la concentración mínima de 2mg/L. La solución de cadmio se preparó con agua tipo I y se ajustó el pH a 5.5. La biomasa con la solución de cadmio se dejó en contacto durante 1 hora en agitación a 150rpm y 21°C. El complejo microorganismo+metal se separó mediante centrifugación a 4600g durante 5 min (Rasoul, 2018). Por último, se recuperó el sobrenadante, se adicionaron 300µL/ml de HNO₃ y se pasó por un filtro de membrana de 0.20µm. La lectura de las muestras fue realizada por el Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) de la Universidad de Antioquia, que se encargó de realizar el análisis por absorción atómica para determinar la cantidad de cadmio presente en la muestra.

6.3 Identificación molecular

6.3.1 Identificación molecular de levaduras

6.3.1.1 Extracción de ADN genómico de levaduras

Se realizó la extracción de ADN de las cepas usando el protocolo complementario de Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit. El ADN se extrajo a partir de un mL de cultivo puro de 24 h de crecimiento y se hizo de la siguiente manera: las muestras se centrifugaron durante 10 min a 7500 rpm, el sobrenadante se desechó y se resuspendió en 600 µL de tampón sorbitol. Seguidamente, se añadieron 2µL de lincasa llevando a incubar a 30° durante 30 min. Los esferoblastos se sedimentaron centrifugando durante 10 min a 300 xg. Seguidamente, se resuspendieron los esferoblastos en 180 µL de tampón ATL y se añadieron 20 µL de proteínasa K. Se mezcló bien y se incubó a 56 °C por 1 h, se agitó en vórtex cada 15 min. Se añadieron 200 µL de tampón AL y 200 µL de etanol a la muestra. Se pipeteó la muestra en la columna de centrifugación DNeasy mini y se colocó en un tubo de recolección. Se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se desechó el tubo colector. La columna de centrifugación se colocó en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón AW1 que se llevó a centrifugación a 8000 rpm por 1 min, se desechó el tubo colector. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 3 min. Por último, se colocó la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga y se pipetearon 100 µL de tampón AE directamente sobre la membrana, esto se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se volvió a repetir este paso nuevamente. Las muestras se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

6.3.1.2 Amplificación de las regiones ITS y D1/D2 mediante PCR

El ADN que se extrajo se usó para realizar la PCR. La mezcla que se usó para hacer la amplificación de 9 cepas de levaduras se preparó utilizando un volumen de 25 µL, 2µL de ADN y 23µL de mezcla que contenía 2,5 µL de buffer, 2 µL MgCl₂, 0,5 µL dNTPs, 0,5 µM de ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), 0,5 µM ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa recombinante y 16,8 µL de agua. Las condiciones de reacción para la PCR en el termociclador (Bio-Rad MJ Research PTC-200 Thermal Cycler Dual 48) fueron 35 ciclos que incluyen una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 53°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los tamaños de los productos de la PCR se compararon con el marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

La región D1/D2 se amplificó preparando un volumen de 25 µL, 2µL de ADN y 23µL de mezcla que contenía 2,5µL de buffer, 2,5µL MgCl₂, 0,5 µL dNTPs, 0,5 µM de NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa recombinante, 16,3 µL de agua. La amplificación se realizó siguiendo las siguientes condiciones de PCR en el termociclador (Bio-Rad MJ Research PTC-200 Thermal Cycler Dual 48): 30 ciclos de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación a 57°C por 45 segundos y extensión a 72° por 10 min. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los tamaños de los productos de la PCR se compararon con el marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

6.3.2 Identificación molecular de bacterias

6.3.2.1 Extracción de ADN genómico de bacterias

Se realizó la extracción de ADN genómico de seis bacterias usando el mismo protocolo complementario de Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit descrito para levaduras. Se tomó un mL de cultivo puro de 24 h de crecimiento y se centrifugó durante 10 min a 7500rpm. El sedimento se resuspendió en 600 µL de tampón sorbitol, se añadieron 2 µL de liticasa, se incubó a 30°C por 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 1000 xg por 10 min. Se resuspendió el sedimento en 180 µL de tampón ATL. Se añadieron 20 µL de proteinasa K, se mezcló e incubó a 56°C por hora y media. Posteriormente, se añadió 200 µL de tampón AL y 200 µL de etanol a la muestra, se agitó en vortex rápidamente. La muestra se pipeteó en la columna de centrifugación colocada en un tubo de recolección. Se centrifugó a 7000 xg por 5 min hasta eluir la muestra. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Se colocó la columna nuevamente en otro tubo de recolección y se agregaron 500 µL de tampón AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos. La columna se pasó a un tubo de microcentrífuga y se adicionaron 100 µL de tampón AE, se centrifugó a 8000 rpm por 1 min hasta eluir. Este paso se repitió nuevamente. Las muestras se almacenaron a 4°C para su posterior uso.

6.3.2.2 Amplificación de la región rRNA 16S

El ADN extraído se usó para realizar la PCR de las 6 bacterias. Se usaron los primers universales 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') y 1492R (5 - CTACGGCTACCTTGTTACGA - 3'). Las condiciones de amplificación se hicieron de la siguiente manera usando el termociclador (Bio-Rad MJ Research PTC-200 Thermal Cycler Dual 48): un ciclo de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguidos de 31 ciclos de 94°C por 1 min, alineamiento a 57°C por 45 segundos y un ciclo de 70°C por 2 min y al final, un ciclo de extensión por 8 min. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los tamaños de los productos de la PCR se compararon con el marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

6.3.3 Secuenciación e identificación

El producto de PCR de los aislamientos fueron enviados a secuenciar por medio del método Sanger a Macrogen Inc (Corea del sur), teniendo en cuenta los primers NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para levaduras y por otro lado los primers 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5' - CTACGGCTACCTTGTTACGA - 3') para bacterias. Estas secuencias nucleotídicas fueron editadas usando el software BioEdit con la herramienta Contig Assembly program, seguidamente del análisis bioinformático usando BLAST selección del algoritmo BLASTn para encontrar regiones de similitud entre secuencias biológicas comparadas con la base de datos GenBank del Centro Nacional para la información biotecnológica (NCBI).

