



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 3
CEPAS DE ESTREPTOMICETOS EN LA
ACUMULACIÓN DE CADMIO EN
PLANTAS *DE THEOBROMA CACAO L.*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
ANDREA GISELLA REVOREDO MARQUINA

LIMA-PERÚ

2018

JURADO

Presidenta: Dra. Patricia Sheen Covarrubias

Vocal: Ing. M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez

Secretario: Dr. Daniel Clark Leza

ASESOR DE TESIS

Dra. Jasmin Hurtado Custodio de Berastain

A mis padres por el apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por todo el apoyo y cariño brindado durante mis años de estudio, sin ellos esta tesis no hubiera sido una realidad.

A mis amigas por su amistad y los momentos compartidos.

A la Dra. Jasmin Hurtado por todos los conocimientos brindados y su apoyo en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Página

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	13
	2.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
	3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	14
	3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS.....	14
	3.2.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA.....	14
	3.2.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.....	15
	3.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	15

3.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO UNA PLANTA INDICADORA (<i>LACTUCA SATIVA</i>).....	17
3.4.1 PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS.....	17
3.4.2 TRATAMIENTO DE PLANTAS INDICADORAS.....	17
3.5 PRUEBA EN PLANTAS DE CACAO.....	18
3.5.1 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO.....	18
3.5.2 PREPARACIÓN DE LA TIERRA.....	19
3.5.2.1 PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TIERRA.....	19
3.5.2.2 PREPARACIÓN DE BOLSAS CON TIERRA ESTÉRIL.....	19
3.5.3 TRASPLANTE DE SEMILLAS.....	20
3.5.4 TOMA DE DATOS.....	21
3.5.5 ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	

DE ABSORCIÓN ATÓMICA.....	21
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
IV. RESULTADOS.....	23
5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	
DE LAS CEPAS.....	23
5.1.1 CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA.....	23
5.1.2 CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA.....	24
5.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	26
5.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA	
CON UNA PLANTA INDICADORA	
(<i>LACTUCA SATIVA</i>).....	27
5.4 PREPARACIÓN DE LA TIERRA.....	30
5.5 GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CACAO	
Y TRASPLANTE DE LAS SEMILLAS.....	31
5.6 TRATAMIENTO DE PLANTAS DE CACAO	
Y SU BIOMÉTRICA.....	32

5.7 EFECTO DE LAS CEPAS DE ESTREPTOMICETOS EN LA ABSORCIÓN DE CADMIO POR LAS PLANTAS.....	36
---	----

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
---------------------------------	----

VI. CONCLUSIONES.....	46
-----------------------	----

VII. RECOMENDACIONES.....	47
---------------------------	----

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
---------------------------------------	----

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Efectos del cadmio en diferentes órganos. Traducido de Godt <i>et al.</i>	4
Figura 2. Concentraciones de cadmio en almendras de cacao. Tomado de Crozier.....	7
Figura 3. Fotografía al estereoscopio a 4x de las cepas: (A) X, (B) AB5 y (C) C2	24
Figura 4. Fotografía al microscopio a 1000x de la tinción Gram de la cepa (A) C2, (B) X y (C) AB5	25
Figura 5. Longitud de las plántulas de lechuga (promedio \pm D.S) crecidas en presencia de cadmio 25 ppm+ TSB y cadmio 25 ppm + solución salina (SS)	28
Figura 6. Número de hojas en plántulas de lechuga (promedio \pm D.S) crecidas en presencia de cadmio 25 ppm + TSB y cadmio 25 ppm + solución salina (SS)	28

Figura 7. Longitud de las plántulas de lechuga (mediana y rango intercuartílico) crecidas en presencia de cadmio 50 ppm + TSB y cadmio 50 ppm + solución salina (SS)	29
Figura 8. Planta de cacao luego de germinada la semilla (A); y después del trasplante a bolsas con tierra (B)	31
Figura 9. Absorción de cadmio en plantas de cacao tratadas con la cepa de estreptomicetos X.....	36
Figura 10. Absorción de cadmio en plantas de cacao tratadas con la cepa de estreptomicetos C2.....	37
Figura 11. Diagrama del proceso de germinación en planta indicadora (Lechuga). Se muestra los tratamientos comparados para la selección de la metodología a utilizar.....	ANEXO II
Figura 12. Diagrama del proceso de germinación en planta indicadora (Lechuga). Se muestra los tratamientos con cadmio comparados para la selección de la metodología a utilizar.....	ANEXO II

Figura 13. Diagrama de las pruebas en plantas de cacao.

Se muestra los tratamientos realizados por cada concentración

de cadmio: 100 y 200 ppm.....ANEXO II

Figura 14. Diagrama de las pruebas en plantas de cacao.

Se muestra los controles realizados en el estudio: control con

solución de cadmio 100 y 200 ppm, y control de cada cepa.....ANEXO II

Figura 15. Fotografías de las plantas a los 3 meses para la

cepa C2.....ANEXO V

Figura 16. Fotografías de las plantas a los 3 meses para la

cepa X.....ANEXO V

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características morfológicas de las cepas en medio glucosa extracto de levadura.....	23
Tabla 2. Resultados de la tinción Gram.....	25
Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas. +: positivo, -: negativo, k/k: no fermenta glucosa, ni lactosa ni ácido sulfhídrico; los resultados de la prueba SIM están en el siguiente orden: sulfuro, indol, motilidad).....	27
Tabla 4. Promedio del número de UFC/g de suelo desde la primera hasta la tercera esterilización.....	30
Tabla 5. Medianas y rango intercuartílicos para todos los tratamientos de los siguientes parámetros: longitud de la planta, número de hojas, grosor del tallo, longitud y peso de la raíz. Resultados solo para las cepas X y C2.....	33

Tabla 6. Valores de p para las respectivas comparaciones entre
tratamientos para los siguientes parámetros: longitud de la planta,
número de hojas, grosor del tallo, longitud y peso de la raíz.
Resultados solo para las cepas X y C2.....34

Tabla 7. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de
hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa X.....ANEXO III

Tabla 8. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo, peso.....ANEXO III
y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas con la cepa X.....ANEXO III

Tabla 9. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de
hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa C2.....ANEXO III

Tabla 10. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo,
peso y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas
con la cepa C2.....ANEXO III

Tabla 11. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de
hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa AB5.....ANEXO III

Tabla 12. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo, peso
y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas con la cepa AB5.....ANEXO III

Tabla 13. Promedio del número de UFC/g de suelo desde la
primera hasta la tercera esterilización para todas las diluciones.....ANEXO III

Tabla 14. Promedio y la desviación estándar de la longitud
de las plántulas de lechuga y el número de hojas para todos
los tratamientos con cadmio 25 ppm.....ANEXO III

Tabla 15. Mediana y el rango intercuartílico de la longitud
de las plántulas de lechuga y el número de hojas para
todos los tratamientos con cadmio 50 ppm.....ANEXO III

RESUMEN

El Perú es un país productor de cacao por excelencia y actualmente afronta un grave problema, la presencia de cadmio en suelos que lleva a su acumulación en las semillas de cacao. Este trabajo tiene como objetivo determinar el potencial biorremediador de 3 cepas de *Streptomyces*: las cepas AB5 y X de *Streptomyces variabilis* y la cepa C2 de *Streptomyces sp.*, en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando dos concentraciones de cadmio: 100 y 200 ppm. Se analizaron estas variables: longitud de la planta y número de hojas a los 26 días, 1 mes y 2 semanas, 2 y 3 meses. Además se midió a los 3 meses el tamaño de la raíz, el grosor del tallo, tamaño de la hoja y se estimó el estado nutricional de la planta a través del color de las hojas. Por último, se cuantificó el cadmio absorbido por la planta de cacao y se determinó la efectividad de las cepas en impedir la absorción de cadmio. Un ensayo preliminar con plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) determinó que las cepas de *Streptomyces* debían lavarse antes de ser inoculadas para evitar la influencia del medio de cultivo de las bacterias en el crecimiento de las plantas. Los ensayos con plantas de cacao mostraron que bajo el modelo experimental utilizado la exposición al cadmio disminuye la longitud de la planta y de la raíz, y que la cepa C2 posee un potencial biorremediador, al reducir la absorción de cadmio en un 76.47% en el tratamiento con 100 ppm ($p=0.046$) y en un 31.51% con concentraciones de 200 ppm ($p=0.0059$). Las cepas X y AB5 no demostraron tener potencial biorremediador.

Palabras clave: cacao, biorremediación, cadmio, actinomicetos

ABSTRACT

Peru is a cacao producer country by excellence and is facing a major problem now a day, the presence of cadmium in the soil that carries its accumulation in the fruit. The main goal in this project is to determine the potential biorremediatory activity of 3 *Streptomyces* strains : the AB5 and X strains from *Streptomyces variabilis* (AB5 y X) and the C2 strain from *Streptomyces sp.* in *Thebroma Cacao* L. (cacao) plants using two cadmium concentrations: 100 and 200 ppm. Variables analyzed: plant's length and number of leafs in 26 days, 1 month and 2 weeks, 2 and 3 months. Also at 3 months the root size, weight and stem width were measured and nutritional state of the plant through leaf color was measured too. By last cadmium absorbed by the cacao plant was quantified and effectiveness of the strains to impede cadmium absorption was determined. A preliminary exam with lettuce plants (*Lactuca sativa*) determined that the *Streptomyces* strain must be washed before being inoculated to avoid the influence of the culture medium of the bacteria in the growth of cacao plants. The essays carried out with cacao plants showed that with the used experimental model the cadmium exposure decreases the length of the plant and the root and that the C2 strain was the one with potential bioremediatory activity, it reduced the cadmium absorption in 76.47% with the Cd 100 ppm treatment ($p=0.046$) and it reduced the absorption in 31.51% with the Cd 200 ppm treatment ($p=0.0059$). The X and AB5 strains didn't show any potential bioremediatory activity.

Key words: cacao, bioremediation, cadmium, actinomycetes.

I. INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L. (cacao) (Theobroma: del griego “alimento de los dioses”) es una especie vegetal descrita por Linneo en 1758. Su origen es amazónico, pero fue cultivada en América central por los Mayas. El nombre “cacao” deriva del Nahuatl “kakahua-tl”, una macrolengua mexicana muy antigua. En la antigüedad el cacao era utilizado en bebidas, comidas, en ungüentos y medicinas; además, se utilizaba en rituales religiosos y tenía un gran valor económico (1).

El cacao es una especie de la familia Malvaceae, subfamilia Sterculioideae, y su árbol semicaducifolio llega a los 12 metros de altura (2). Crece principalmente en el bosque tropical húmedo, requiriendo temperaturas altas que van desde los 20°C a los 30°C, alta humedad y protección de la luz solar directa para un óptimo crecimiento. No tolera periodos cortos de sequía ya que serían totalmente perjudiciales para la planta (3,4). El cacao puede crecer en cualquier tipo de suelo, pero de preferencia en suelos entre arcillosos y arenosos que le permitan a la planta almacenar agua. El cacao crece a un pH que puede variar entre 5 y 7.5; sin embargo, pueden sobrevivir en suelos más ácidos si estos son ricos en nutrientes (2). La planta produce sus frutos y flores directamente del tronco y la cantidad de semillas en el fruto depende de la variedad, pero puede alcanzar hasta 40 semillas por fruto. Los principales subproductos del cacao son el licor de cacao, la manteca de cacao, el cacao en polvo y el chocolate. El tejido utilizado para la producción de chocolate es el cotiledón, en donde se acumulan antocianinas (como

leucoantocianinas L1, L2, L3 y L4), grasas, alcaloides (como teobromina , cafeína y teofilina) y proteínas (como albuminas y globulinas)(5,6).

Existen 3 cultivares diferentes de cacao en el mundo: Criollo, Forastero y Trinitario. Para esta tesis se empleó el cultivar Forastero, que se caracteriza por poseer un fruto verde, mucilago grueso y semillas redondeadas. Este cultivar comprende el 80% de la producción mundial y es de alto interés comercial (2).

En nuestro país el cacao se cultiva en 12 0374 hectáreas distribuidas en varias regiones como Cusco , Piura , San Martín, entre otras (7). Según el MINAG el 44% del cacao cultivado en nuestro país pertenece al cultivar *Criollo* y el 56% al cultivar *Forastero* que incluye el híbrido CCN-51(8). El cacao que se extrae no es solo para consumo interno, sino que también se exporta a los principales países de Europa y América, consumidores de este producto. Por ello es obligatorio cumplir con las más altas exigencias de calidad. Según la OMS y la FAO, el nivel máximo de cadmio permitido en un chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50% es de 0.6 ppm, y en un chocolate con un contenido >50% es de 2 ppm (9). Sin embargo, el más grave problema que afronta la exportación de semillas de cacao a Europa es la nueva regulación de la cantidad máxima de cadmio permitida, que tendrá vigencia a partir de enero del 2019. Según el Reglamento de la Comisión de la comunidad europea N° 188/2006, los niveles máximos permitidos para chocolates con un contenido de cacao >50% serán de 0.8 ppm; para chocolates con un contenido del 30-50% serán de 0.3 mg/kg; y para chocolates con leche con un contenido <30% serán de 0.1 ppm (10).

El cadmio es considerado un metal pesado debido a su alta densidad. Se encuentra acumulado de manera natural y por actividades antropogénicas en la corteza terrestre (11,12). Se sabe que una forma de contaminar el suelo con cadmio es utilizando lodo que se forma de las aguas residuales y empleándolo como fertilizante (13). Otras formas de contaminación ocurren por vía aérea (cadmio en el aire que cae al suelo), por fertilizadores y pesticidas que contienen cadmio y por riego con aguas contaminadas. Además, los residuos contaminados de mineras, industrias y metalúrgicas que son desechados en los suelos son también una fuente de contaminación (14). Existen 2 formas por las cuales se puede medir el cadmio: primero, como cadmio total, el cual es el recuento del cadmio en una muestra sin tomar en cuenta el estado en que se encuentra; segundo, como cadmio soluble, que es aquel que puede ser disuelto en agua o en cualquier otro solvente.

La bioacumulación se define como la toma, almacenamiento y acumulación gradual de sustancias como metales pesados en un organismo en un tiempo determinado. Esta acumulación se da cuando el organismo es incapaz de excretar o metabolizar esta sustancia a una velocidad mayor que aquella a la que es absorbida. Si la sustancia es tóxica y su vida media biológica es prolongada, puede producir daños severos en el organismo sin necesidad de que se encuentre niveles elevados de esta en el medio ambiente.

En el ser humano, el cadmio se absorbe a nivel gastrointestinal, pulmonar y dérmico; cuando llega a la sangre, es transportado por proteínas como la albúmina. El primer órgano que se ve afectado luego de que el cadmio llega a la sangre es el hígado. Se le atribuye al cadmio la generación de problemas en el aparato respiratorio, en los riñones, en el aparato reproductivo y en el sistema esquelético (Fig.1)(15).

