

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

A.G. Revoredo¹, J. Hurtado¹

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, Lab. Biotecnología
ambiental, Honorio Delgado 430, San Martín de Porras, Lima, Perú

Resumen

El Perú es un país productor de cacao por excelencia y actualmente afronta el problema de la presencia de cadmio en los suelos de algunas zonas cacaoteras que puede llevar a la acumulación de éste en las semillas de cacao. Este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad biorremediadora de 3 cepas de *Streptomyces*: *Streptomyces variabilis* (AB5 y X) y *Streptomyces sp.* (C2) en plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando dos concentraciones diferentes de cadmio: 100 y 200 ppm. Las variables que se analizaron fueron el tamaño de la planta y cantidad de hojas a los 26 días, 1 mes y 2 semanas, 2 y 3 meses. Adicionalmente a los 3 meses se midió el tamaño de la raíz, grosor del tallo, tamaño de la hoja y 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.

La cepa C2 fue la única con actividad biorremediadora comprobada ya que reduce la absorción de cadmio en un promedio de 39.67% en el tratamiento con Cd 100 ppm con respecto a su control ($p=0.58$). Las cepas X y AB5 no mostraron actividad biorremediadora. Se determinó que la cepa X fue la que prevaleció en el suelo al final del experimento.

Palabras clave: cacao, biorremediación, cadmio, actinomicetos

Introducción

En el Perú el cacao se cultiva en 12 0374 hectáreas, en varias regiones como Cusco, Piura, San Martín entre otras (1). Según el MINAG el 44% del cacao cultivado en nuestro país pertenece al cultivar Criollo y el 56% al cultivar CCN-51 y Forastero (2). Para este estudio 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 (3).

El cacao que se extrae no es solo para nuestro consumo interno, sino que también se exporta a los principales países de Europa y América consumidores de este producto, por lo que es mandatorio cumplir con las más altas exigencias de calidad. Según la OMS y la FAO, el nivel máximo de cadmio en un chocolate con un contenido de materia seca total de cacao <50% es de 0.6 mg/kg y de un chocolate con un contenido >50% es de 2 mg/kg (4). En enero del 2019 entra en vigencia el Reglamento de la Comisión de la comunidad europea No 188/2006, según el cual los niveles máximos para chocolates con un contenido de cacao >50% son de 0.8mg/kg, para chocolates con un contenido del 30-50% son de 0.3 mg/kg y para chocolates con leche con un contenido <30% 0.1 mg/kg (5).

El cadmio en el ser humano se absorbe de tres maneras: gastrointestinal, pulmonar y dérmica; cuando llega a la sangre es transportado por proteínas como la albumina. El primer órgano que se ve afectado luego de que el cadmio llega a la sangre es el hígado. Se le atribuye al cadmio problemas en el sistema respiratorio, en los riñones, sistema reproductivo y sistema esquelético (6). Se sabe que las plantas pueden fácilmente absorber el cadmio y otros metales pesados lo que genera un riesgo para nuestra salud cuando estas son destinadas al consumo humano (7). En algunas zonas de Tingo María se han encontrado niveles promedio de cadmio mayores a los permitidos en hojas foliares (2.84 ppm) y

almendras (1.55 ppm) de plantas de cacao (8). Los niveles permitidos para hojas foliares es de 0.05-0.5 ppm y para almendras es de 0.5 ppm según el comité de la FAO-OMS (9).

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecientes a la familia Streptomycetaceae son predominantes en el suelo (10). Para hacerle frente al estrés que ocasionan los metales pesados en el ambiente, *Streptomyces* ha desarrollado ciertos mecanismos como la excreción de moléculas quelantes o la unión de estos metales a la pared extracelular, entre otros (10–12). En el caso del cadmio se sabe que algunas cepas de *Streptomyces* son capaces de bioabsorberlo (13)

El presente estudio busca evaluar una alternativa al problema de contaminación de suelos por cadmio empleando *Streptomyces* con conocida actividad quelante de metales pesados (14).

Materiales y métodos

Material biológico: Se realizó el cultivo de 3 cepas diferentes de actinomicetos: AB5, X y C2. Las cepas fueron aisladas de trabajos previos: C2 (15), AB5 (16) y X (17) y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las cepas se cultivaron en tubos Falcon con 4 ml de caldo tripteína soya (TSB) 1/10. Se incubó las cepas en una estufa marca Bluepard a 28°C por 7 días hasta que se observó esporulación de las cepas.