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	Semana				Semana				Semana				Semana			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisión bibliográfica																
Inducción en el laboratorio																
Microscopía y Macroscopía de bacterias y levaduras seleccionadas																
Extracción ADN																
Identificación molecular																
Preparación medios de cultivo																
Preparación medio sintético de pulpa de cacao																
Registro de resultados																
Análisis sensorial de medio sintético																
Curso de transferencia Santa Fé de Antioquia																
Preparación medio de optimización																
Recuento cámara de Neubauer																
Preparación mix de microorganismos																
Elaboración de licor de cacao																
Salida de campo a Maceo																
Catación licor de cacao																
Redacción del informe																
Entrega avances del informe																
Entrega final del informe a la universidad																

8. RESULTADOS

8.1 Aislamiento de microorganismos tolerantes al cadmio del proceso fermentativo del cacao

Se recolectaron y analizaron varias muestras de granos en proceso de fermentación provenientes de la Hacienda Monteoscuro en Cimitarra-Santander y Hacienda Betulia y la central en Maceo-Antioquia. El total de aislamientos en Maceo fueron de 119 y el total de aislamientos de Cimitarra fueron de 138. Al momento de ser sembrados en microplatos a una concentración de 120 ppm de Cadmio, la cantidad disminuyó significativamente, quedando como resultado 6 bacterias y 9 levaduras, que se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Bacterias y levaduras aisladas de granos de cacao durante y después del proceso fermentativo; provenientes de Maceo, Antioquia y Cimitarra, Santander.

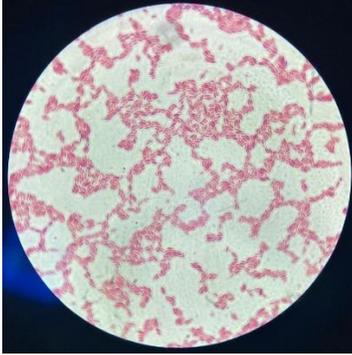
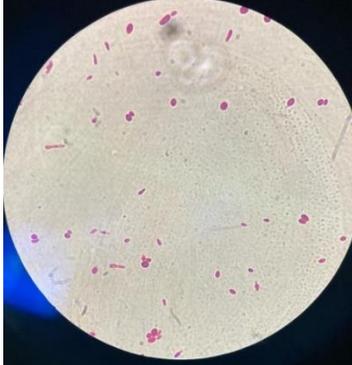
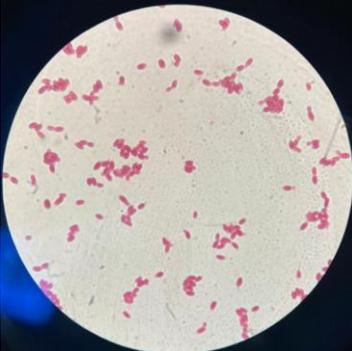
Bacterias	
Maceo	Cimitarra
M15	M11
M17	
M1	
M21	
M18	
Levaduras	
Maceo	Cimitarra
M12	M1
M6	M4
M14	M5
	M8
	M12

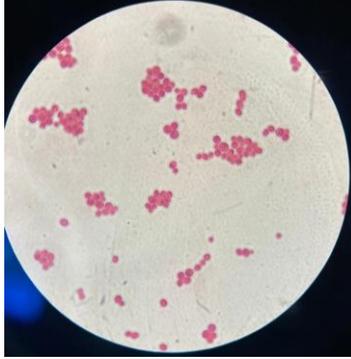
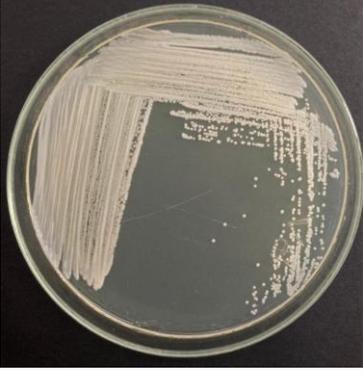
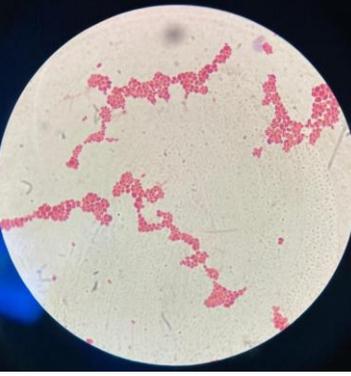
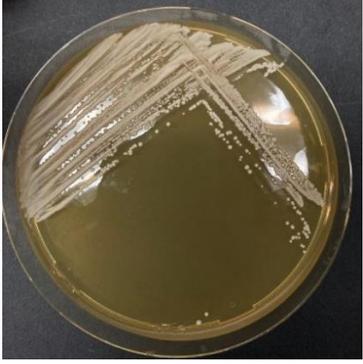
Fuente: Autora

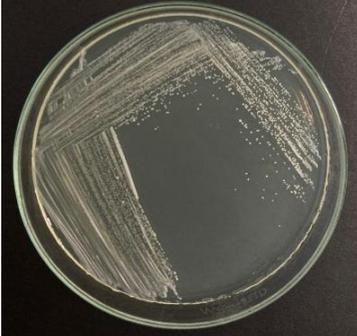
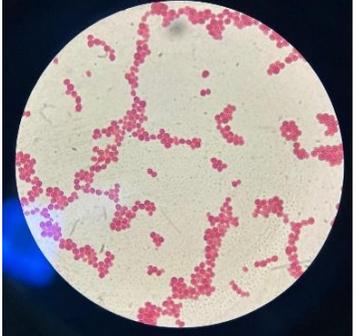
Para realizar la descripción de las colonias y su morfología microscópica, las levaduras se sembraron en medio de cultivo YPD y Sabouraud a 30°C por 24h. Se hizo la descripción macroscópica en placa y el montaje al microscopio se hizo tomando una colonia aislada y fijándola en un portaobjetos. Para visualizarlas claramente al microscopio se tiñeron con safranina durante dos minutos (Tabla 5).

En el caso de las cepas bacterianas, estas fueron sembradas en medio de cultivo TSA y se llevaron a incubar a 37°C durante 24h. Se realizó la descripción macroscópica de las colonias aisladas y posteriormente se realizó la tinción de Gram, ver Tabla 6.

Tabla 4. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas levaduras aisladas de la fermentación del cacao.