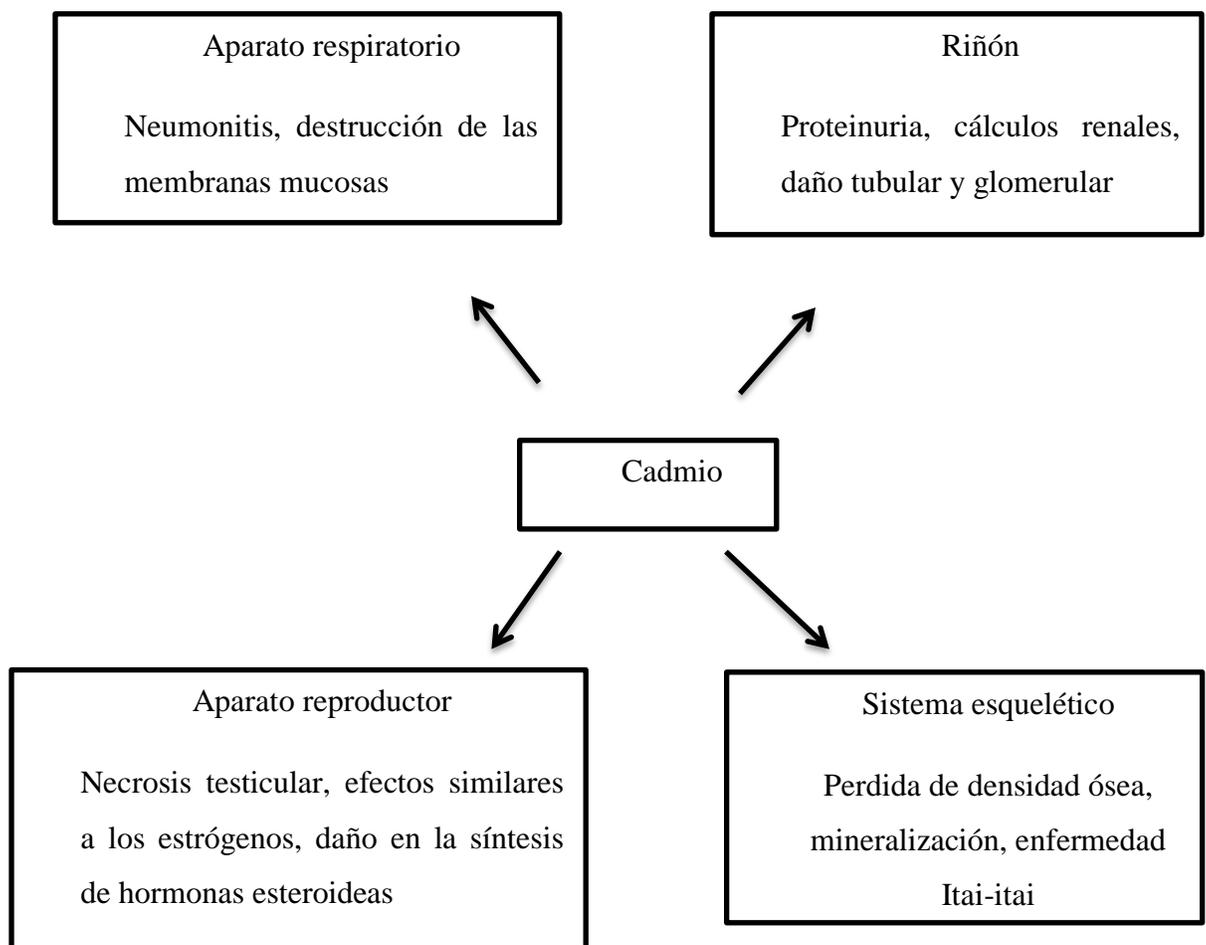


Figura 1. Efectos del cadmio en diferentes órganos. Traducido de Godt *et al.*

(15)

La enfermedad de Itai-Itai se produce por ingerir alimentos contaminados con cadmio por un periodo prolongado de tiempo y se ha descrito en Toyama, Japón, como consecuencia del consumo de arroz con alto contenido de cadmio. Las personas que sufren esta enfermedad presentan lesiones en los huesos en forma de osteoporosis y osteomalacia, así como daño renal con una disfunción tubular y glomerular. Con el tiempo el paciente se ve impedido de caminar y sufre fracturas con mucha facilidad debido a una fragilidad ósea. El estudio determinó que la enfermedad se manifestaba de forma leve cuando la cantidad de cadmio consumida a lo largo de la vida de estos pacientes había sido de 3.1 g, y de forma severa cuando fue de 3.8 g (16).

En el caso de las plantas, estas pueden absorber y acumular metales pesados que se encuentran biodisponibles en el suelo. Por ejemplo, los iones de cadmio pueden ser absorbidos directamente por la planta. Los mecanismos más utilizados para tomar metales pesados son los siguientes: intercambio iónico que se da entre los cationes intercambiables en el substrato y las raíces, reacciones redox que permiten solubilizar los metales pesados para luego tomarlos, y precipitación-disolución que depende de la solubilidad del elemento en relación a las reacciones químicas en el suelo. Existen factores que afectan la solubilidad de algunos elementos en el suelo como el pH, el contenido de materia orgánica, la temperatura, la humedad, la presencia de minerales y el potencial redox (17–20).

Según lo mencionado anteriormente, se sabe que las plantas pueden fácilmente absorber el cadmio y otros metales pesados, lo que genera un riesgo para la salud cuando estas son destinadas al consumo humano (11). Los niveles permitidos en hojas son de 0.05-0.5 ppm, y en almendras de 0.5 ppm, según el comité de la FAO-OMS (21).

En un estudio realizado por Chávez en el 2015, se colectó frutos de cacao de 19 plantaciones en Ecuador que tenían 4 meses de maduración. Se determinó que almendras de 12 de las 19 plantaciones presentaban concentraciones de cadmio mayores que 0.6 ppm (22). En el Perú, las plantas de cacao de algunas zonas de Tingo María han presentado niveles promedio de cadmio mayores que los permitidos en hojas (2.84 ppm) y almendras (1.55 ppm)(23). Por otra parte, en un estudio realizado por Crozier (24) se tomó 10 muestras de suelo de 10 sembríos diferentes en las principales zonas de producción de cacao: Piura, Tumbes, Cajamarca, San Martín, Huánuco, Ayacucho y Cusco. Se observó que las concentraciones más altas de cadmio se dieron en la zona norte y centro con 0.8 y 0.7 ppm, respectivamente, y que el cadmio total era mayor en las capas superficiales del suelo. Adicionalmente, se tomaron muestras de frutos de cacao (Fig.2). Las más altas concentraciones provienen de las almendras de la zona norte y centro del Perú, con 0.7 y 0.65 ppm, respectivamente. De los resultados presentados se desprende que existe una equivalencia entre las concentraciones de cadmio en suelo y en la planta ya que suelen ser similares. Se demostró también que no existen diferencias entre las almendras frescas, y las fermentadas y luego

secadas al sol. Tampoco hubo diferencias entre las almendras con mucilago y sin este. En otro estudio realizado en varias zonas de importancia cacaotera en el Perú, se determinó que, en la zona de Morropón en Piura, existen niveles de cadmio en suelo mayores que los permitidos por la Agencia del Medio Ambiente de los Estados Unidos en plantaciones que tienen de 10 a 15 años de edad; se encontró niveles de 0.53 ± 0.02 ppm cuando lo permitido es de 0.43 ppm (25). Por último, en las regiones Huánuco y Ucayali se reportaron valores promedio de cadmio de 0.53 y 0.21 ppm en suelos y hojas de cacao, respectivamente. Este estudio se llevó a cabo en plantaciones de 7 años de edad (26).

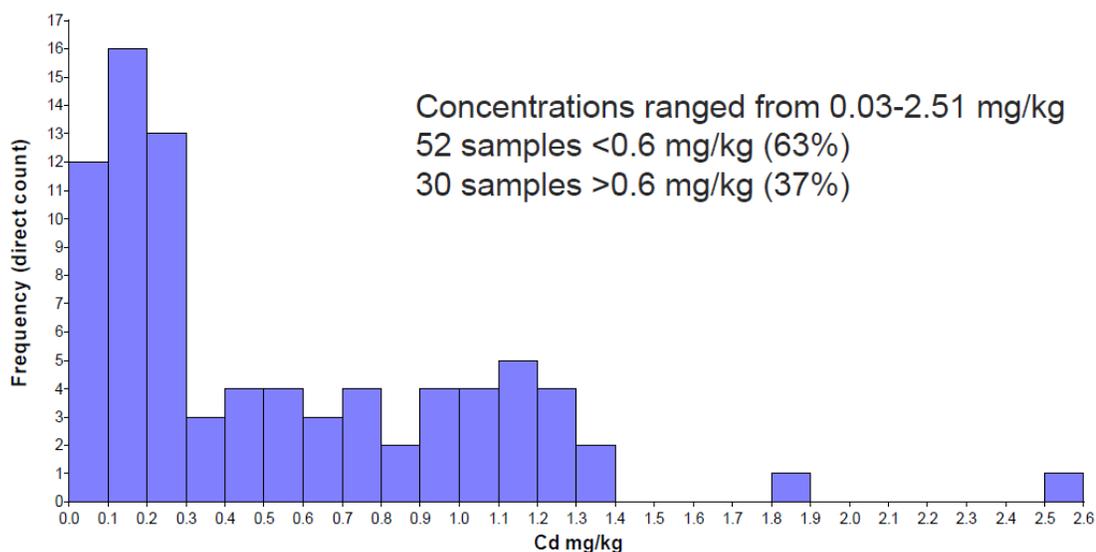


Figura 2. Concentraciones de cadmio en almendras de cacao. Tomado de Crozier (24).

Con respecto a los efectos del cadmio en la morfología de las plantas de cacao, se ha encontrado deformaciones en los cloroplastos, condensación de la cromatina

nuclear y reducción del grosor del mesófilo en la hoja a concentraciones de 8 y 32 ppm. Se encontraron también cambios en la absorción de nutrientes. Por ejemplo, se observó una diferencia en el contenido de Fe en las raíces en función al aumento de cadmio y a la constitución genética de las plantas. La progenie del cruce de variedades CCN-10 x SCA-6 disminuyó el contenido de Fe en un 90%, mientras que la progenie del cruce *Catongo x Catongo* disminuyó el contenido en un 78% (27).

En otras especies de importancia agrícola, el cadmio también puede acumularse y alterar el metabolismo y crecimiento de las plantas. En el maíz, por ejemplo, el cadmio se acumula en gran cantidad en las semillas (25 ppm). Además, hay un aumento de la actividad antioxidante en respuesta a la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), la que se produce debido al estrés provocado por el cadmio en el suelo (28). En plantas de lechuga, la tasa de asimilación de CO₂ neta se ve limitada cuando estas son expuestas a altas concentraciones de nitrato de cadmio (10 y 50 μM). De hecho se observó una reducción del 76% en el peso seco de las plantas con el tratamiento de cadmio 50 μM (29). Asimismo, se ha reportado una gran toxicidad del cadmio en otras plantas como *Arachis hypogaea* L. (maní) y *Solanum lycopersicum* (tomate) (30,31).

La biorremediación es una técnica que utiliza organismos para neutralizar o disminuir el efecto negativo de sustancias contaminantes en el medio. Esta técnica se puede realizar *in situ*, utilizando un proceso denominado bioaumentación, que

consiste en añadir microorganismos para acelerar procesos de degradación de contaminantes. Se puede añadir microorganismos de una sola especie o varias. En la biorremediación se utilizan principalmente plantas, microorganismos y hongos. Cuando se utilizan microorganismos hay algunos factores que pueden alterar el desempeño de estos, como el tipo de suelo, el pH, la temperatura, los nutrientes, el oxígeno y la disponibilidad de los contaminantes para los microorganismos. Entre las ventajas de la biorremediación destaca el hecho de que se realiza de manera natural y no involucra el uso de otras sustancias tóxicas o de químicos perjudiciales, abarca una gran cantidad de contaminantes a los que convierte en sustancias inofensivas para la salud, y es económica, por lo que resulta una técnica comúnmente aceptada (32).

Se han realizado estudios para neutralizar la contaminación de cadmio en suelos y evitar su absorción por las plantas de cacao utilizando vermicompost. El experimento se realizó en Ecuador tomando muestras de suelo de parcelas a las que se añadió cadmio a una concentración de 5 ppm y que se incubaron con vermicompost por 28 días. A los 14 días el tratamiento logró reducir el cadmio soluble e intercambiable en un 92% (22). Existen otros estudios en los que también se ha utilizado microorganismos, específicamente de la especie *Rhizophagus irregularis*, como posibles remediadores. Estos microorganismos disminuyeron de 2 a 3 veces la eficiencia de fitoextracción (habilidad de la raíz para transportar cadmio a la parte aérea) en las plantas de cacao luego de 4 meses de crecimiento en suelos con concentraciones de cadmio de 12 y 24 ppm (33).

Los estreptomicetos (antiguamente denominados actinomicetos)(34–36) pertenecen al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Streptomycetales (37–39). Son bacterias gram positivas aeróbicas que crecen en forma de hifas filamentosas que producen esporas para una reproducción asexual. Los metabolitos secundarios que producen son utilizados como antibióticos y drogas para tratar varias enfermedades. Estos metabolitos se producen cuando los actinomicetos forman el micelio aéreo que se esparce por toda la superficie del sustrato (34,40). Los estreptomicetos crecen a temperaturas entre 25°C y 30°C en la incubadora y tardan de 7 a 14 días en producir colonias visibles. Las colonias pueden ser luego repicadas en otro medio ya que han producido las suficientes esporas para reproducirse satisfactoriamente (41). Estas bacterias son también utilizadas para producir enzimas debido a su bajo costo, gran rendimiento y su facilidad para ser manipuladas genéticamente. Las enzimas se utilizan en biología molecular, terapias médicas, procesamiento de comida e industrias farmacéuticas y textiles (42). En estudios recientes se ha visto la capacidad de algunos estreptomicetos de producir melanina a 30°C que puede ser luego utilizada como un antimicrobiano contra microorganismos específicos (43). Además, se ha visto que algunos estreptomicetos aislados de ambientes templados y tropicales alrededor del mundo pueden producir ramoplanina, un potente antibiótico contra patógenos multi-drogo resistentes (44).

Las bacterias del género *Streptomyces*, pertenecientes a la familia Streptomycetaceae, se encuentran en su mayoría en el suelo. Presentan características idóneas que le permiten crecer en este ambiente, entre otras la producción de metabolitos secundarios y el crecimiento en forma de hifas (41). Estas bacterias son capaces de introducirse y adherirse a restos orgánicos insolubles de plantas, hongos y otros microorganismos para luego aprovechar sus nutrientes haciendo uso de exoenzimas hidrolíticas (46).

Para hacerle frente al estrés que ocasionan los metales pesados en el ambiente, *Streptomyces* ha desarrollado mecanismos como la excreción de moléculas quelantes o la unión de estos metales a la pared extracelular, entre otros (45,47,48). En el caso del cadmio, se sabe que algunas cepas de *Streptomyces* son capaces de absorberlo o adsorberlo (49). Por estas cualidades se propone el uso de estos microorganismos como una alternativa económica y de fácil aplicación contra la contaminación de los cultivos de cacao por metales pesados. Si bien al hacer uso de estos microorganismos podrían no verse alterados los géneros naturalmente encontrados en el suelo, ya que se sabe que al menos el 20% de la población bacteriana del suelo está compuesta por *Streptomyces* (45), no puede descartarse del todo la posible competencia de estas cepas introducidas con los microorganismos nativos del suelo.

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se emplearon las cepas AB5 y X de *Streptomyces variabilis* (48, 49), y C2 de *Streptomyces sp.* (52). Se

midió la capacidad biofertilizante de estas cepas en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) expuestas a diferentes concentraciones de metales pesados, y en particular a cadmio. La cepa C2 permitió obtener un promedio de 4.5 ± 0.01 cm de longitud en las raíces, la cepa X un promedio de 3.93 ± 0.03 cm y la AB5 3.84 ± 0.02 cm (53).

Debido a las exigencias crecientes del mercado internacional del cacao en materia sanitaria, y en particular en las referidas a los límites máximos tolerables de cadmio, se hace necesaria una solución a la contaminación de suelos por este metal pesado para evitar el cierre del mercado a los productos a base de cacao y que se afecte el futuro de los agricultores y las empresas peruanas que lo cultivan y producen.

En tal sentido, el presente estudio piloto explora soluciones potenciales al problema de la acumulación del cadmio en el cacao por contaminación de las áreas cultivadas empleando las mismas cepas del género *Streptomyces*, las que han demostrado tener actividad quelante de metales pesados (53) y un modelo experimental de corto plazo. El estudio busca sentar las bases para investigaciones posteriores que deberán realizarse *in situ* para medir la efectividad de las cepas en campo.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Explorar el potencial biorremediador de 3 cepas de estreptomicetos contra la acumulación de cadmio por plantas de *Theobroma cacao* L.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir una metodología de preparación del inóculo bacteriano en experimentos preliminares con plantas de *Lactuca sativa*.
- Determinar el efecto del cadmio en la biométrica de las plantas de *Theobroma cacao* L. bajo las condiciones experimentales aplicadas.
- Cuantificar el efecto de las cepas estudiadas en la absorción de cadmio por la planta de *Theobroma cacao* L. bajo las condiciones experimentales aplicadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizó el cultivo de 3 cepas diferentes de estreptomicetos: AB5, X y C2. Todas las cepas fueron aisladas en trabajos previos [C2 (52); AB5 (50); X (51)] y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las cepas se inocularon en tubos Falcon con 4 mL de caldo tripteina soya (TSB) 1/10 y se incubaron en una estufa a 28°C por 7 días hasta que se observó esporulación.