Germinación de las semillas de cacao: Se colectaron las semillas del fruto del cacao, se les retiró el mucílago con viruta de madera y se desinfectaron primero con alcohol al 96% por 5 minutos, seguido de lejía comercial por 5 minutos y enjuague con agua destilada estéril 5 minutos 3 veces (18,19). Las semillas que se utilizaron para los tratamientos con cadmio y el control de las cepas se inocularon en 250 ml de caldo TSB que contiene la cepa por 40 minutos (20). Previamente se realizó el cultivo de la cepa respectiva 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.

Estandarización del proceso de esterilización de tierra: Se realizó una estandarización para obtener el número de veces que es necesario esterilizar la tierra para garantizar la menor carga microbiana: se esterilizó la tierra y se realizó un conteo de microorganismos luego de 3 días para determinar si se requiere una siguiente esterilización (21). Para el conteo se adicionó 10 gr de tierra en 90 ml de solución salina (dilución 10^{-1}), luego se extrajo 1 ml de esta solución para añadirla a un tubo con 9 ml de solución salina (dilución 10^{-2}). Se repitió este paso hasta llegar a la dilución 10^{-8} . Finalmente se sembró en placas con medio tripteína soya agar (TSA) 0.1 ml de cada dilución por duplicado.

Preparación de bolsas con tierra estéril: Se pesó 820 gr de tierra preparada en bolsas de polipropileno para luego esterilizarlas en un autoclave marca Greetmed modelo Yx2800 por 40 minutos a 15 libras de presión a 121°C. Se esterilizó la tierra 3 veces en intervalos de 3 días entre cada esterilización.

Trasplante de semillas: Luego de la germinación de las semillas por 20 días se procedió a trasplantarlas a las bolsas con tierra preparada estéril utilizando 4 plantas por cada tratamiento y por cada control (22). Para esto se procedió a retirar la semilla de los vasos en donde germinaron y se colocaron dentro de la bolsa con tierra. Los tratamientos fueron los siguientes: tratamiento con cadmio 100 y 200 ppm que se preparó agregando 0.133 gr y 0.268 gr respectivamente de cloruro de cadmio diluidos en 50 ml de agua. Para cada concentración de cadmio se agregó 4 ml de cultivo de la cepa lavada (14). Los controles son los siguientes: el control de cadmio 100 y 200 ppm (14) con 4 ml de solución salina; y el control de la cepa agregando solo 4 ml de cultivo lavado (14). Tanto el control de la cepa, como los tratamientos con cadmio se realizaron por cada cepa. Las plantas se colocaron en un espacio abierto sobre bandejas y se colocó encima una cubierta simulando un invernadero para darle las condiciones necesarias de sombra. Se regó las plantas con agua cada 2 a 3 días dependiendo del clima. La aplicación de cadmio y del cultivo de la cepa se realizó solo en el trasplante de las plantas a las bolsas con tierra estéril.

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

Análisis por espectrofotometría de absorción atómica: Luego de 3 meses de crecimiento, se analizaron las plantas de los controles cadmio: 100 y 200 ppm y los tratamientos cd 100+ cepa y cd 200+ cepa. Se realizó este análisis solo para las cepas X y C2. El análisis se llevó a cabo por el método de espectrofotometría de absorción atómica, para determinar si el cadmio fue absorbido por las plantas.

Conteo de microorganismos en el suelo: Después de realizar el análisis por espectrofotometría de absorción atómica, se realizó el conteo de microorganismos en el suelo de los siguientes tratamientos: Cd 100+ cepa, Cd 200+ cepa, Control cepa. Se realizó el conteo por cada cepa. Para esto se agregó 2 gr de muestra de tierra de cada tratamiento en 18 ml de solución salina, para realizar diluciones hasta 10^{-8} . Se sembró a partir de la dilución 10^{-5} en placas con agar XGal por triplicado. Se realizó el conteo de microorganismos luego de los 5 días.