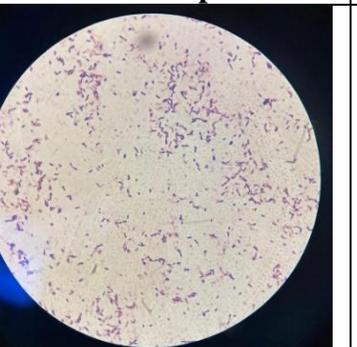
Levaduras			
Código	Macroscopía	Microscopía	Descripción
M1			Colonias con forma circular, superficie lisa, brillante y de color blanca crema. La forma de la célula es apiculada. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M4			Colonias cremosas con forma irregular, superficie rugosa, opaca y de color blanca. La célula presenta forma redonda. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M5			Las colonias son circulares, cremosas y de color blanco/crema. Las células presentan forma oblonga. Montaje en fresco con objetivo 40X.

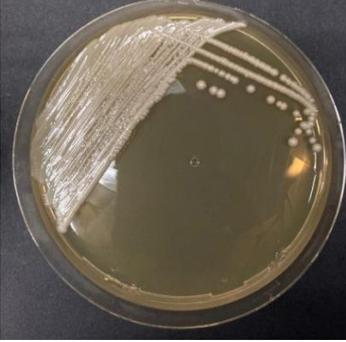
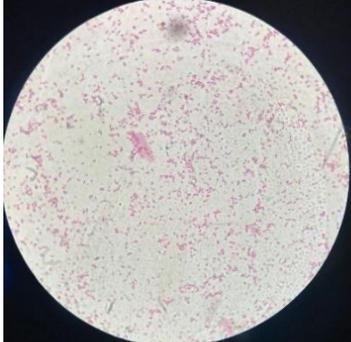
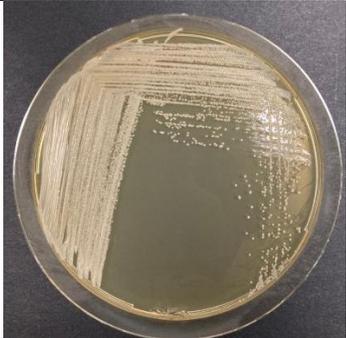
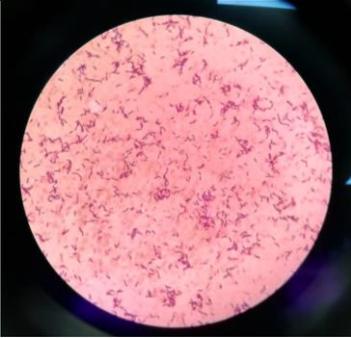
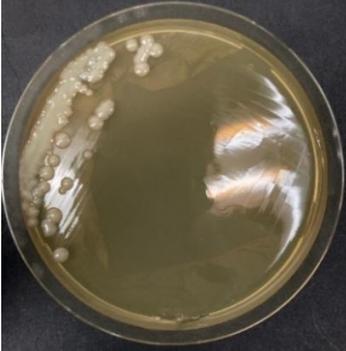
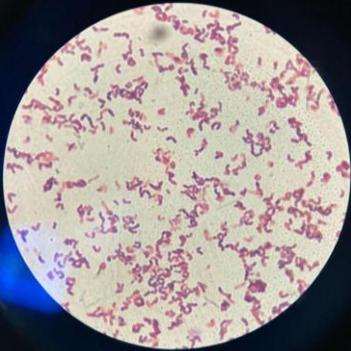
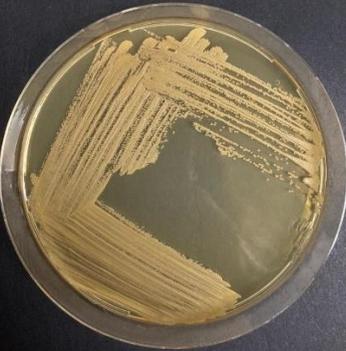
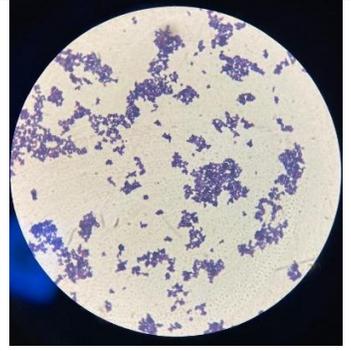
M6			Colonias grandes, cremosas y brillantes, con borde liso, de color blanco. La célula tiene forma esférica. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M8			Colonias circulares, cremosas, brillantes y de color blanco/crema. Las células presentar forma apiculada. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M11			Colonias cremosas, borde liso y color blanco/crema. Las células tienen forma oblonga. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M12 CCC			Colonias circulares, cremosas, brillantes y color blanco. Las células presentan forma oblonga. Montaje en fresco con objetivo 40X.

M12 Maceo			Colonias circulares, cremosas, brillantes, borde liso y color blanco. Las células tienen forma esférica. Montaje en fresco con objetivo 40X.
M14			Colonias circulares, cremosas y brillantes. Las células son esféricas. Montaje en fresco con objetivo 40X.

Fuente: Autora

Tabla 5. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas de bacterias aisladas de la fermentación del cacao.

Bacterias			
Código	Macroscopía	Microscopía	Descripción
M1			Colonia con borde irregular, rizoide, opaca y de color blanco crema. Son bacilos Grampositivos con bordes redondeados. Objetivo 100X.

M11			<p>Colonias redondas, cremosas y brillantes. Bacilos pequeños Gramnegativos. Objetivo 100X.</p>
M15			<p>Colonias redondas, cremosas y brillantes, con borde liso. Son bacilos grampositivos. Objetivo 100X.</p>
M17			<p>Colonias grandes, brillantes y mucoides, con borde liso. Las células presentan forma de bacilos Grampositivos. Objetivo 100X.</p>
M18			<p>Colonia redonda, lisa y con pigmentación naranja. Su morfología son cocos Grampositivos. Objetivo 100X.</p>



Fuente: Autora

8.2 Identificación molecular de las levaduras y bacterias aisladas

El proceso de electroforesis para el set de bacterias y levaduras se llevó a cabo usando gel de agarosa al 1%. Para levaduras se analizó la región D1/D2 de la subunidad grande ribosomal 26S usando el primer NL, ver figura 12. En el caso de las bacterias, se analizó la región 16S RNAr usando los primers universales 27F y 1492R, figura 13.