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS

4.2.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

La siembra de las 3 cepas de estreptomicetos se realizó por el método de agotamiento en placas con medio Agar Glicerol Extracto de Levadura (X GAL) (54) en una estufa a 28°C por 7 días. Luego las placas se observaron al estereoscopio para reconocer las estructuras macroscópicas características de cada cepa y verificar las observaciones con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (35).

4.2.2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Se utilizó la tinción Gram para determinar si las cepas en estudio eran Gram positivas o negativas. Se observó la coloración Gram y las estructuras microscópicas características de cada cepa mediante un microscopio óptico. Los resultados fueron comparados con el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (35).

4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para evaluar las características metabólicas de las cepas en estudio.

- Rojo de metilo: Permite determinar la presencia de ácidos producidos por la fermentación de carbohidratos. Cambia al color amarillo de encontrarse elementos básicos.
- Voges – Proskauer: Permite detectar la presencia de acetoina. Para esto se añade alfa-naftol e hidróxido de potasio al caldo bacteriano. Color rojo indica un resultado positivo.
- Agar hierro triple azúcar (TSI): Esta prueba permite diferenciar bacterias que fermentan glucosa, lactosa o sacarosa, o que producen ácido sulfhídrico y gas. Si fermentan glucosa, el medio se volverá amarillo en el fondo; si fermenta sacarosa o lactosa, el medio se volverá amarillo en la

superficie; si produce ácido sulfhídrico el tubo se tornara negro; y si produce gas, habrá un desplazamiento del agar.

- Sulfuro, indol, motilidad (SIM): En esta prueba se verifica la producción de indol con el reactivo de Kovacs, que vuelve negro el medio. Se verifica la movilidad produciendo turbidez fuera de la línea de siembra. La producción de sulfuro se verifica con el ennegrecimiento del medio.
- Urea: Sirve para verificar la actividad ureásica. Un resultado positivo se evidencia con un color rojo-amarillo.
- Citrato: Se mide la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono y energía. Un resultado positivo se evidencia con un color azul.
- Lisina hierro agar (Lia): Se mide la capacidad de descarboxilar/desaminizar la lisina y producir ácido sulfhídrico. Se considera un resultado positivo el color morado en el tubo.
- Agar almidón: Se mide la capacidad de las bacterias para hidrolizar almidón para su asimilación. Se agrega una solución de lugol a la placa, y si se observa un halo alrededor de las colonias se considera un resultado positivo.
- Catalasa: Se determina la presencia de catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno utilizado en la prueba. Se evidencia un resultado positivo con la formación de burbujas.

4.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA UTILIZANDO UNA PLANTA INDICADORA (*Lactuca sativa*)

4.4.1. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE LAS SEMILLAS

Se utilizó semillas de *Lactuca sativa* (lechuga) marca Hortus previamente desinfectadas, primero en alcohol al 96% por 5 minutos, seguido de lejía comercial por 5 minutos y 3 enjuagues con agua destilada estéril por 5 minutos cada uno (55,56).

4.4.2. TRATAMIENTO DE PLANTAS INDICADORAS

Se colocaron 10 semillas en una placa estéril con un papel filtro en su interior (53,57). Después de colocar las semillas, se agregó al papel filtro 8 mL de una solución de incubación con distintas composiciones (ANEXO II, Fig. 11). Debido a que el TSB es un medio rico en nutrientes, se compararon dos procedimientos en 2 grupos distintos: (1) plantas expuestas solo al cadmio; y (2) plantas expuestas al cadmio y a la cepa de estreptomiceto C2. Con ello se buscó determinar si dicho medio influía en el crecimiento de las plántulas en presencia de cadmio.

Los 2 tratamientos en plantas expuestas solo al cadmio consistieron en agregar a la solución de incubación en placa 4 mL de una solución de 50 ó 100 ppm (concentración final en placa de 25 y 50 ppm), de acuerdo a concentraciones establecidas en un trabajo anterior de este laboratorio, y 4 mL de caldo TSB ó 4 mL de solución salina (SS) (53).

En plantas expuestas al cadmio y a la cepa de estreptomiceto C2 se utilizaron también 2 tratamientos: en el primero se utilizaron 4 mL de cultivo de la cepa C2 en caldo TSB, los que fueron centrifugados por 5 min a 2500 rpm y lavados con solución salina 3 veces antes de su incorporación como una suspensión bacteriana en 4 mL de solución salina a la solución de incubación en placa; mientras que en el segundo, se utilizó la cepa sin lavar y se realizó una incubación previa de las semillas con la cepa C2 por 40 minutos en 250 mL de caldo TSB. Para ambos tratamientos, las bacterias de la cepa C2 fueron incubadas a 28°C por 7 días antes de ser utilizadas. Tanto los tratamientos en plantas expuestas solo al cadmio como aquellos en plantas expuestas al cadmio y a la cepa de estreptomiceto C2 se realizaron por triplicado y las placas se mantuvieron en un lugar abierto por 3 semanas (53) (ANEXO II , Fig. 11 y 12). Transcurrido este tiempo, se midió la longitud de las plántulas desde la raíz hasta la yema apical y se registró el número total de hojas (53).

4.5.PRUEBA EN PLANTAS DE CACAO

4.5.1. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE CACAO

Se colectaron las semillas del fruto del cacao obtenido en el Mercado N°1 de Surquillo, se les retiró el mucilago con viruta de madera, y se desinfectaron, primero con alcohol al 96% por 5 minutos, seguido de lejía comercial por 5

minutos y 3 enjuagues con agua destilada estéril por 5 minutos cada vez (55,56). Las semillas que se utilizaron para los tratamientos con cadmio y los controles de las cepas se inocularon en 250 mL de caldo TSB con la cepa correspondiente por 40 minutos (57). Previamente se realizó el cultivo de la cepa en caldo TSB a 28°C por 14 días. Luego de este paso, las semillas inoculadas y las no inoculadas se colocaron en vasos de plástico con un algodón húmedo y se dejaron germinar en oscuridad por 20 días.

4.5.2. PREPARACIÓN DE LA TIERRA

4.5.2.1. PROCESO DE ESTERILIZACIÓN DE TIERRA

Para determinar un número de esterilizaciones que garantice una carga microbiana baja en la tierra, se esterilizó la tierra una primera vez y se realizó un conteo de microorganismos luego de 5 días (58). El proceso se repitió hasta obtener un conteo menor que 100 UFC/g de tierra.

4.5.2.2. PREPARACIÓN DE BOLSAS CON TIERRA ESTÉRIL

Se pesó 820 g de tierra preparada marca 4 Estaciones en bolsas de polipropileno para luego esterilizarlas en un autoclave por 40 minutos a 15 libras de presión y 121°C. Se esterilizó la tierra 3 veces en intervalos

de 3 días entre cada esterilización, de acuerdo a lo determinado en la prueba descrita en la sección anterior.

4.5.3. TRASPLANTE DE SEMILLAS GERMINADAS Y TRATAMIENTO

Luego de la germinación de las semillas por 20 días, se procedió a trasplantarlas a las bolsas con tierra preparada estéril de modo que hubiese 4 plantas por cada tratamiento y por cada control (59). Para esto se retiraron las semillas de los vasos en donde germinaron y se colocaron dentro de la bolsa con 820 g de tierra. Los tratamientos fueron los siguientes: tratamiento con soluciones de cadmio 100 y 200 ppm, las que se prepararon disolviendo 0.133 g y 0.268 g de cloruro de cadmio en 50 mL de agua, respectivamente (Ver Anexo IV). Para cada concentración de cadmio se agregó 4 mL de cultivo de la cepa lavada y suspendida en 4 mL de solución salina (53). Los controles fueron los siguientes: controles de cadmio 100 y 200 ppm (53), a los que se agregó 4 mL de solución salina; y controles de cada cepa, agregando solo 4 mL de cultivo lavado y suspendido en solución salina (53). A estos 2 tipos de control se sumó un control general de plantas no expuestas a cadmio ni a las cepas (control agua). (ANEXO II, Fig. 13 y 14).

Las bolsas con las semillas germinadas se colocaron sobre bandejas en un espacio abierto y se instaló encima una cubierta para darles las condiciones necesarias de sombra. Se regó las plantas con agua cada 2 ó 3 días,

dependiendo del clima. La aplicación de cadmio y de las cepas se realizó una sola vez luego del trasplante de las semillas germinadas a las bolsas con tierra estéril.

4.5.4. TOMA DE DATOS

Se colectaron datos de la longitud de la planta, desde la base hasta la yema apical, y el número de hojas a los 26 días, 1 mes y 2 semanas, 2 meses y 3 meses. Adicionalmente, se midió el grosor del tallo en la base, el tamaño de las hojas desde la base hasta el ápice y la longitud y peso de la raíz a los 3 meses. Se revisó el estado nutricional de la planta observando el color de las hojas a los 3 meses.

4.5.5. ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Luego de 3 meses de crecimiento, se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica la acumulación de cadmio en las plantas de los controles expuestos solo a las soluciones de cadmio 100 y 200 ppm, y en las plantas correspondientes a los tratamientos con las soluciones de cadmio 100 y 200 ppm más las cepas X y C2. Para el análisis se utilizó la sección de la planta que va del cuello hasta las hojas. Estas pruebas se realizaron en el laboratorio de análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes de la Universidad Nacional

Agraria La Molina. La absorción de cadmio por parte de las plantas se midió en ppm (mg/kg de planta seca).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos colectados se analizaron utilizando el programa estadístico STATA V.12 para Windows (StataCorp LLC, Houston, TX). Para determinar si existió una diferencia entre el uso de las cepas lavadas y las cepas sin lavar, se realizó la prueba de ANOVA con las plantas de lechuga sometidas al tratamiento con la solución de cadmio 25 ppm, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba post-hoc de Bonferroni. En el caso de las plantas de lechuga sometidas al tratamiento con la solución de cadmio 50 ppm, el análisis se realizó utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, y para las comparaciones múltiples la prueba post-hoc de Dunnet. Se utilizó esta misma aproximación para comparar la longitud de las plantas, el número de hojas, tamaño de las hojas, grosor del tallo, peso y longitud de la raíz, en los especímenes de los distintos grupos considerados en este trabajo. También se utilizó esta prueba para determinar si existía una diferencia significativa entre la absorción de cadmio de las plantas expuestas al cadmio e inoculadas con las cepas y los controles expuestos solo al cadmio. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significación (α) de 0.05.

IV. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS

5.1.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA

En la Tabla 1 se indican las principales características macroscópicas de cada cepa. La Fig. 3 muestra la fotografía de las cepas al estereoscopio con un aumento de 4X.

Tabla 1. Características morfológicas de las cepas en medio glucosa extracto de levadura.

Cepa	Pigmentación	Tamaño	Exudado	Borde	Superficie	Consistencia
X	Grisácea	0.4 cm	Si	Irregular	Porosa	Secas
AB5	Grisácea	0.5 cm	Si	Irregular	Cóncava	Secas
C2	Grisácea	0.3 cm	Si	Irregular	Rugosa	Secas

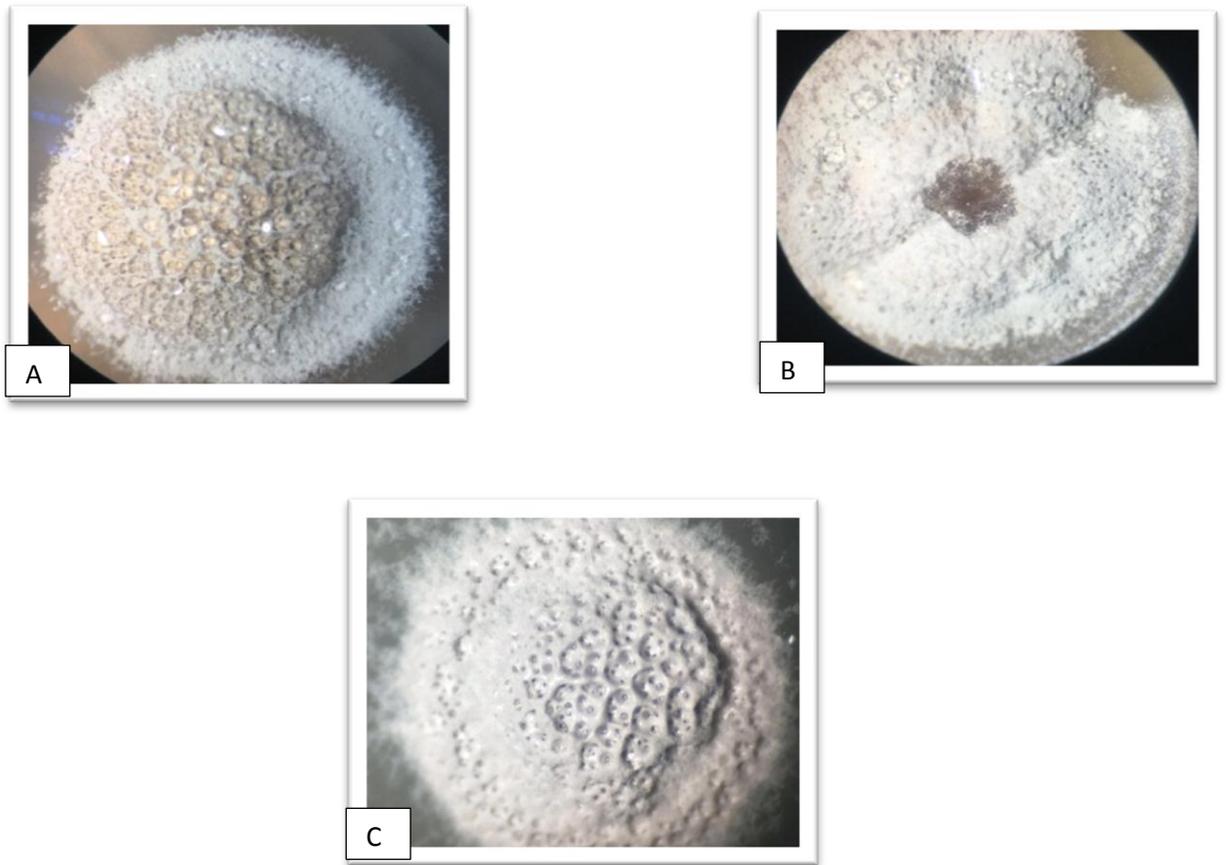


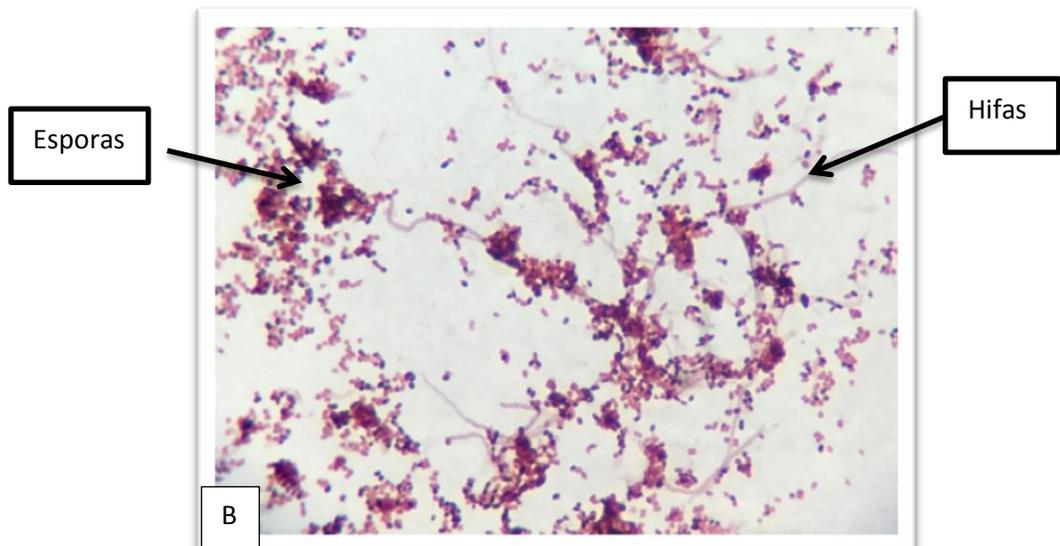
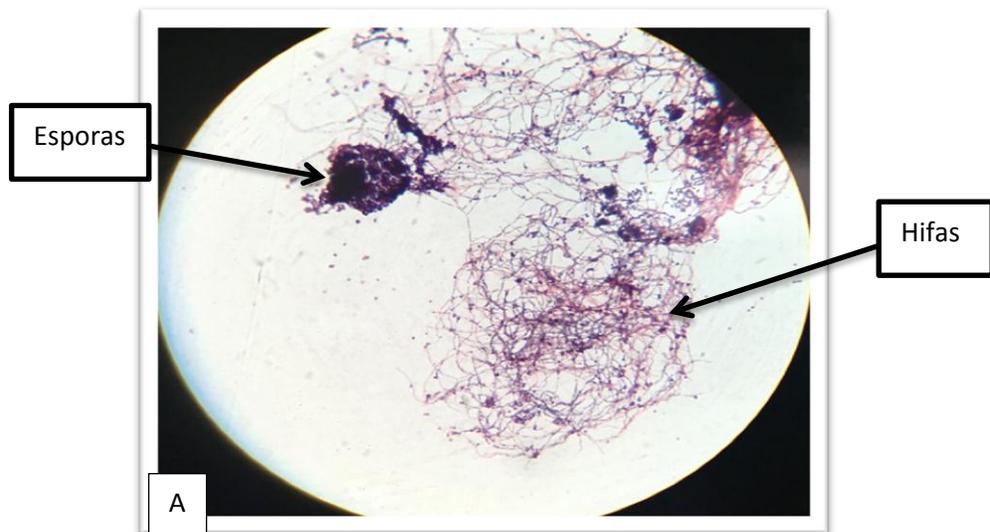
Figura 3. Fotografía al estereoscopio a 4x de las cepas: (A) X, (B) AB5 y (C) C2.