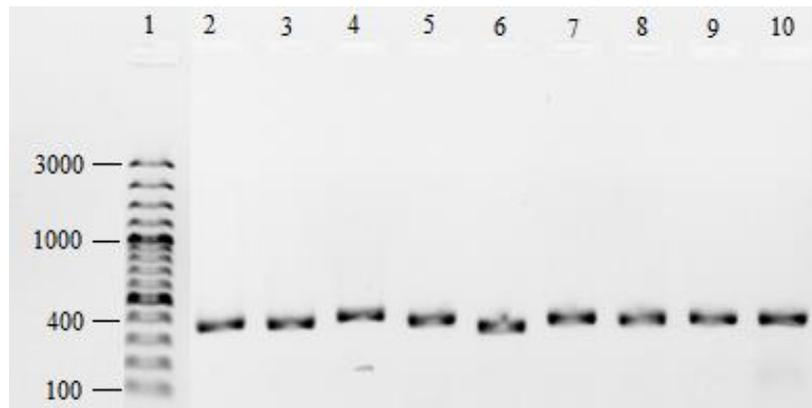


Figura 12. *Electroforesis gel de agarosa set de levaduras.*

Carril 1: GeneRuler 100 pb, carril 2: M1, carril 3: M4, carril 4: M5, carril 5: M8, carril 6: M12 CCC, carril 7: M12 Maceo, carril 8: M14, carril 9: M6, Carril 10: M11. Los fragmentos de ADN tienen un tamaño aproximado de 400 pb. Fuente: Autora

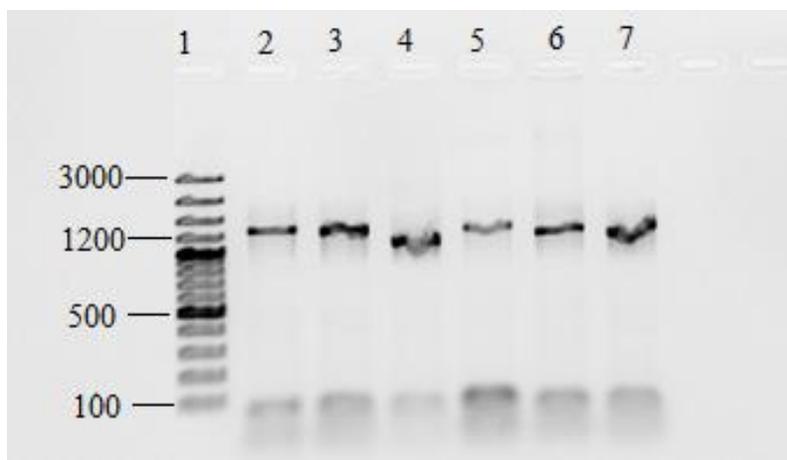


Figura 13. Electroforesis gel de agarosa set de bacterias.

Carril 1: GeneRuler 100 pb, carril 2: M1, carril 3: M11, carril 4: M15, carril 5: M17, carril 6: M18, carril 7: M21. Los fragmentos de ADN tienen un tamaño aproximado de 1200 pb. Fuente: Autora

Tabla 6. Identificación de las levaduras asociadas a la fermentación del cacao a partir de análisis por BLAST de secuencias NL.

Aislamiento	Identidad GenBank	Tamaño del fragmento (pb)/cobertura (%)	% Identidad	Valor E
M1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	515/100	100	0,0
M4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	475/100	100	0,0
M5	<i>Pichia kluyveri</i>	515/100	99,81	0,0
M8	<i>Clavispora lusitaniae</i>	518/95	100	0,0
M12 CCC	<i>Pichia kudriavzevii</i>	568/95	100	0,0
M12 Maceo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	570/95	100	0,0
M14	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	598/95	100	0,0
M6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	594/95	100	0,0

Fuente: Autora

El análisis por BLASTn para las secuencias del gen NL de las levaduras mostró que dos cepas pertenecen al género *Saccharomyces* y dos al género *Pichia*. Además, se halló un representante de *Wickerhamomyces*, *Clavispora*, *Hanseniaspora* y *Torulospora*. Para todas las cepas fue posible plantear una identidad a nivel de especie, para un total de 8 cepas identificadas. Inicialmente, se aislaron 9 cepas de levaduras, una de ellas no pudo ser identificada porque la calidad de la secuenciación de Sanger no mostró resultados favorables. De estos aislamientos, 3 cepas provienen Maceo, Antioquia (M6, M12 y M14) y 5 cepas provienen de Cimitarra Santander (M1, M4, M5, M8 y M12).

Tabla 7. Identificación de las bacterias asociadas a la fermentación del cacao a partir de análisis por BLAST de secuencias 16S.

<i>Aislamiento</i>	<i>Identidad GenBank</i>	<i>Tamaño del fragmento (pb)/cobertura (%)</i>	<i>% Identidad</i>	<i>Valor E</i>
M1	<i>Bacillus subtilis</i>	1335/100	100	0,0
M11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	730/100	100	0,0
M15	<i>Bacillus sp</i>	479/99	100	0,0
M17	<i>Bacillus sp</i>	1412/97	99,93	0,0
M18	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1374/97	98,73	0,0
M21	<i>Bacillus subtilis</i>	1361/98	100	0,0

Fuente: Autora

En cuanto a la identificación molecular de las bacterias, se analizó el gen ARNr 16S de bacterias usando el alineamiento de secuencias de tipo local en BLASTn y comparando los resultados con las secuencias encontradas en la base de datos del GenBank (NCBI). Se confirmó la presencia de 4 cepas de *Bacillus*, 1 cepa del género *Klebsiella* y 1 cepa del género *Dermacoccus*.

8.3 Evaluación de la capacidad de biosorción de cadmio en medio acuoso

Partiendo de la evaluación de la capacidad de remoción de cada uno de los microorganismos sometidos al medio acuoso contenido de 2ppm de cadmio, por parte de las levaduras evaluadas (figura 7), las que mayor porcentaje de biosorción tuvieron, el cual fue mayor a 60% fueron *H. opuntiae*, *S. cerevisiae* y *W. anomalus* con 83%, 76% y 63% respectivamente. Así mismo, se tuvo en cuenta que la levadura que menor porcentaje de cadmio removió fue *P. kluyveri* con un 34%.