5.1.2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA

Como se observa en la Tabla 2, todas las cepas mostraron una tinción Gram positiva, que es una característica del género *Streptomyces*. Además, se muestra en la Fig. 4 las fotografías al microscopio de dicha tinción, en donde se observan las estructuras características de este género como son las hifas y las esporas. Se pudo reconocer estas estructuras para cada una de las cepas.

Tabla 2. Resultados de la tinción Gram.

Cepa	Resultado
X	Gram +
AB5	Gram +
C2	Gram +



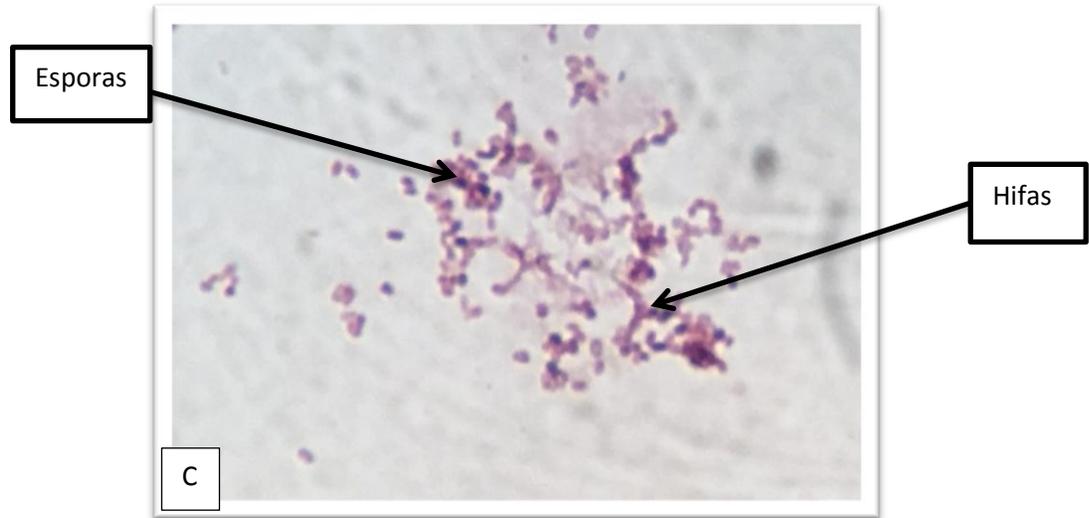


Figura 4. Fotografía al microscopio a 1000x de la tinción Gram de la cepa (A) C2, (B) X y (C) AB5.

5.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas. Estos resultados se compararon con los datos del Manual de determinación bacteriológica de Bergey.

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas. +: positivo, -: negativo, k/k: no fermenta glucosa, ni lactosa ni ácido sulfhídrico; los resultados de la prueba SIM están en el siguiente orden: sulfuro, indol, motilidad)

Cepas	Rojo de metilo	Voges-Proskauer	TSI	SIM	Urea	Citrato	Lia	Agar almidón	Catalasa
X	-	+	k/k	-/-/-	-	-	+	++	+
AB5	-	+	k/k	-/-/-	-	-	+	++	+
C2	-	+	k/k	-/-/-	-	-	+	+++	+

5.3. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA CON UNA PLANTA INDICADORA (*Lactuca sativa*)

En presencia de cadmio 25 ppm, las plántulas que germinaron y fueron tratadas con caldo TSB [7; Anexo II, Fig.12] mostraron un 40.78% de aumento en la longitud promedio respecto de aquellas tratadas con solución salina [5; Anexo II, Fig. 12]. Esta diferencia no llegó a ser significativa a nivel estadístico ($p=0.081$; Fig. 5). Con respecto al promedio del número hojas, se observó un aumento estadísticamente significativo del 40.63% en el tratamiento con caldo TSB con respecto al tratamiento con solución salina ($p<0.001$; Fig. 6).

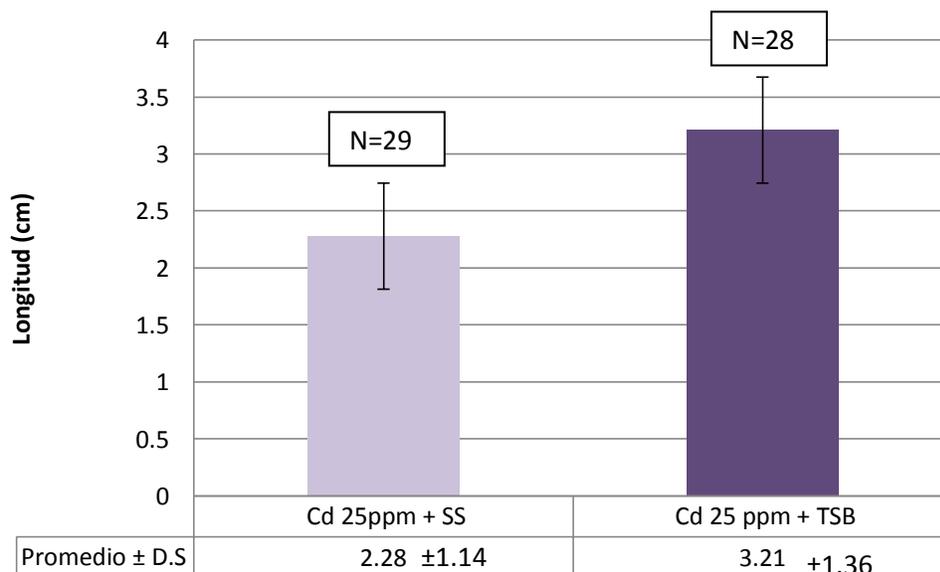


Figura 5. Longitud de las plántulas de lechuga (promedio ± D.S) crecidas en presencia de cadmio 25 ppm+ TSB y cadmio 25 ppm + solución salina (SS).

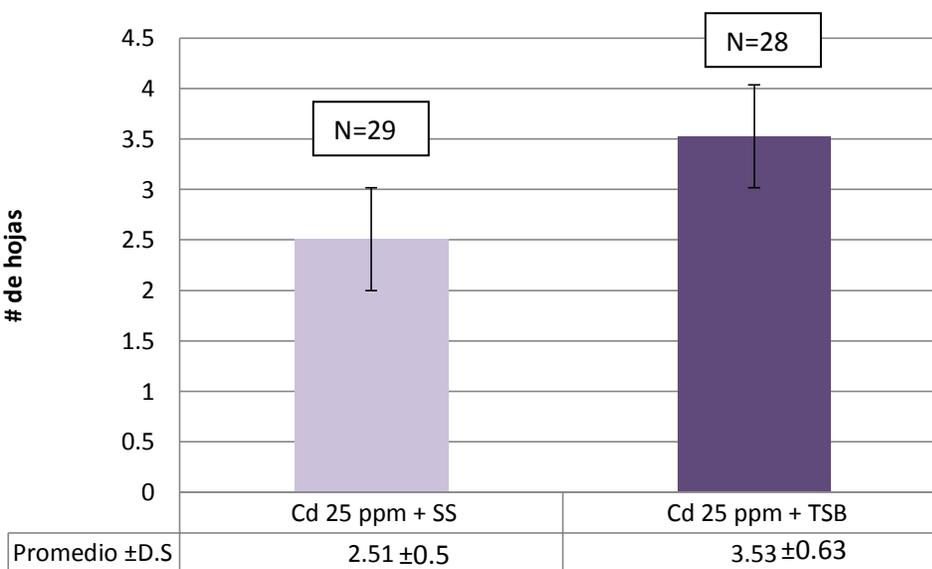


Figura 6. Número de hojas en plántulas de lechuga (promedio ± D.S) crecidas en presencia de cadmio 25 ppm + TSB y cadmio 25 ppm + solución salina (SS).

En presencia de cadmio 50 ppm, la distribución de los datos obtenidos no fue normal y solo se observaron diferencias significativas en la longitud de las plántulas, mas no en la cantidad de hojas. En las plántulas tratadas con cadmio 50 ppm y caldo TSB [8; Anexo II, Fig.12], la mediana de la longitud fue un 81.81% mayor que aquella de las plántulas tratadas con solución salina [6; Anexo II, Fig. 12] ($p=0.0312$; Fig. 7).

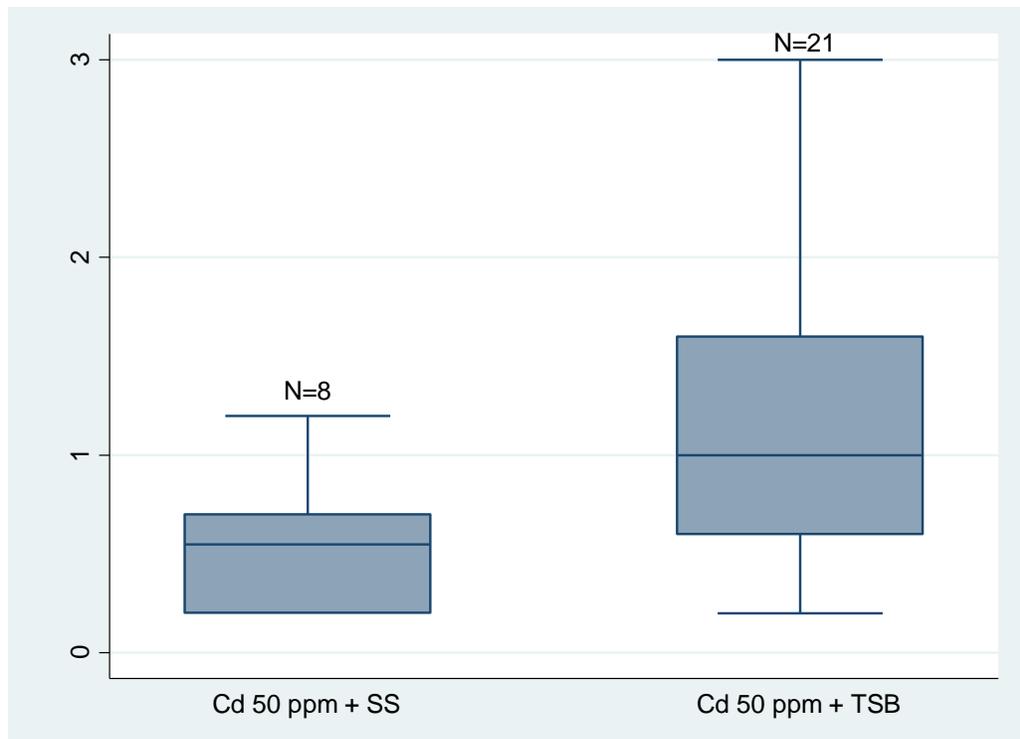


Figura 7. Longitud de las plántulas de lechuga (mediana y rango intercuartílico) crecidas en presencia de cadmio 50 ppm + TSB y cadmio 50 ppm + solución salina (SS).

Los resultados obtenidos con las plántulas de lechuga crecidas en presencia de las 2 concentraciones probadas de cadmio sugieren que habría un efecto del medio de crecimiento de las bacterias (caldo TSB) en el desarrollo de las plántulas. De hecho se observó la misma tendencia en el tratamiento con la cepa sin lavar en plantas expuestas a las 2 concentraciones de cadmio respecto del tratamiento con la cepa lavada (Anexo III, Tabla 14), si bien estas diferencias no llegaron a ser significativas. Por lo tanto, se decidió lavar las cepas en los experimentos posteriores con cacao para eliminar la posibilidad de que ocurra dicho efecto.

5.4.PREPARACIÓN DE LA TIERRA

El conteo de microorganismos en una muestra de tierra esterilizada por primera vez arrojó una gran cantidad de colonias en la mayoría de diluciones. Cuando se realizó el conteo luego de 5 días de la primera esterilización se observó un aumento de las UFC/mL, por lo que se decidió hacer una segunda esterilización. Luego de la segunda esterilización se observó todavía una gran cantidad de microorganismos. En la tercera esterilización se observó una notable disminución de las UFC/g, por lo que se decidió no realizar más esterilizaciones (Tabla 4). La tabla completa con todas las diluciones se encuentra en el ANEXO III, Tabla 13.

Tabla 4. Promedio del número de UFC/g de suelo desde la primera hasta la tercera esterilización.

	(UFC/g)
1 ^{ra} esterilización	Incontable
2 ^{da} esterilización	Incontable
3 ^{ra} esterilización	100

5.5. GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CACAO Y TRASPLANTE

Las semillas germinaron utilizando un algodón para envolverlas y luego fueron introducidas en vasos de plástico y puestas en oscuridad en donde crecieron exitosamente (Fig. 8A). Pasadas 3 semanas, se hizo el trasplante a las bolsas con tierra previamente esterilizada, las que se colocaron en bandejas para ser llevadas al aire libre y cubiertas con una malla para protegerlas del sol (Fig. 8B).



Figura 8. Planta de cacao luego de germinada la semilla (A); y después del trasplante a bolsas con tierra (B)

5.6. TRATAMIENTO DE PLANTAS DE CACAO Y EFECTO EN SU BIOMÉTRICA

La longitud de la planta mostró diferencias significativas cuando se comparó los controles Cd 100 y 200 ppm [15 y 16, Anexo II, Fig. 13] con el control agua [20, Anexo II, Fig. 14], ya que la mediana de la longitud disminuyó en un 23.80 (p= 0.0268) y 28.38% (p=0.0160), respectivamente. Además, el control agua [20] mostró una mediana de longitud de la planta que superó en un 42.46% (p=0.0160) a la del control C2 [17, Anexo II, Fig. 14] (Ver Tabla 6). Con respecto al número de hojas, se observó que el control Cd 200 ppm [16] aumentó en un 41.66% la mediana con respecto al tratamiento Cd 200 + C2 [12, Anexo II, Fig. 13] (p=0.0450). Adicionalmente, en el tratamiento con la cepa X + Cd 100 ppm [10, Anexo II, Fig. 13] se evidenció un aumento de 64.28% con respecto al control Cd 100 ppm [15, Anexo II, Fig. 14] (p=0.0380). En cuanto al grosor del tallo, la mediana del control Cd 200 ppm [16] aumentó en un 25% con respecto al tratamiento Cd 200 ppm + C2 [12] (p=0.0417). En relación a la longitud de la raíz, se evidenció una disminución de 72.72% en la mediana del control Cd 200 ppm [16] en comparación al control agua [20] (p=0.0394). Además, se observó un aumento de 40.9% en

la mediana de la longitud de la raíz con el tratamiento Cd 200 ppm + X [13, Anexo II, Fig. 13] con respecto al control Cd 200 ppm [16] ($p=0.0355$). Por último, no se obtuvieron diferencias significativas en el tamaño de las hojas y el peso de la raíz.