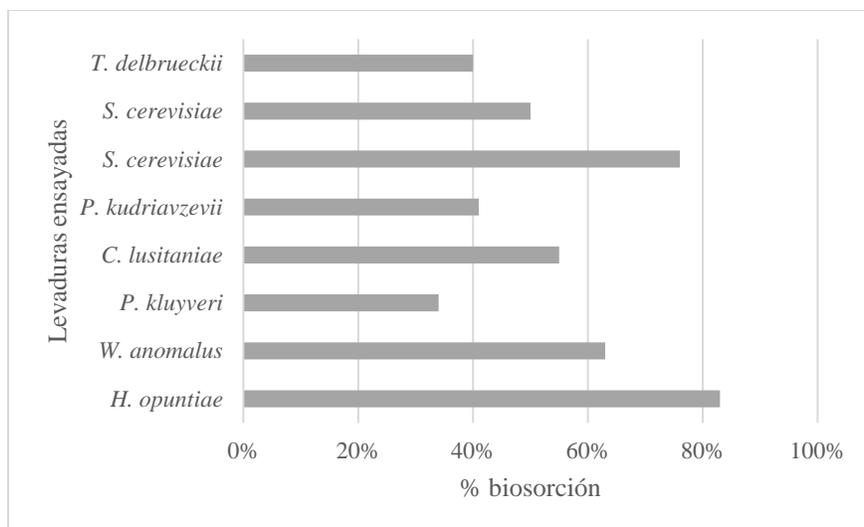


Figura 14. Capacidad de remoción de Cd^{2+} en medio acuoso por levaduras.

Fuente: Autora

En el caso de la evaluación de la capacidad bacteriana para remover el cadmio en este medio se evidenció que los porcentajes de la totalidad de aislamientos bacterianos superaron el 50%, las bacterias con mayor porcentaje fueron las pertenecientes al género *Bacillus* a excepción de una de las especies de *B. subtilis*, no obstante, no deja de ser un resultado significativo en el contraste de los demás resultados obtenidos.

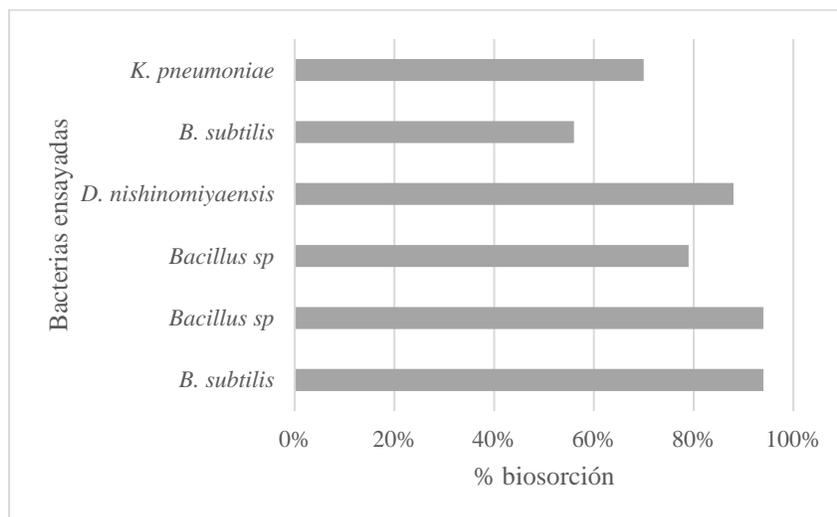


Figura 15. Capacidad de remoción de Cd^{2+} en medio acuoso por bacterias.

Fuente: Autora

Trayendo a colación, la capacidad evaluada abarcando tanto levaduras como bacterias, los resultados obtenidos en los ensayos con bacterias mostraron mayores porcentajes de remoción a diferencia de las levaduras.

9. DISCUSIÓN

9.1 Aislamiento e identificación molecular de cepas

En esta primera etapa de la investigación, se aislaron e identificaron microorganismos a partir de granos cacao durante el proceso de fermentación provenientes de Santander y Antioquia. Se logró aislar gran variedad de levaduras como *Saccharomyces* y *Pichia* y bacterias del género *Bacillus*. Se fueron seleccionando a partir de la capacidad de crecer en presencia de Cd, siendo este el factor de selección. Seguidamente, se realizó la identificación molecular de los 9 aislados de levaduras y 6 aislados de bacterias.

En la identificación molecular de las levaduras se usaron dos cebadores, los ITS y los NL. Las levaduras se identifican generalmente por secuencias de genes muy similares de la región 5' de la subunidad grande o LSU. El dominio D1/D2 es el nombre que se le da a una región de aproximadamente 600 nucleótidos en el extremo 5' de una subunidad de 26S DNAr. Esta región D1/D2 es un dominio altamente conservado de LSU, por lo que se utiliza para la identificación rápida y precisa de cepas de levaduras (Tesfaw, 2021). También, existen en cada unidad de transcripción otras regiones, que son los espaciadores internos (ITS) y los externos (ETS), que se transcriben, pero no forman parte de la molécula de rARN final. Estas son las regiones secuenciadas en levaduras. El dominio D1/D2 es específico para levaduras ascomicetas y la región que comprende los espaciadores transcritos internos y el gen ribosomal 5,8S son usados para levaduras como para hongos (Vásquez J. R., 2016). Esto explica por qué se usó la región D1/D2 para la identificación molecular de las cepas de levadura, pues esta región es más específica para el análisis de las levaduras. En el caso de las bacterias, se analizó la región 16S rARN, de la subunidad pequeña del ribosoma SSU. Los rRNA SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes en todos los organismos. Cuentan con la presencia de oligonucleótidos llamados firma. Son secuencias específicas cortas que aparecen en casi todos los miembros de un grupo filogenético, por lo que estos oligonucleótidos firma son usados para la identificación de especies bacterianas (Rodicio, 2003).

Según los datos de alineación de las secuencias NL para levaduras en NCBI GenBank, los aislados mostraron una identidad del 100%, a excepción de *P. kluyveri* que fue del 99,81%. En el caso de las bacterias, el análisis de la secuencia del ARNr 16S, la mayoría de los géneros encontrados fueron los de *Bacillus*.

La identificación molecular los aislados indicó una mayor complejidad de la población de levaduras con respecto a los grupos bacterianos. El primer paso de la fermentación está liderado principalmente por *S. cerevisiae* que es la encargada de metabolizar los azúcares presentes en la pulpa del cacao y producir alcohol. Además, la presencia de *P. kudriavzevii*, *T. delbrueckii* y *H. opuntiae* también están muy presentes durante el proceso fermentativo. (Visintin, 2016) en un

estudio poblacional de los microorganismos implicados en las fermentaciones de cacao en pila, quisieron evaluar la capacidad que tienen los microorganismos de tolerar condiciones de estrés, para entender mejor y proporcionar información de como las levaduras y bacterias tienen la capacidad de iniciar y llevar a cabo un proceso de fermentación. Si estos microorganismos pueden crecer tolerando diferentes factores como pH, variaciones de temperatura o concentraciones de azúcares pueden ser estimulados para tolerar contaminantes ambientales, como sería el caso de metales pesados.

La mayoría de los microorganismos presentados en este estudio han sido reportados en las fermentaciones del cacao y muchos de ellos han sido estudiados en diversos ensayos para probar la capacidad que tienen de remover el Cd. Existen diversos factores ambientales que influyen en la biosorción de metales pesados por la biomasa microbiana y deben ser estudiados a profundidad antes de escalar un proceso de biosorción para fines industriales. Entre estos factores fisicoquímicos o ambientales que pueden afectar la remoción de metales pesados se encuentran el pH y la temperatura y la concentración inicial en la que se encuentra el metal. se han reportados varios estudios donde utilizan microorganismos de los géneros *Bacillus* o *Saccharomyces* en procesos de remoción de Cd. En este proyecto, se ha querido implementar biomasa microbiana para mitigar los niveles de este metal pesado específicamente en los granos de cacao fermentados. El cacao, como anteriormente se ha dicho, es un acumulador de Cd y las concentraciones superan lo establecido por la normativa vigente por lo que es un serio problema de salud pública. Según, (Bovio, 2021) el cadmio está presente en el aire, el agua, los sedimentos a una concentración de 0,15mg/kg en la corteza terrestre. Al ser un compuesto usado en la agricultura y la industria, puede llegar al ambiente en grandes cantidades y por ende a los alimentos que consumimos, (Kwon, 2022) ocasionando efectos nocivos sobre el riñón, los huesos, el corazón, los pulmones, el tejido ocular; además, aumenta el riesgo de padecer diabetes, hipertensión y cáncer. En Colombia, se han establecidos niveles máximos de metales pesados presentes en alimentos en la Resolución 4506 de 2013, allí se especifican valores entre 0,050 mg/kg hasta 0,10mg/kg en frutas y hortalizas, cereales, aguas minerales y carnes. En cuanto a la cantidad de cadmio, específicamente en cacao y sus derivados, el INVIMA estableció niveles máximos permitidos, Tabla 2.

9.2 Pruebas de tolerancia al cadmio

Los microorganismos que se pudieron aislar de la fermentación del cacao, incluyendo bacterias y levaduras, se sometieron a pruebas de tolerancia al cadmio en medio acuoso, para poder seleccionar los que presentaban mejor capacidad de biosorción de cadmio y posteriormente identificarlas molecularmente. Se aislaron inicialmente en medio sólido con 20ppm de cadmio en medio YPD para levaduras y TSA para bacterias. De los microorganismos que presentaron crecimiento a esa concentración, se inocularon en microplatos con 120ppm. Posteriormente, esos microorganismos que siguieron presentando crecimiento en microplatos a 120ppm, se llevaron a medio acuoso que contenía una concentración de cadmio de 2ppm. Se realizó la separación del complejo microorganismo-metal y las muestras se analizaron utilizando la técnica de absorción atómica.

La composición de la pared celular es uno de los factores más importantes en el proceso de biosorción. Los grupos funcionales aniónicos, presentes en los ácidos teicoicos, conocidos como polialcoholes de las bacterias grampositivas, y en la membrana externa compuesta por fosfolípidos

y lipopolisacáridos de las bacterias gramnegativas, son los principales elementos responsables de la unión de metales pesados en la superficie celular. (Drogu, 2007) Las células grampositivas acumulan una cantidad mayor de metales pesados que las células gramnegativas, Las bacterias grampositivas presentan una gran capacidad de biosorción, debido al alto contenido de peptidoglicano y ácidos teicoicos.

El rendimiento de sorción de los biosorbentes bacterianos, mostró que las bacterias del género *Bacillus sp* y *Bacillus subtilis* pudieron crecer y mitigar el cadmio presente en solución con un resultado del 94% para ambos microorganismos. (Xie, 2021) estudiaron la capacidad de biosorción de cd por una cepa de *Bacillus subtilis* a concentración de 10mg/L y 40mg/L del metal y obtuvieron porcentajes del 86% y 65%, respectivamente. Se ha reportado que este microorganismo es capaz de quelar el Cd en complejos de ácido orgánico-Cd para unir el metal a la pared celular y ser más fácil de transportarlo al citoplasma.

Como se sabe, la contaminación por metales pesados se considera un grave problema en la industria alimentaria, con serias repercusiones en la salud humana. En muchos estudios, se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en biosorción de metales pesados, pues es una levadura que tiene la ventaja de crecer a gran escala, en medios baratos, fácil manipulación a nivel molecular y alta producción de biomasa. Este microorganismo es capaz de individualizar diferentes especies de metales en función de su toxicidad. El mayor porcentaje de remoción de cadmio en medio acuoso alcanzado por las levaduras fue del 83% para *H. opuntiae* y 76% para una cepa de *S. cerevisiae*.

9.2.1 Efecto del tiempo de contacto sobre la eficiencia de biosorción

El efecto del tiempo de contacto se estudió a temperatura de 21°C, 50 mg de biomasa, concentración de Cadmio 2mg/L y en contacto durante 1 hora. En un estudio realizado por (Fayyaz, 2014), se analizó el tiempo de contacto de *Bacillus subtilis* con una solución acuosa de cadmio, en donde la biosorción de iones metálicos fue rápida y alcanzó al rededor del 80% en los primeros 60 minutos. Esto debido a la alta concentración inicial de iones cadmio y los sitios de unión de metal vacíos de biosorbente. Ellos pudieron establecer que a las 3 horas el proceso de biosorción alcanzó el equilibrio entre la fase acuosa y sólida. No todos los microorganismos son iguales, quizás este tiempo de contacto que usó en este trabajo, que fue de una hora, pudo favorecer a las bacterias, pero a las levaduras no tanto. Por lo tanto, se debe analizar este factor con más detalle.