Cabe señalar que solo se tomaron en cuenta para los análisis las plantas que estuvieron vivas al final del experimento. No se muestran resultados ni análisis estadísticos para los datos de la cepa AB5, ya que al concluir el experimento casi la totalidad de las plantas no sobrevivió.

Tabla 5. Medianas y rango intercuartílicos para todos los tratamientos de los siguientes parámetros: longitud de la planta, número de hojas, grosor del tallo, longitud y peso de la raíz. Resultados solo para las cepas X y C2.

C2		X		Control					
100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	Agua	C2	X	
25±3	20±2	21±0	18±6	21±5.5	20.25±2	26±4.5	18.25±2.5	23.5±5	Longitud de planta
8.5±5	6±4	11.5±3	6±4	7±1	8.5±2	9±3	7±4	12±2	#de hojas
0.3±0.2	0.3±0.1	0.45±0.1	0.3±0	0.3±0.1	0.4±0.2	0.3±0.3	0.3±0	0.5±0.2	Grosor de tallo
9.68±3.71	8.3±2.14	9.92±1.51	8.96±2.31	9.92±2.68	8.51±1.11	9.72±0.5	9.74±1.85	9.83±2.32	Tamaño de hojas
0.41±0.32	0.34±0.5	1.17±0.88	0.66±0.02	0.65±0.47	0.32±0.4	0.52±0.51	0.53±0.056	0.9±0.57	Peso de raíz
12.75±8.5	12±15.5	14±2	15.5±1	12.75±5	11±5	19±11.5	11.5±13	19±14	Longitud de raíz

Tabla 6. Valores de p para las respectivas comparaciones entre tratamientos para los siguientes parámetros: longitud de la planta, número de hojas, grosor del tallo, longitud y peso de la raíz. Resultados solo para las cepas X y C2.

C2		X		Control						
100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm	Agua	C2	X	p	
						X	X		0.0160	Longitud de planta
						X		X	0.3137	
				X		X			0.0268	
					X	X			0.0160	
X				X					0.1033	
	X				X				0.3031	
		X		X					0.4125	
			X		X				0.3012	
						X	X		0.2007	# de hojas
						X		X	0.1054	
				X		X			0.2175	
					X	X			0.4163	
X				X					0.4265	
	X				X				0.0450	
		X		X					0.0380	
			X		X				0.1646	
						X	X		0.1527	Grosor de tallo
						X		X	0.1721	
				X		X			0.2254	
					X	X			0.4548	

X				X					0.2667	
	X				X				0.0417	
		X		X					0.0768	
			X		X				0.1073	
						X	X		0.4529	Tamaño de hojas
						X		X	0.3587	
				X		X			0.4437	
					X	X			0.0757	
X				X					0.2614	
	X				X				0.2473	
		X		X					0.4418	
			X		X				0.4451	
						X	X		0.4064	Peso de raíz
						X		X	0.0621	
				X		X			0.0745	
					X	X			0.2023	
X				X					0.1577	
	X				X				0.2874	
		X		X					0.1208	
			X		X				0.1503	
						X	X		0.1425	Longitud de raíz
						X		X	0.3030	
				X		X			0.3318	
					X	X			0.0394	
X				X					0.4635	
	X				X				0.3750	
		X		X					0.3819	
			X		X				0.0355	

5.7. EFECTO DE LAS CEPAS DE ESTREPTOMICETOS EN LA ABSORCIÓN DE CADMIO POR LAS PLANTAS

El tratamiento con la cepa X no tuvo un efecto consistente en la acumulación de cadmio en las plantas de cacao. Mientras en plantas expuestas a una concentración de cadmio de 100 ppm el tratamiento con la cepa X promovió una mayor acumulación del metal en relación a las plantas no tratadas, aquellas expuestas a 200 ppm de cadmio y tratadas con la cepa mostraron una ligera disminución en su capacidad de acumulación respecto de las que solo fueron expuestas al cadmio (Fig. 9). Ninguna de estas diferencias tuvo una significación estadística.

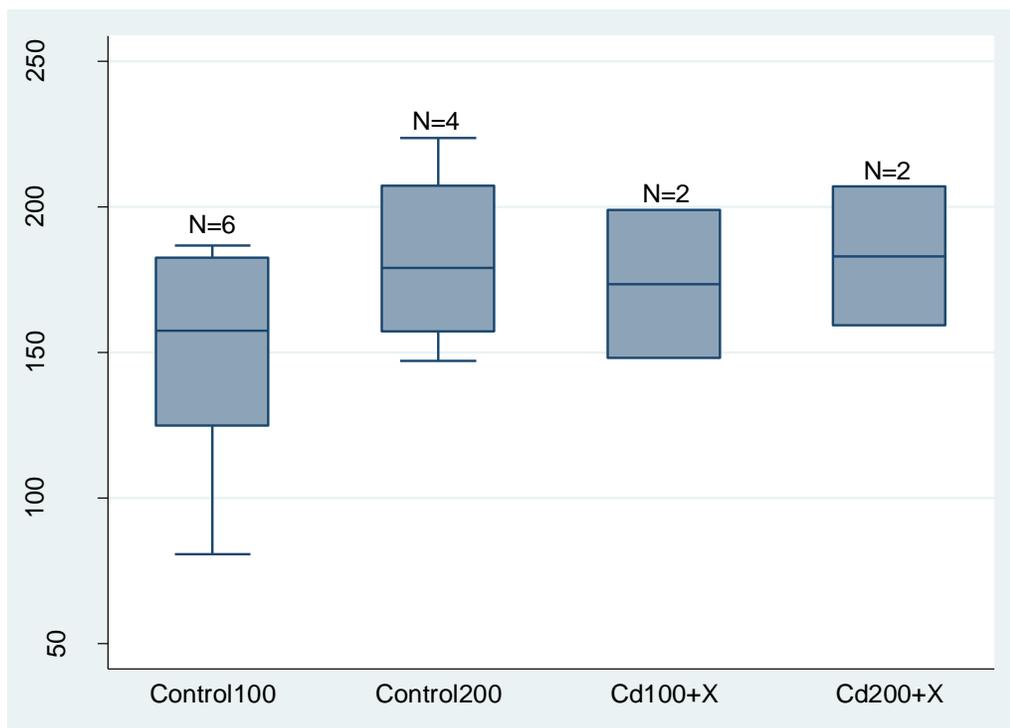


Figura 9. Absorción de cadmio en plantas de cacao tratadas con la cepa de estreptomicetos X.

Por el contrario, el tratamiento con la cepa C2 pareció promover en todos los casos una menor acumulación de cadmio en las plantas de cacao estudiadas. En plantas expuestas a 100 ppm de cadmio y tratadas con la cepa, la cantidad de cadmio absorbido fue un 76.47% menor que en plantas solo expuestas al metal ($p=0.0456$), en tanto las plantas tratadas y expuestas a 200 ppm de cadmio disminuyeron su absorción en 31.51% en relación a las que solo se expusieron al cadmio ($p=0.0059$) (Fig. 10).

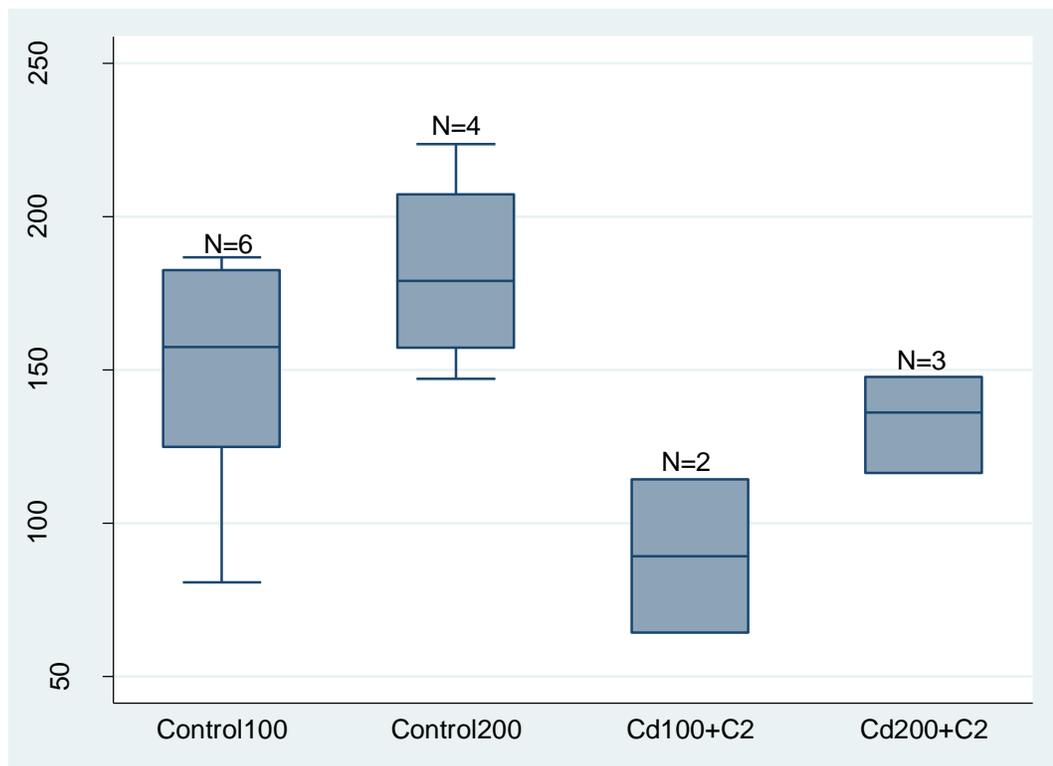


Figura 10. Absorción de cadmio en plantas de cacao tratadas con la cepa de estreptomicetos C2.

Solo se tomaron en cuenta para los análisis las plantas que estuvieron vivas al final del experimento. Aquí tampoco se analizó la cepa AB5 debido a la mortalidad total observada al final del experimento en las plantas tratadas con esta cepa.

VI. DISCUSIÓN

Se buscó con el presente estudio piloto evaluar el posible potencial de 3 cepas de estreptomicetos para disminuir la absorción de cadmio en plantas de cacao.

Las características micro y macroscópicas de las cepas utilizadas en este estudio permitieron corroborar la identidad de estas. Las cepas X , C2 y AB5 pertenecen al género *Streptomyces* de acuerdo a las características señaladas en el Manual de determinación bacteriológica de Bergey (35) y los Métodos de caracterización de especies de *Streptomyces* (60). Asimismo, los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas mostraron similitudes con los reportados para el género *Streptomyces* en el Manual de determinación bacteriológica de Bergey (35). Estas observaciones son congruentes con los análisis moleculares realizados en estudios previos que determinaron que las cepas X y AB5 pertenecen a la especie *Streptomyces variabilis* (53), y la cepa C2 a *Streptomyces sp.* (61). *Streptomyces* es un género que juega un papel importante en la rizósfera de algunas plantas como *Pisum sativum* (alverja) y *Triticuma estivum* L. (trigo), habiéndose reportado que mejoran su crecimiento y protegen las raíces de posibles patógenos fúngicos (62–64).

Debido a que en trabajos previos utilizando las cepas C2 , X y AB5, entre otras, se había observado que el tratamiento de plantas con la cepa C2 suspendida en su caldo de cultivo iba acompañado de un mayor crecimiento de estas (53), se decidió verificar si este efecto podía ocurrir también en presencia de cadmio,

para lo cual se realizaron experimentos preliminares con plántulas de lechuga tratadas con la cepa C2 y expuestas a 25 y 50 ppm de cadmio. Se encontró incrementos significativos a nivel estadístico en el tamaño de las plántulas (50 ppm de cadmio) y en el número de hojas (25 ppm de cadmio) cuando se añadió caldo TSB en comparación con una solución salina. Debido a estos resultados se optó por desarrollar los experimentos en cacao empleando las cepas seleccionadas para este trabajo lavadas previamente para así evitar un posible efecto del caldo de cultivo bacteriano en el desarrollo de las plantas. Por otra parte, se sabe que la materia orgánica actúa como un agente quelante de metales pesados, por lo que se quiso evitar cualquier sesgo en ese sentido, por pequeño que fuese (65). Por último, otro de los motivos por los que se decidió lavar la cepa fue no añadir un medio nutritivo al suelo que favoreciera la proliferación de otras especies bacterianas que pudieran atenuar la acción de las cepas en estudio.

En relación a la tierra a utilizarse en los experimentos con cacao, esta se esterilizó 3 veces con un intervalo de 3 días entre cada esterilización para asegurar la mínima carga microbiana, como se señala en estudios previos (66). El conteo de colonias realizado permitió establecer que en la tercera esterilización se obtuvo una carga microbiana menor que 100 UFC/g de tierra, por lo que se puede afirmar que el suelo se encontraba en óptimas condiciones. Este paso era también necesario para contar con un suelo estéril en el que se minimizara en lo posible la influencia de otros microorganismos que pudieran alterar el desenvolvimiento de las cepas estudiadas. Sin embargo, se ha reportado que al

esterilizar el suelo ocurren cambios físicos y químicos en este, además de eliminarse microorganismos. Entre estos cambios se han descrito alteraciones en los niveles de Manganeseo (Mn) del suelo, en el pH, así como en los niveles de N, P y K disponibles para la planta (67,68). Si bien estos cambios dependen de la composición del suelo en cuestión, ellos podrían perjudicar el estado nutricional de las plantas de cacao y alterar su crecimiento (69), además la esterilización promueve la liberación de sustancias tóxicas (70). Por estos motivos se decidió no realizar una cuarta esterilización.

La germinación de las semillas de cacao se realizó en vasos de plástico y bajo condiciones de oscuridad. Además se germinaron semillas en exceso para garantizar que todas las plántulas a ser transferidas a las bolsas con tierra estéril estuvieran vivas. Un paso importante en la germinación fue retirar por completo el mucilago que cubre a estas semillas ya que de esa manera se acelera la maduración y se evita la fermentación (4). Pasadas 2 a 3 semanas se transfirió las semillas a la tierra estéril, se realizaron los tratamientos correspondientes y fueron después llevadas al aire libre y cubiertas por una malla especial que les proporcionaba las condiciones de sombra adecuadas, importantes para su desarrollo.

Se decidió que las concentraciones de cadmio fuesen 100 y 200 ppm, valores bastante más elevados que los encontrados en los suelos naturales. Ello se debió a que el modelo experimental utilizado para el estudio involucró una administración única del metal y una exposición de solo unas pocas semanas, lo

que con las concentraciones naturales podría haber resultado en una acumulación en planta de difícil detección e irrelevante desde un punto de vista biológico. Usualmente los frutos de cacao recolectados para ser utilizados como materia prima provienen de plantaciones de varios años, en las cuales las plantas tienen una larga exposición que favorece la acumulación de cantidades significativas de cadmio. De otro lado, la administración de concentraciones elevadas del metal permitía minimizar la disminución de su disponibilidad para la planta por efecto de la quelación por parte de la materia orgánica presente en la tierra.

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con el control agua y un estudio previo para verificar la calidad de los datos obtenidos. Para esto se utilizó como referencia el estudio realizado por Greathouse *et al.* (71), que determinó el ritmo de crecimiento del cacao, además del tamaño y número de hojas esperado en cada etapa de crecimiento. En cuanto a la longitud de la planta para el control agua, en el presente estudio se obtuvo una mediana de 26 cm la cual se asemeja a los 25-30 cm reportados por Greathouse *et al.* (71). La mediana de 9 obtenida para el número de hojas se asemeja también a lo hallado en aquel estudio (11.36 cm). Se debe señalar, sin embargo, que en nuestro estudio el tamaño de las hojas no alcanzó los 25-30 cm reportados anteriormente (ver Tabla 5).