10. CONCLUSIONES

Se identificaron microorganismos que están asociados a la fermentación de los granos de cacao, 6 cepas de bacterias y 9 cepas de levaduras, con el fin de estudiar la tolerancia que tienen frente al Cadmio y su capacidad para removerlo de ambientes contaminados. El estudio está centrado en poder obtener microorganismos capaces de remover el Cadmio de productos como el cacao, pues se constituye una fuente directa de contaminación de este metal pesado a la cadena alimenticia, acarreando consigo serios problemas de salud y de productividad a nivel Nacional. De las morfoespecies obtenidas, el género más representativo en cuanto a las bacterias fue el de *Bacillus*, un microorganismo capaz de formar esporas cuando las condiciones del medio son desfavorables,

permitiéndole sobrevivir. Por otro lado, en la identificación de las levaduras se presentó mayor diversidad de cepas, pues son las que le dan inicio al proceso fermentativo del cacao. Las cepas microbianas aisladas presentan capacidad para crecer y remover cadmio en una solución acuosa a una concentración de 2ppm. Los resultados obtenidos sugieren una caracterización fisiológica más profunda para entender mejor los mecanismos de acción que emplean las bacterias y levaduras para resistir ambientes contaminados con metales pesados y poder estandarizar un proceso que mejore esta capacidad que se sabe ya tienen.

11. RECOMENDACIONES

Debido a que este trabajo es solo una pequeña muestra y muy general de un macro proyecto, se recomienda estandarizar muchos más factores que están involucrados en el proceso de biosorción microbiana como lo son el pH, temperatura, tiempo de contacto y concentraciones óptimas de metales pesados, con el fin de entender mejor el mecanismo de acción microbiana y mejorar los resultados esperados de biorremediación de metales pesados. Por último, se recomienda revisar más detalladamente la bibliografía expuesta en este trabajo, para comprender mejor el proceso de remoción de metales pesados, donde se pueden evidenciar con cifras exactas y técnicas más especializadas la biosorción llevada a cabo por bacterias y levaduras.

12. GLOSARIO

Bioacumulación: Es la acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales u otras sustancias persistentes en un organismo a partir de fuentes bióticas como abióticas.

Biomasa microbiana: Cantidad total de materia orgánica presente en microorganismos de un ambiente particular. Componente funcional de la microbiota del suelo, responsable principalmente de la descomposición de la materia orgánica y el reciclaje de nutrientes

Biosorción: Se define como la eliminación de especies, compuestos y partículas de metales pesados o metaloides en soluciones mediante materiales biológicos.

Biosorbato: Molécula del soluto contaminante, en este caso, el metal pesado.

Biorremediación: Proceso que utiliza organismos vivos para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, agua y aire.

EPS: Sustancias poliméricas extracelulares

Fermentación: Proceso catabólico y anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico.

Ion: Son átomos o grupos de átomos que tienen una carga eléctrica. Los iones con una carga positiva se denominan cationes. Los que tienen carga negativa se denominan aniones.

Intercambio iónico: Proceso de separación basado en la transferencia de materia fluido-sólido. Reacción química en la que los iones móviles hidratados son intercambiados por iones de igual carga de un fluido

Metal pesado: Son el grupo de metales y metaloides con una densidad atómica de más de 4g/cm^3 .

Secuenciación: Proceso que determina el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN o ARN o del orden de los aminoácidos en una proteína.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROSAVIA. (2021). *Investigación y recomendaciones sobre cadmio en el cultivo de cacao en Colombia*. Bogotá: Punto Aparte.
- Albuquerque, G. F. (2021). Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*. *Food Chemistry*.
- Antolinez, E. A. (2020). Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. *Ciencia y agricultura*, 8.
- Barrueta, S. (2013). *Guía de métodos de detección y análisis de cadmio en cacao (Theobroma cacao L.* Lima.
- Batista, L. (2009). *Guía técnica o de Cacao en la República Dominicana*. CEDAF. Santo Domingo.
- Beltrán-Pineda, M. E.-R. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión . *Revista facultad de ciencias básicas*, 172-197.
- Bovio, F. M. (2021). Cadmium promotes glycolysis upregulation and glutamine dependency in human neuronal cells. *Neurochemistry International*.
- Brice J. Assi Clair, M. K.-O. (2019). Effect of aroma potential of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation on the volatile profile of raw cocoa and sensory attributes of chocolate produced thereof. *European Food Research and Technology*.
- CAF. (2020). *Observatorio del cacao fino y de aroma para América Latina*. Boletín No. 9.
- Castebianco, J. A. (2018). Técnicas de remediación de metales pesados con potencial aplicación en el cultivo de cacao. *La granja: Revista de ciencias de la vida*, 23-24.
- Castelo, M. (2015). *Determinación de Arsénico y Mercurio en agua de consumo del cantón Rumiñahui por Espectrofotometría de Absorción Atómica*. Licenciatura en Ciencias Químicas. Quito.
- Caviedes Rubio, D. M. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una revisión. *Revista Ingeniería y Región*, 75.
- Chica, D. &. (2020). *Estrategias de remediación de cadmio aplicables a sistemas de producción de cacao en Colombia*. Tesis especialización en gestión ambiental. Medellín.
- Cinar, Z, A. M.-R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Compañía Nacional de Chocolates S.A.S. (2019). *LA MONILIASIS DEL CACAO: DAÑOS, SÍNTOMAS, EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO*. Medellín.
- Cubillos, G. M. (2008). *Manual de beneficio del cacao. Para: técnicos, profesionales del sector agropecuario y productores*. Medellín.
- Das., M. P. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.

- David Romero, G. S. (2019). Content and the relationship between cadmium, nickel, and lead concentrations in Ecuadorian cocoa beans from nine provinces. *Food Control*, 106750.
- Domínguez, L. B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*.
- Drogu, M. G.-G. (2007). The use of *Bacillus subtilis* immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent in trace metal determination. *Journal of Hazardous Materials*.
- Enríquez, G. (1983). *El cultivo de cacao*. EUNED.
- Enríquez, G. A. (1985). *Curso sobre el cultivo de cacao*. EUNED.
- FAO/WHO . (2011). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Who Food Additives Series: 64*.
- Fayyaz, M. J. (2014). Application of artificial neural network for the prediction of biosorption capacity of immobilized *Bacillus subtilis* for the removal of cadmium ions from aqueous solution. *Biochemical Engineering Journal*.
- Fedecacao. (2019). *Economía internacional del cacao. Mayor producción mundial de cacao*. Obtenido de <https://www.fedecacao.com.co/economiainternacional>
- Feria, P. P. (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*.
- Figuerola, C. M. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*.
- FINAGRO. (2020). *Ficha de inteligencia: Cacao*.
- Gil, J. L.-Z.-M.-E. (2021). Distribución de cadmio en suelos, hojarasca y granos de cacao: un estudio de caso de Colombia. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental*.
- Huang, H. J. (2020). Screening strains for microbial biosorption technology of cadmium. *Chemosphere*.
- Ibha Suhani, S. S. (2021). Impact of cadmium pollution on food safety and human health. *Current Opinion in Toxicology*.
- ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (Theobroma cacao L)*. Bogotá.
- ICCO. (3 de Septiembre de 2021). *Cultivo de cacao. Orígenes del cacao y su difusión por todo el mundo*. Obtenido de <https://www.icco.org/growing-cocoa/>
- Infocafes. (2013). Aprendiendo e innovando sobre la producción de plantas de cacao en vivero. Guía 3. 8-15.
- INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. (2015). *Sustancias en el ambiente que causan cáncer*. EE.UU.
- INVIMA. (2016). *PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE CADMIO EN PRODUCTO DERIVADOS DEL CACAO (LICOR DE CACAO, CHOCOLATE DE MESA, COCOA EN POLVO Y CHOCOLATINA DE DE LECHE)*. Bogotá.

- Jan Alexander, D. B. (2009). Cadmium in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal*, 139.
- Jianyou Long, M. Y.-X. (2021). Characterization of cadmium biosorption by inactive biomass of two cadmium-tolerant endophytic bacteria *Microbacterium* sp. D2-2 and *Bacillus* sp. C9-3. *Ecotoxicology*, 1419 - 1428.
- Jiménez, C. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*): una fantasía o una realidad . *Producción + limpia*.
- Kambourova, M. T. (2015). Exopolysaccharides from Prokaryotic Microorganisms—Promising Sources for White Biotechnology Processes. *Industrial Biorefineries & White Biotechnology*.
- Kim, S. R. (2015). Biosorption of cationic basic dye and cadmium by the novel biosorbent *Bacillus catenulatus* JB-022 strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Kwon, J. P. (2022). Influence of serum ferritin combined with blood cadmium concentrations on blood pressure and hypertension: From the Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Chemosphere*.
- Lee, A. N. (2018). A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 512.
- León, L. (2021). *Identificación Molecular de Levaduras Asociadas a la Fermentación de Cacao Artesanal en el departamento de Santander*.
- Lozada, S. H. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta agronómica* .
- Machuca Guevara, J. S. (2019). Molecular characterization of microorganisms during cocoa bean fermentation process (*Theobroma cacao*). *Revista peruana de biología*, 535 - 542.
- MADR. (2020). *CADENA DE CACAO. Dirección de Cadenas Agrícolas y Forestales*. Bogotá.
- Mendoza, M., & Lizarazo, P. (2021). Assessment of the fungal community associated with cocoa bean fermentation from two regions in Colombia. *Food Research International*, 110670.
- Mendoza-Salazar, M. M.-C. (2021). Bioprospecting of indigenous yeasts involved in cocoa fermentation using sensory and chemical strategies for selecting a starter inoculum. *Food Microbiology*.
- Meter A., A. R. (2019). *Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe – Análisis de la investigación y soluciones potenciales para la mitigación*. .
- Moreno, C. &. (2018). Descontaminación de arsénico, cadmio y plomo en agua por biosorción con *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 55.
- Mudiaga, P. (2021). The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate(s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3-4.
- OIRSA. (2016). *Manual de buenas prácticas agrícolas de proceso y empaque de cacao. (Theobroma cacao)*. San Salvador.

- Pérez García, P. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 199 - 205.
- Pérez-García, P. A.-C. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revisa de Especialidades Médico-Quirúrgicas* , 201-202.
- Pírez, M. &. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*.
- Priyadarshane, M. D. (2021). Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.
- Raju Maddela, N. K. (2020). Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. *Science of the Total Environment*, 137645.
- Recknagel, S. K. (2020). Development of certified reference materials for the determination of cadmium and acrylamide in cocoa. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Reyes, J. B. (2020). *Estudio de la ecología microbiana en las fermentaciones del cacao*.
- Rodarte, M. d. (2011). Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria*.
- Rodicio, M. M. (2003). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 239-240.
- Rodríguez, J. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*.
- Rodríguez-Serrano, M. M.-d.-P. (2008). Toxicidad del cadmio en Plantas. *Ecosistemas* .
- Ruth Vanderschueren, D. A. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*, 146779.
- Sala, F. G. (2010). Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. 115.
- Tesfaw, A. T. (2021). Optimization of ethanol production using newly isolated ethanogenic yeasts. *Biochemistry and Biophysics Reports*.
- Torres, G. A. (2008). Papel de las palmas espontáneas como hospederas alternas de *Phytophthora* sp., agente causal de la Pudrición del cogollo de la Palma de aceite en Colombia.
- UDES & FEDECACAO. (s.f.). *Boletín informativo. Cadmio, cacao y biorremediación*.
- Vanderschueren., R. A. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of The Total Environment*.
- Vásquez, J. R. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista colombiana de biotecnología*, 130.
- Vásquez, Z. C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*.
- Vilchez, C, R. (2021). Potenciales efectos del cambio climático sobre la distribución del hongo (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en Ecuador. 16-17.

- Visintin, S. A. (2016). Molecular identification and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. *International Journal of Food Microbiology*.
- Xie, Y. H. (2021). Cadmium biosorption and mechanism investigation using a novel *Bacillus subtilis* KC6 isolated from pyrite mine. *Journal of Cleaner Production*.
- Xu, S. X. (2020). Characterization of Cd²⁺ biosorption by *Pseudomonas* sp. strain 375, a novel biosorbent isolated from soil polluted with heavy metals in Southern China. *Chemosphere*.
- Yeoung-SangYun, K. V. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*.
- Yuan, W. C. (2019). Optimization of cadmium biosorption by *Shewanella putrefaciens* using a Box-Behnken design. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.