El efecto del cadmio a 100 y 200 ppm sobre el crecimiento de las plantas a través de una selección de parámetros se evaluó comparando los datos de los controles expuestos solo al metal con aquellos obtenidos del control agua. Se encontró que en los controles cadmio 100 y 200 ppm la mediana de la longitud de la planta

disminuyó significativamente (Tabla 6), así como, la longitud de la raíz, aunque en este caso solo de manera significativa en el control cadmio 200 ppm. No se observaron diferencias significativas en los parámetros restantes, lo que sugiere que el cadmio tiene un efecto negativo en el crecimiento de las plantas de cacao que se ve reflejado solo en la longitud de la planta y su raíz. Estudios anteriores como el realizado por Castro *et al.* (27) también han reportado cambios a nivel anatómico, bioquímico genéticos y nutricional en plantas de cacao expuestas a cadmio.

Cuando se analizó el efecto de las cepas en la longitud de las plantas de cacao en comparación con el control agua (Tabla 5), se observó que con ninguna de ellas hubo un aumento significativo en esta variable. Si bien al analizar el resto de parámetros de crecimiento se observó que en algunos de ellos el control de la cepa X presentaba valores mayores que los del control agua, las diferencias no fueron significativas. Por ello concluimos que las cepas por sí mismas no benefician el crecimiento de las plantas de cacao bajo las condiciones del modelo experimental utilizado.

El tratamiento de las plantas expuestas a 100 y 200 ppm de cadmio con las 3 cepas de estreptomicetos no provocó cambios en los parámetros de crecimiento que sugiriesen una mejora respecto de las plantas expuestas solo al cadmio. Las pocas diferencias significativas observadas no mostraron un patrón consistente con un beneficio o un perjuicio en el crecimiento (Tabla 5), por lo que debemos concluir que en el modelo experimental utilizado el tratamiento con estas cepas

no se manifiesta en una reversión clara de los efectos negativos del cadmio en el crecimiento de las plantas, en particular en la longitud de la planta y la raíz.

Los resultados de la absorción de cadmio demostraron que la cepa X no la disminuye cuando las plantas de cacao son expuestas a concentraciones de 100 y 200 ppm. Esto se puede deber a que la cepa X no cuenta con mecanismos para evitar la absorción de cadmio por parte de la planta. En cuanto a la cepa AB5, su capacidad de reducir la acumulación de cadmio no pudo ser evaluada al no sobrevivir ninguna de las plantas tratadas con esta cepa al final del experimento. Si bien la alta mortalidad de las plantas observada en el presente trabajo podría deberse a factores como la alteración de la disponibilidad de micro y macro nutrientes por la esterilización de la tierra, o la ausencia de un periodo de adaptación de las plantas recién transferidas a la tierra antes de ser tratadas, no hay una razón concreta que explique la nula supervivencia observada en las plantas de cacao tratadas con la cepa AB5. En ese sentido, no se puede descartar que esta cepa resulte de algún modo tóxica para las plantas.

A diferencia de lo ocurrido con las otras cepas estudiadas, las plantas tratadas con la cepa C2, mostraron una clara tendencia a acumular cantidades menores de cadmio cuando fueron expuestas a concentraciones de 100 y 200 ppm de este metal. Los dos tratamientos resultaron en una disminución significativa con un valor de p de 0.0456 y 0.0059, respectivamente. Sin embargo, se debe señalar que a pesar de que el tratamiento con la cepa C2 logró disminuir la acumulación de cadmio en las plantas de forma significativa, no alcanzó para revertir los efectos

negativos en el crecimiento de estas bajo las condiciones del modelo experimental utilizado (ver arriba). Una evaluación con un número mayor de plantas y un modelo experimental más cercano a la situación natural en campo servirán para confirmar los resultados observados en relación a la acumulación de cadmio en este estudio y verificar si este efecto se ve reflejado en el crecimiento de las plantas.

La capacidad de la cepa C2 de neutralizar al cadmio podría deberse a la adsorción extracelular del metal a través de la pared celular, fenómeno ya descrito en bacterias Gram positivas, o también a procesos de bioabsorción, quelación extracelular, entre otros mecanismos (72).

VII. CONCLUSIONES

- Se determinó que la metodología de preparación del inóculo bacteriano a utilizar incluya un lavado previo de la cepa.
- En las concentraciones utilizadas (100 y 200 ppm), el cadmio, tiene un efecto negativo significativo en la longitud de la planta. La concentración de 200 ppm también tiene negativo en la longitud de la raíz.
- En el modelo experimental utilizado, la inoculación de la cepa C2 reduce en un 76.47% y 31.51% la absorción de cadmio en plantas de cacao para los tratamientos con 100 y 200 ppm respectivamente. Las cepas X y AB5 no tienen efecto alguno sobre la absorción de cadmio.

VIII. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de muestras para contar con un poder estadístico mayor en la determinación del efecto de las cepas en la absorción de cadmio por parte de las plantas de cacao.
- Inocular las cepas cada 15 días para favorecer el establecimiento en el suelo de las cepas en estudio, en particular de las cepas AB5 y C2.
- Prolongar el experimento para analizar resultados a largo plazo.
- Implementar un periodo de adaptación luego del trasplante de las semillas germinadas a la tierra estéril para disminuir la mortalidad de las plantas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McNeil CL. The Biology, Antiquity, and Modern Uses of the Chocolate Tree (Theobroma cacao L.). In: McNeil CL, editor. Chocolate in Mesoamerica: A cultural history of cacao. University Press of Florida; 2006.
2. Doster N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hoja botanica: Cacao. Primera ed. Luebert F, editor. 2011. 19 p.
3. Cuatrecasas J. Cacao and its Allies ; A taxonomic revision of the genus Theobroma. Natl Herb. 1964
4. Hardy F. Manual de Cacao. Edicion en. Antonio Lehmann; 1961. 12-13 p.
5. K.G.M, Skene ; M. B. Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Y.P.S Bajaj, editor. Springer-Verlag; 1961.
6. Aprotosoiaie, A. C. ; Lucas, S.V and Miron A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016
7. OEEE-MINAG. Modulo de Consulta a la Base de Datos de la DGIA. 2015
8. García Carrión LF. Cultivares de cacao del Perú. Minist Agric. 2012;112.
9. OMS, FAO. Anteproyecto De Niveles Máximos Para El Cadmio En El Chocolate Y Productos Derivados De Cacao. Programa Conjunto Fao/Oms Sobre Normas Aliment Com Del Codex Sobre Contam Los Aliment. 2014.
10. COMMISSION REGULATION (EC). COMMISSION REGULATION (EC)

No 1881/2006. 2006

11. Prieto, J. ; Gonzales, C. ; Roman, A. ; Prieto F. Contaminacion y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Trop Subtrop Agroecosystems. 2009.
12. Oves M., Khan MS, Zaidi A, Ahmad E. Soil Contamination, Nutritive Value, and Human Health Risk Assessment of Heavy Metals: An Overview. In: Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation. Vienna: Springer Vienna; 2012
13. Davis RD. Cadmium in sludges used as fertilizer. Mislin H; OR, editor. Exp Suppl. 1986.
14. Page AL, Chang AC, El-Amamy M. Cadmium Levels in Soils and Crops in the United States. Lead, Mercur Cadmium Arsen Enviroment. 1987.
15. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, et al. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J Occup Med Toxicol. 2006.
16. Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y, Uetani M, Oishi M, Nakagawa H, et al. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. Toxicol Lett. 2005.
17. Smical, A.I.; Hotea, Vacile ; Oros, Vacile; Juhasz, Jozsef; Pop E. Studies on transfer and bioaccumulation of heavy metals from soil into lettuce. Environ

Eng Manag J. 2008.

18. Tangahu BV, Sheikh Abdullah SR, Basri H, Idris M, Anuar N, Mukhlisin M. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *Int J Chem Eng*. 2011
19. Williams, D.E ; Coleman N. Cation exchange properties of plant root surface. *Plant Soil* II. 1950.
20. Brummer G, Tiller KG, Herms U, Clayton PM, Kiel DU, Kiel FRG. Adsorption-desorption and/or precipitation-dissolution processes of zinc in soils. *Geoderma*. 1983.
21. OMS-FAO. Evaluación de diversos aditivos alimentarios y los contaminantes: mercurio, plomo y cadmio. *Información técnica No 50*. 1997.
22. Chavez E. Enrichment of cadmium in cacao growing soils in southern Ecuador: chemical characterization and soil amendments as remediation alternatives. University of Florida; 2015.
23. Cardenas E. Presencia de cadmio en algunas parcelas de cacao orgánico en la cooperativa agraria industrial Naranjillo- Tingo Maria - Peru. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
24. Crozier J. Heavy Metals in Cocoa- Literature Review. 2012.
25. Arévalo-Gardini E, Obando-Cerpa ME, Zúñiga-Cernades LB, Arévalo-Hernández CO, Baligar V, He Z. Metales pesados en suelos de plantaciones de

cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres regiones del Perú. *Ecol Apl.* 2016;

26. Huamani -Yupanqui H, Huauya-rojas MÁ, Mansilla-minaya LG, Florida-Rofner N, Neira-Trujillo G. Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) orgánico. 2012.
27. Castro A V., de Almeida A-AF, Pirovani CP, Reis GSM, Almeida NM, Mangabeira PAO. Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural changes induced by Cd toxicity in seedlings of *Theobroma cacao* L. *Ecotoxicol Environ Saf* . 2015
28. Anjum SA, Tanveer M, Hussain S, Bao M, Wang L, Khan I, et al. Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environ Sci Pollut Res.* 2015.
29. Dias MC, Monteiro C, Moutinho-Pereira J, Correia C, Gonçalves B, Santos C. Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol Plant.* 2013.
30. Shi G, Cai Q, Liu C, Wu L. Silicon alleviates cadmium toxicity in peanut plants in relation to cadmium distribution and stimulation of antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 2010.
31. Cherif J, Mediouni C, Ammar W Ben, Jemal F. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in

- tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *J Environ Sci*. 2011
32. Vidali M. Bioremediation - An overview. *J Ind Pollut Control*. 2011.
 33. Jacome, D. Fernandez, J. Rodriguez A. Dinamica del cadmio en plantas de cacao micorrizadas en suelos del tropico. 2016.
 34. L. M. Prescott, J. P. Harley DAK. *Microbiology*. 7th ed. McGraw-Hill; 2003.
 35. Bergey DH, Holt JG. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Williams & Wilkins; 2000.
 36. Stackebrandt, Erko; Schumann P. Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. In: *The Prokaryotes*. 3rd ed. Springer; 2006.
 37. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012
 38. Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse H-J, Trujillo ME, Kämpfer P, et al. Road map of the Actinobacteria. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* . 2nd Vol 5. Springer-Verlag, Berlin, Germany.; 2012.
 39. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016
 40. Lechevalier HAL; MP. Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*. 1967.
 41. Nolan, Robert D. and Cross T. Isolation and Screening of Actinomycetes. In:

- Goodfellow, M ; WILLIAMS, S. T. ; MORDARSKI M, editor. Actinomycetes in Biotechnology. ACADEMIC PRESS; 1988.
42. Peczyńska-Czoch W, Mordarski M. Actinomycete Enzymes. In: Goodfellow, M; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI M, editor. Actinomycetes in Biotechnology. ACADEMIC PRESS; 1988.
 43. Modi , Shreya ; Chauhan, Poonam B ; Gahlout , Mayur and Prajapati H. Extraction and isolation of melanin from Actinomycetes. Int J Drug Res Technol. 2016.
 44. De la Cruz M, Gonzales I, Parish CA, Onishi R, Tormo JR, Martin J, et al. Production of ramoplanin and ramoplanin analogs by actinomycetes. Front Microbiol. 2017.
 45. Kothe E, Dimkpa C, Haferburg G, Schmidt A, Schmidt A, Schütze E. Streptomycete Heavy Metal Resistance: Extracellular and Intracellular Mechanisms. Vol. 19, Soil Heavy Metals. 2010.
 46. Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. The complex extracellular biology of Streptomyces. FEMS Microbiol Rev. 2010.
 47. Kothe E, Bergmann H, Büchel G. Molecular mechanisms in bio-geo-interactions: From a case study to general mechanisms. Chemie der Erde - Geochemistry. 2005.
 48. Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: Interactions in the environment. J

Basic Microbiol. 2007.

49. Amoroso MJ, Castro GR, Carlino FJ, Romero NC, Hill RT, Oliver G. Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River. *J Gen Appl Microbiol*. 1998.
50. Hurtado JE. Aislamiento, purificación y presencia de plasmidos en cepas nativas de *Thiobacillus ferrooxidans*. Univerisdad Peruana Cayetano Heredia; 1984.
51. Hurtado JE. Variaciones bioquímicas y genéticas durante la selección de cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* resistentes a arsénico lixiviado de concentrados refractarios de arsenopirita. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2003.
52. Hurtado, JE; Bauer, JL; Maldonado, H; Cruz, E; Lazcano E. Arsenic solubilization from Peruvian ores by *Thiobacillus ferrooxidans*. International Seminar on dump and underground bacterial leaching metals from ores; 1990.
53. Pacheco S. Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
54. Sánchez M de J. Microbiología de suelos: Técnicas, métodos y medios de cultivo. Microbiología (Madrid). 2004.
55. Kortemaa H, Hannu R, Haahtela K, Smolander A. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil*. 1994

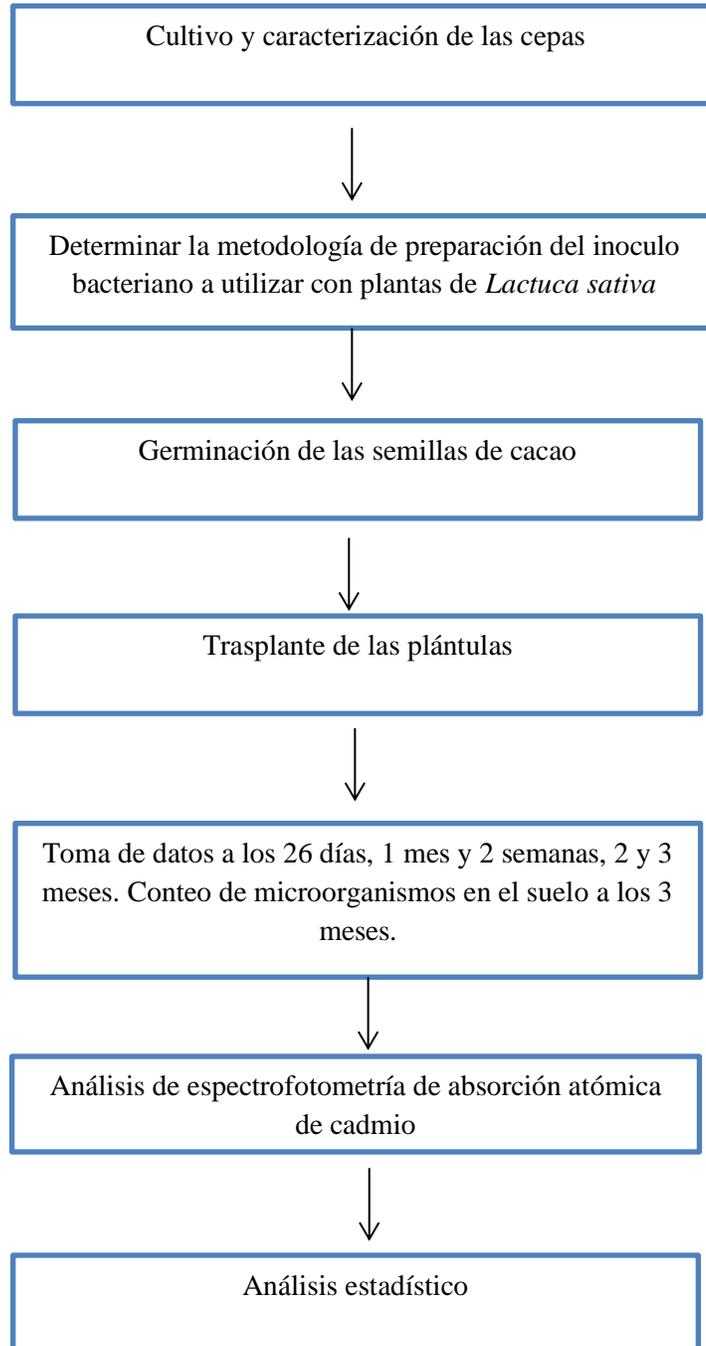
56. Zuñiga D. Manual de microbiología agrícola: Rhizobium , PGPR , indicadores de fertilidad e inocuidad. Primera ed. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
57. Ogata K, Arellano C, Zúñiga D. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zo Áridas*. 2008.
58. Díaz Vargas P, Ferrera-Cerrato R, Almaraz-Suárez JJ, González GA. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra*. 2001
59. Anwar S, Ali B, Sajid I. Screening of rhizospheric actinomycetes for various in-vitro and in-vivo plant growth promoting (PGP) traits and for agroactive compounds. *Front Microbiol*. 2016.
60. Gottlieb EBS and D. Methods for characterization of streptomyces species. *Int J Syst Bacteriol*. 1966.
61. Matsubara A. & Hurtado J. Isolation and characterization of actinomycetes from acidic cultures of ores and concentrates. *Adv Mater Res*. 2013.
62. Crawford JLS and DL. Ecology of Streptomyces in Soil and Rhizosphere. In: Rao JEC and JR, editor. *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis*. Department of Applied Plant Science, Queen's University Belfast, Belfast, UK; 2006.
63. Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, et al.

- Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol.* 2002
64. Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol.* 2003
 65. Ferraz M, Lourenço J. The Influence of Organic Matter Content of Contaminated Soils on the Leaching Rate of Heavy Metals. *Environ Prog.* 2000
 66. Trevors JT. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J Microbiol Methods.* 1996.
 67. Williams-Linera G, Ewel JJ. Effect of autoclave sterilization of a tropical andepte on seed germination and seedling growth. *Plant Soil.* 1984.
 68. Skipper HD, Westermann DT. Comparative effects of propylene oxide, sodium azide, and autoclaving on selected soil properties. *Soil Biol Biochem.* 1973.
 69. Fujimoto CK, Sherman GD. Manganese Availability as Influenced by Steam Sterilization of Soils¹. *Agron J.* 1948
 70. Rovira, A.D., Bowen GD. The Effects of Micro-Organisms Upon Plant Growth. *Plant Soil.* 1966.
 71. Greathouse, D. C.; Laetsch, W. M and Phinney BO. The Shoot-Growth Rhythm of a Tropical Tree, *Theobroma Cacao*. *Am J Bot.* 1971.

72. Schütze, Eileen ; Kothe E. Heavy Metal-Resistant Streptomycetes in Soil. In: Kothe, Erika, Varma A, editor. Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils. Heidelberg. 2012.
73. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by Streptomyces. Brazilian J Infect Dis. 2012.

ANEXO I

FLUJOGRAMA DEL PROCESO



ANEXO II
DIAGRAMAS DE PROCESO

Figura 11. Diagrama del proceso de germinación en planta indicadora (Lechuga). Se muestra los tratamientos comparados para la selección de la metodología a utilizar.

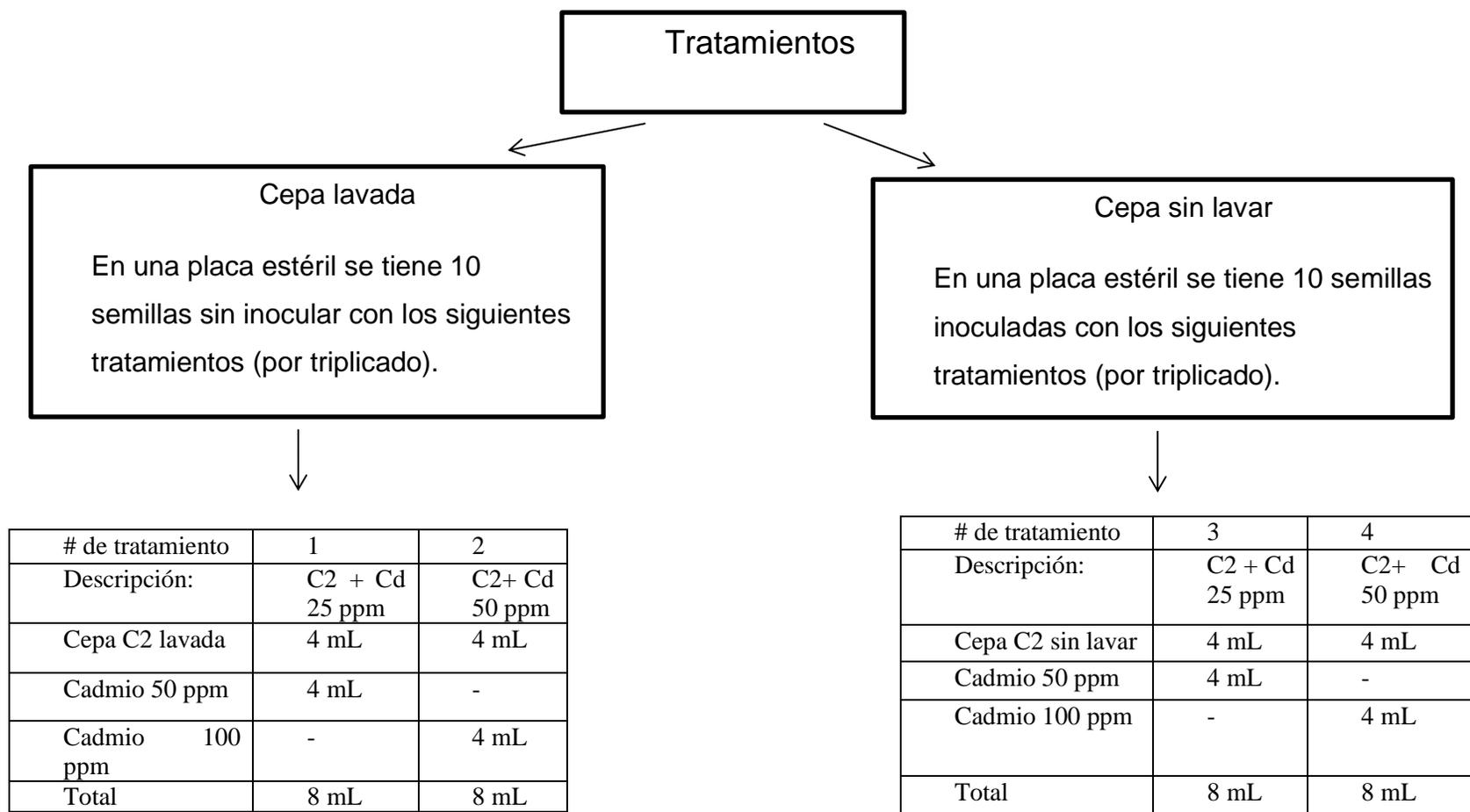


Figura 12. Diagrama del proceso de germinación en planta indicadora (Lechuga). Se muestra los tratamientos con cadmio comparados para la selección de la metodología a utilizar.

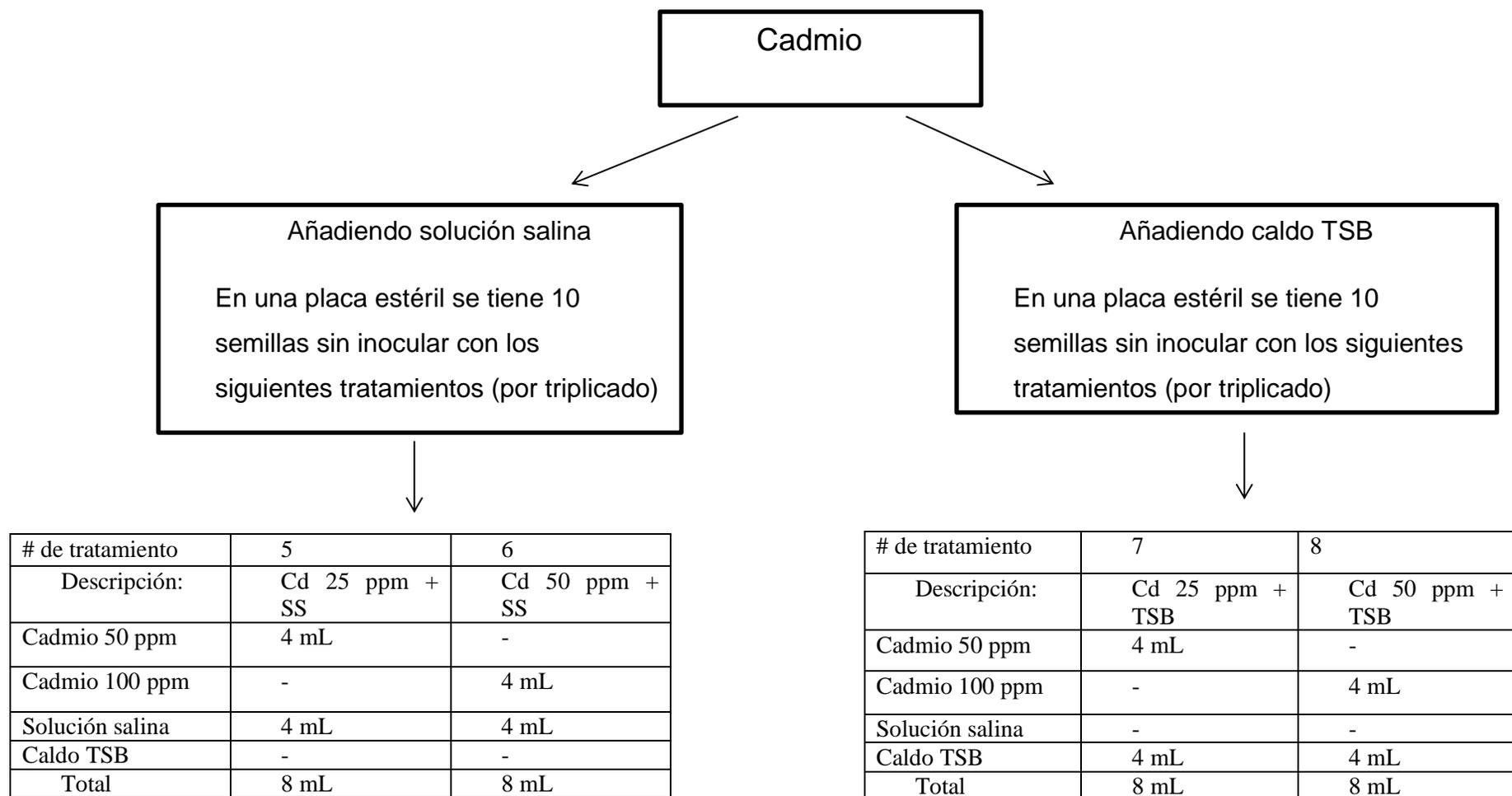


Figura 13. Diagrama de las pruebas en plantas de cacao. Se muestra los tratamientos realizados por cada concentración de cadmio: 100 y 200 ppm.

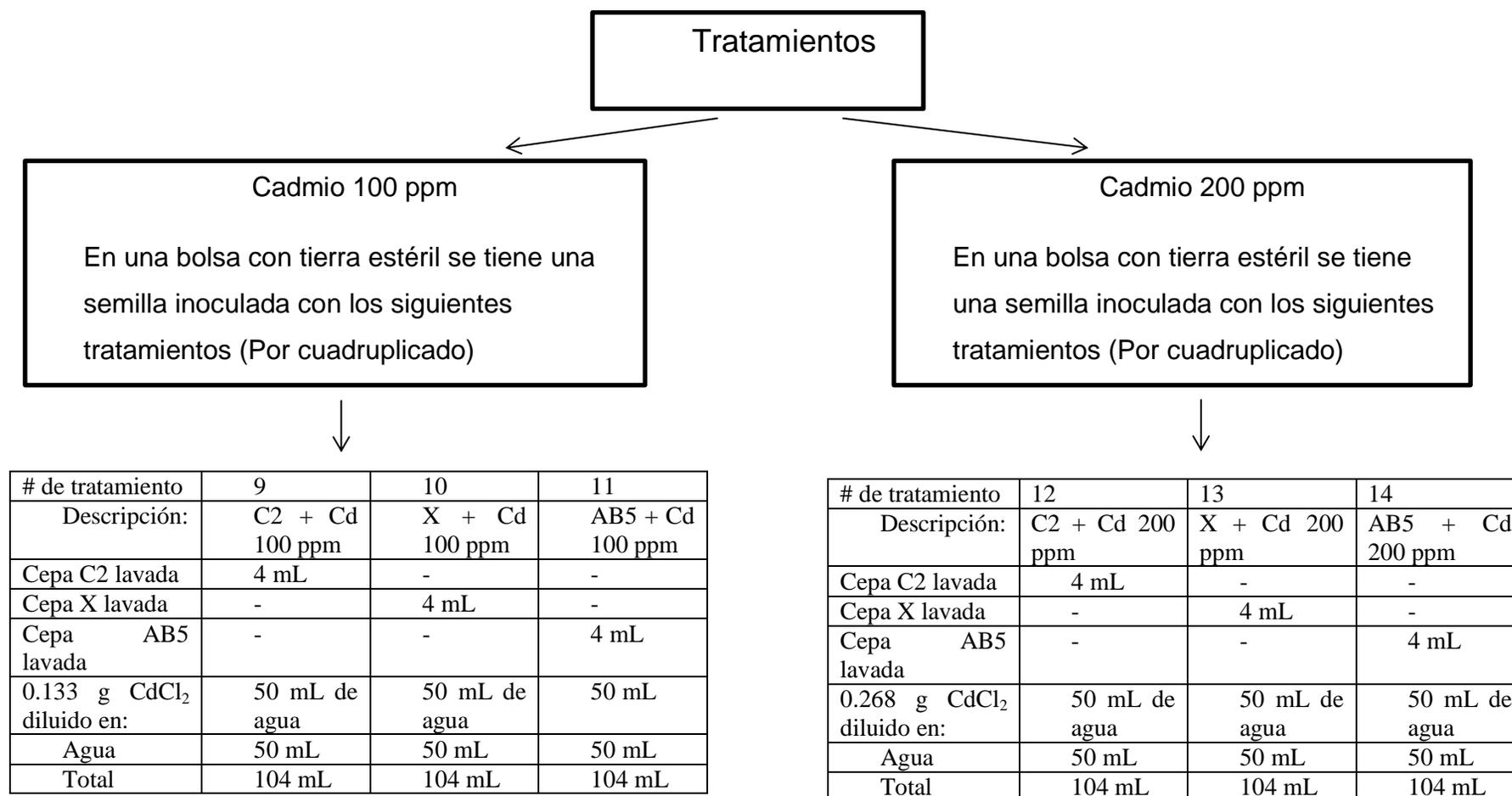
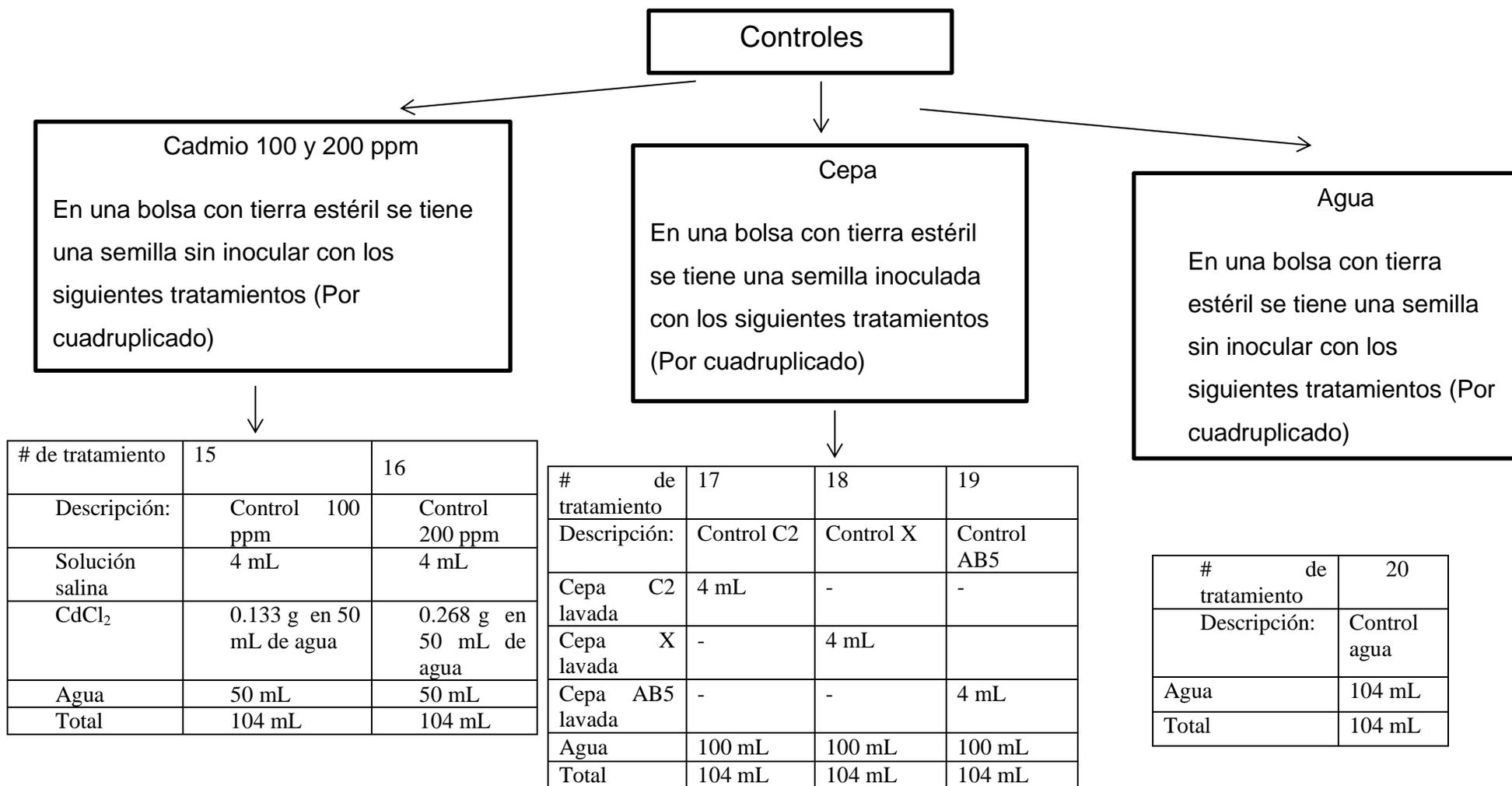


Figura 14. Diagrama de las pruebas en plantas de cacao. Se muestra los controles realizados en el estudio: control con solución de cadmio 100 y 200 ppm, y control de cada cepa.



ANEXO III
TABLAS DE DATOS

Tabla 7. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa X

Tratamiento	Absorción de cadmio (ppm)	Tamaño (cm)				Número de hojas			
		26 días	1 mes y 2 semanas	2 meses	3 meses	26 días	1 mes y 2 semanas	2 meses	3 meses
Cd 100 Control 1	186.72	15	17	19	19	6	8	8	8
Cd 100 Control 2*	60.24	9.5	11.5	11.5	11.5	3	3	3	3
Cd 100 Control 3	134.49	15.5	16.5	18	21.5	12	15	15	17
Cd 100 Control 4	124.7	15	16.5	17	17	4	5	5	5
Cd 200 Control 1*	124.77	4	4	4	4	0	0	0	0
Cd 200 Control 2	223.56	12	18	19.5	20.5	4	8	9	9
Cd 200 Control 3*	54.95	6	13	14	14	4	7	8	4
Cd 200 Control 4	167.01	18	19	19.5	20	6	7	7	8
Cd 100 X 1*	129.28	4	4	4	4	0	0	0	0
Cd 100 X 2	198.98	18	20	21	21	8	9	11	13
Cd 100 X 3*	200.3	9	11	11	11	4	5	6	4
Cd 100 X 4	147.94	5	15	19	21	0	15	7	10
Cd 200 X 1*	128.57	4	4	4	4	0	0	0	0
Cd 200 X 2	159.09	13	14	14	15	4	4	10	8
Cd 200 X 3*	1028.57	2	5	5	5	0	0	0	0
Cd 200 X 4	207.04	17	17	21	21	5	7	9	4
Control X 1		19.5	22.5	24	28.5	8	11	10	12
Control X 2		16	21.5	23	23.5	7	9	10	12
Control X 3		18	21.5	22	23.5	6	8	8	10
Control X 4*		4	5	5	5	0	0	0	0
Agua 1		22	26	27	27.5	7	11	13	13
Agua 2		20	21.5	21.5	22	7	9	10	10
Agua 3*		4	4	4	4	0	0	0	0

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 8. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo, peso y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas con la cepa X.

Tratamiento	Tamaño de hojas(cm)	Grosor (cm)	Peso de raíz (g)	Tamaño de raíz (cm)
	3 meses	3 meses	3 meses	3 meses
Cd 100 Control 1	8.56	0.5	1.374	10.5
Cd 100 Control 2*	5.25	0.3	0.984	4
Cd 100 Control 3	10.14	0.4	0.671	15
Cd 100 Control 4	8.46	0.3	0.648	10
Cd 200 Control 1*	0	0.4	0.171	10
Cd 200 Control 2	10.16	0.5	0.425	15
Cd 200 Control 3*	6.5	0.3	0.074	7
Cd 200 Control 4	8.62	0.5	0.805	13
Cd 100 X 1*	0	0.4	0.137	6
Cd 100 X 2	10.69	0.4	0.984	15
Cd 100 X 3*	4.62	0.3	0.099	9
Cd 100 X 4	9.15	0.5	1.372	13
Cd 200 X 1*	0	0.3	0.086	6
Cd 200 X 2	7.81	0.3	0.65	16
Cd 200 X 3*	0	0.3	0.319	9
Cd 200 X 4	10.12	0.3	0.678	15
Control X 1	9.83	0.6	0.697	19
Control X 2	10.37	0.5	0.907	30
Control X 3	8.05	0.4	1.269	16
Control X 4*	0	0.4	0.066	9
Agua 1	10.06	0.6	1.175	25.5
Agua 2	9.7	0.6	0.9	23.5
Agua 3*	0	0.3	0.19	6

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 9. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa C2

Tratamiento	Absorción de cadmio (ppm)	Tamaño (cm)					Número de hojas				
		26 días	1 mes semanas	y 2	2 meses	3 meses	26 días	1 mes semanas	y 2	2 meses	3 meses
Cd 100 Control 1	180.64	18	20		20	20.5	4	6		6	7
Cd 100 Control 2	80.76	20	23		24.5	24.5	3	6		7	7
Cd 100 Control 3*	72.58	17	18		18.5	18.5	4	2		1	1
Cd 100 Control 4	182.57	21	25		27	27	5	8		8	7
Cd 200 Control 1	191.08	18	18.5		19	20	4	4		4	6
Cd 200 Control 2*	806.21	12.5	14		14	14	0	0		1	1
Cd 200 Control 3	147.06	19.5	22.5		22.5	23.5	5	7		9	9
Cd 200 Control 4*	1702.13	8	11		11	11	0	2		2	0
Cd 100 C2 1	114.42	22	23		23	23.5	3	5		5	6
Cd 100 C2 2*	142.46	20.5	22.5		24	24.5	5	7		8	8
Cd 100 C2 3*	868.54	18	19.5		21	21.5	4	6		6	8
Cd 100 C2 4	64.14	22	25		25	26.5	6	9		10	11
Cd 200 C2 1	116.18	17	19		19	19	3	5		5	3
Cd 200 C2 2	136.14	18	20		20	21	4	5		5	6
Cd 200 C2 3*	161	20	21		21.5	21.5	5	5		4	4
Cd 200 C2 4	147.68	18	19.5		20	20	5	7		7	7
Control C2 1		15	16		16.5	17	5	6		7	5
Control C2 2*		15.5	16		16	16	6	7		7	7
Control C2 3*		10.5	11		11.5	11.5	0	0		0	0
Control C2 4		16.5	18.5		19	19.5	5	7		9	9
Agua 1		23.5	26.5		27.5	27.5	5	7		7	5
Agua 2		20	23.5		25	26	6	8		8	9
Agua 3		18	23		23.5	29	4	8		6	7

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 10. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo, peso y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas con la cepa C2

Tratamiento	Tamaño de hojas(cm)	Grosor (cm)	Peso de raíz(g)	Tamaño de raíz (cm)
	3 meses	3 meses	3 meses	3 meses
Cd 100 Control 1	9.71	0.3	0.552	6
Cd 100 Control 2	12.57	0.3	1.022	16
Cd 100 Control 3*	7	0.2	0.205	9
Cd 100 Control 4	11.21	0.3	0.246	15
Cd 200 Control 1	8.4	0.3	0.227	9
Cd 200 Control 2*	4	0.3	0.029	9
Cd 200 Control 3	8.16	0.3	0.201	9
Cd 200 Control 4*	0	0.3	0.067	8
Cd 100 C2 1	7.83	0.2	0.25	8.5
Cd 100 C2 2*	10.18	0.4	0.549	14
Cd 100 C2 3*	10.68	0.4	0.468	7
Cd 100 C2 4	11.54	0.4	0.574	17
Cd 200 C2 1	6.5	0.2	0.226	6.5
Cd 200 C2 2	8.3	0.3	0.345	12
Cd 200 C2 3*	5.12	0.3	0.257	6.5
Cd 200 C2 4	8.64	0.3	0.732	22
Control C2 1	10.5	0.3	0.502	5
Control C2 2*	5	0.2	0.093	14.5
Control C2 3*	0	0.2	0.04	3
Control C2 4	8.55	0.3	0.558	18
Agua 1	11.6	0.3	0.388	12
Agua 2	9.72	0.3	0.194	19
Agua 3	9.71	0.3	0.528	11

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 11. Datos de absorción de cadmio, tamaño y número de hojas de las plantas de cacao tratadas con la cepa AB5

Tratamiento	Tamaño (cm)				Número de hojas			
	26 días	1 mes y 2 semanas	2 meses	3 meses	26 días	1 mes y 2 semanas	2 meses	3 meses
Cd 100 Control 1*	8	8	8	8	0	0	0	0
Cd 100 Control 2*	7.5	8	8.5	8.5	4	3	1	1
Cd 100 Control 3*	15.5	15.5	15.5	15.5	4	4	4	4
Cd 100 Control 4*	10	10	10	10	0	0	0	0
Cd 200 Control 1*	12	12	12	12	0	0	0	0
Cd 200 Control 2*	18.5	18.5	18.5	18.5	2	2	2	2
Cd 200 Control 3*	15.2	15.2	15.2	15.2	2	2	2	0
Cd 200 Control 4*	11	11	11	11	0	0	0	0
Cd 100 AB5 1*	13	13	13	13	3	3	3	3
Cd 100 AB5 2*	18	18	18	18	2	2	2	2
Cd 100 AB5 3*	19	19.5	19.5	19.5	4	4	4	4
Cd 100 AB5 4	19.5	19.5	19.5	19.5	2	2	2	2
Cd 200 AB5 1*	20	20	20	20	3	3	3	3
Cd 200 AB5 2*	15	15	15	15	2	2	2	0
Cd 200 AB5 3*	16.5	16.5	16.5	16.5	4	4	4	4
Cd 200 AB5 4*	17	17	17	17	2	2	2	2
Control AB5 1*	18	20	20	20	3	3	3	3
Control AB5 2*	17.5	17.5	17.5	17.5	5	5	5	5
Control AB5 3*	14	14	14	15.5	3	3	3	3
Control AB5 4	19	19	19	19	7	9	10	9
Agua 1	16	16	17.5	20	9	9	9	9
Agua 2*	15	15	15	15	1	1	1	1
Agua 3	18	19	19	19.5	7	8	9	9
Agua 4*	4	4	4	4	0	0	0	0

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 12. Datos del tamaño de hojas, grosor del tallo, peso y tamaño de raíz de plantas de cacao tratadas con la cepa AB5

Tratamiento	Tamaño de hojas	Grosor (cm)	Peso de raíz (g)	Tamaño raíz (cm)
	(cm)			
	3 meses	3 meses	3 meses	3 meses
Cd 100 Control 1*	0	0.1	0.038	6
Cd 100 Control 2*	2	0.1	0.037	5
Cd 100 Control 3*	3.5	0.1	0.041	4
Cd 100 Control 4*	0	0.1	0.106	5
Cd 200 Control 1*	0	0.1	0.037	5
Cd 200 Control 2*	3.25	0.1	0.048	3
Cd 200 Control 3*	0	0.1	0.033	5
Cd 200 Control 4*	0	0.1	0.174	3
Cd 100 AB5 1*	3.16	0.1	0.046	4.5
Cd 100 AB5 2*	1.25	0.1	0.057	8
Cd 100 AB5 3*	5.37	0.1	0.19	4
Cd 100 AB5 4	3.66	0.1	0.18	3
Cd 200 AB5 1*	4.66	0.1	0.244	9
Cd 200 AB5 2*	0	0.1	0.206	6
Cd 200 AB5 3*	4.37	0.1	0.2331	2.5
Cd 200 AB5 4*	2.5	0.1	0.122	5
Control AB5 1*	3.66	0.1	0.042	4
Control AB5 2*	5.7	0.1	0.043	1
Control AB5 3*	4.83	0.1	0.173	8
Control AB5 4	9.33	0.2	0.27	20
Agua 1	9.77	0.3	0.278	20
Agua 2*	2	0.1	0.15	7
Agua 3	6.72	0.3	0.237	13
Agua 4*	0	0.1	0.044	3

*: Plantas muertas y que no fueron consideradas para los análisis estadísticos.

Tabla 13. Promedio del número de UFC/g de suelo desde la primera hasta la tercera esterilización para todas las diluciones.

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
1ra esterilización	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	0	0	Incontable	0
2da esterilización	Incontable	Incontable	5×10^5	1×10^6	0	0.5×10^8	0.5×10^9	0
3ra esterilización	100	0	3×10^5	3.5×10^6	3×10^7	4.5×10^8	0	0

Tabla 14. Promedio y la desviación estándar de la longitud de las plántulas de lechuga y el número de hojas para todos los tratamientos con cadmio 25 ppm

	Control C2(L)	Control C2(SL)	Cd 25 ppm + SS	Cd 25 ppm + TSB	C2 + Cd 25 ppm (L)	C2 + Cd 25 ppm (SL)
Promedio en cm	2.43± 1.32	2.94± 0.91	2.28± 1.14	3.21± 1.36	2.89± 1.38	3.18± 1.3
Promedio de número de hojas	2.38± 0.65	2.68± 0.69	2.51± 0.5	3.53± 0.63	3.04± 0.69	3.42± 0.5

L: lavado, SL: sin lavar.

Tabla 15. Mediana y el rango intercuartílico de la longitud de las plántulas de lechuga y el número de hojas para todos los tratamientos con cadmio 50 ppm

	Cd 50 ppm + SS	Cd 50 ppm + TSB	C2 + Cd 50 ppm (L)	C2 + Cd 50 ppm (SL)
Mediana en cm	0.55± 0.5	1± 1	0.55± 0.5	0.6± 0.6
Mediana de número de hojas	2± 0	2± 0	2± 0	2± 0

L: lavado, SL: sin lavar.

ANEXO IV

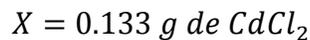
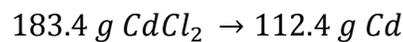
CÁLCULOS

- Cálculos para la concentración 100 ppm

$$\frac{\mu g \text{ Cd}}{g \text{ de suelo}} = \frac{\mu g \text{ Cd}}{820 \text{ gr de suelo}} = 100 \text{ ppm} \frac{\mu g}{g \text{ suelo}}$$

$$82000 \mu g \times \frac{1 g}{10^6 \mu g} = 0.082 g \text{ de Cd}$$

Se trabajó con CdCl_2 , por lo que:

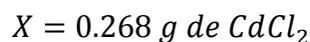
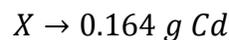
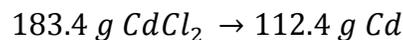


- Cálculos para la concentración 200 ppm

$$\frac{\mu g \text{ Cd}}{g \text{ de suelo}} = \frac{\mu g \text{ Cd}}{820 \text{ gr de suelo}} = 200 \text{ ppm} \frac{\mu g}{g \text{ suelo}}$$

$$164000 \mu g \times \frac{1 g}{10^6 \mu g} = 0.164 g \text{ de Cd}$$

Se trabajó con CdCl_2 , por lo que:



ANEXO V

FOTOGRAFÍAS

Figura 15. Fotografías de las plantas a los 3 meses para la cepa C2.



Control Cd 100 2



Cd 100+ C2 3

Figura 16. Fotografías de las plantas a los 3 meses para la cepa X.



Control Cd 100 3



Cd 100 + X 4