Análisis estadístico: Los datos colectados se analizaron utilizando el programa estadístico STATA V.12 para Windows (StataCorp LLC, Houston, TX) para determinar si existe una diferencia significativa entre la absorción de plantas en tratamiento con las cepas y los controles con cadmio. Adicionalmente se analizó si había diferencias entre el control de la cepa X y los demás tratamientos. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar dichas diferencias. Para realizar las comparaciones múltiples se utilizó la prueba post-hoc de Dunnett. Las pruebas se realizaron con un nivel de significancia (α) de 0.1.

Resultados

Preparación de la tierra: En el conteo de microorganismos de una muestra de tierra esterilizada por primera vez se observa una gran cantidad de microorganismos en la mayoría de diluciones. 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 en donde se observó todavía una gran cantidad de microorganismos. Luego de la segunda esterilización se realizó otro conteo pasando 5 días en donde todavía se observa una gran cantidad de microorganismos por lo que se decide realizar una tercera esterilización. En la tercera esterilización se observa una notable disminución de las UFC/ml por lo que se decide no realizar más esterilizaciones.

Germinación y trasplante de semillas: Las semillas germinaron utilizando un algodón para envolverlas y luego fueron introducidas en vasos de plástico y puestas en oscuridad en donde crecieron exitosamente (Ver Fig. 1A). Pasadas las 3 semanas se procedió a hacer el trasplante a las bolsas con tierra previamente esterilizadas, colocadas en bandejas para ser llevadas al aire libre y cubiertas con una malla para protegerlas del sol (Ver Fig. 1B).



Figura 1. Se muestra a las plantas germinadas (A) y luego del trasplante a tierra (B)

Análisis de Cadmio

En el caso del cadmio absorbido por las plantas tratadas con la cepa C2, existe una diferencia significativa entre el control con cd 100 ppm y el tratamiento con cd 100 ppm + C2 ($p=0.0585$). En promedio la cepa C2 logro disminuir en un 39.67% la absorción de cadmio en el tratamiento con cd 100 ppm con respecto a su control cd 100 ppm. En el caso del tratamiento con cd 200 ppm logro disminuir la absorción en un 21.13% ($p=0.1673$). (Ver Fig. 2).

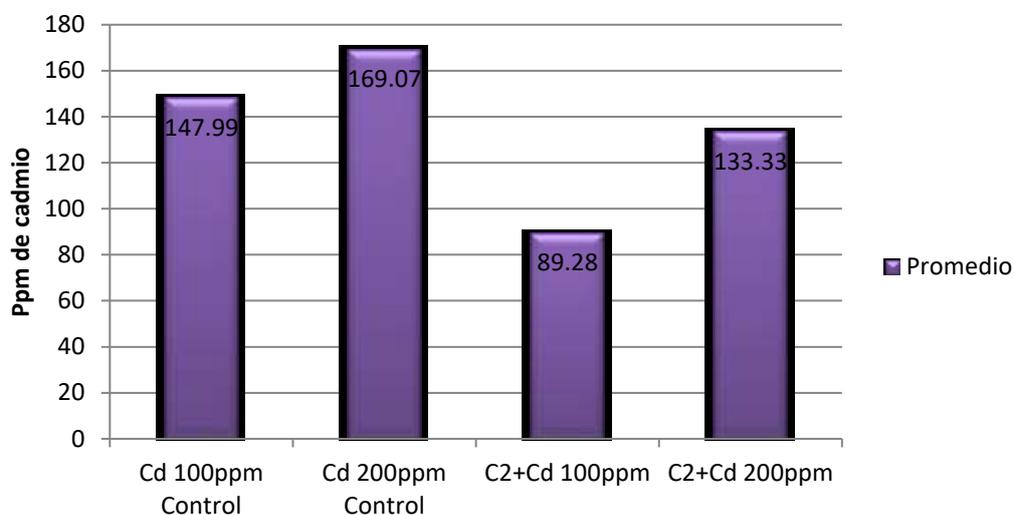


Figura 2. Absorción de cadmio para las plantas en tratamiento con la cepa C2.

Con la cepa X no existe una diferencia significativa entre el control con cd 100 ppm y el tratamiento con cd 100 ppm + X. Tampoco hay diferencias con el tratamiento con 200 ppm de cadmio. En promedio la cepa X no fue capaz de disminuir en la absorción de cadmio en un 16% en el tratamiento con cd 100 ppm con respecto a su control cd 100 ppm. En el caso del tratamiento con cd 200 ppm no logro disminuir la absorción en un 6%. (Ver Fig. 3)

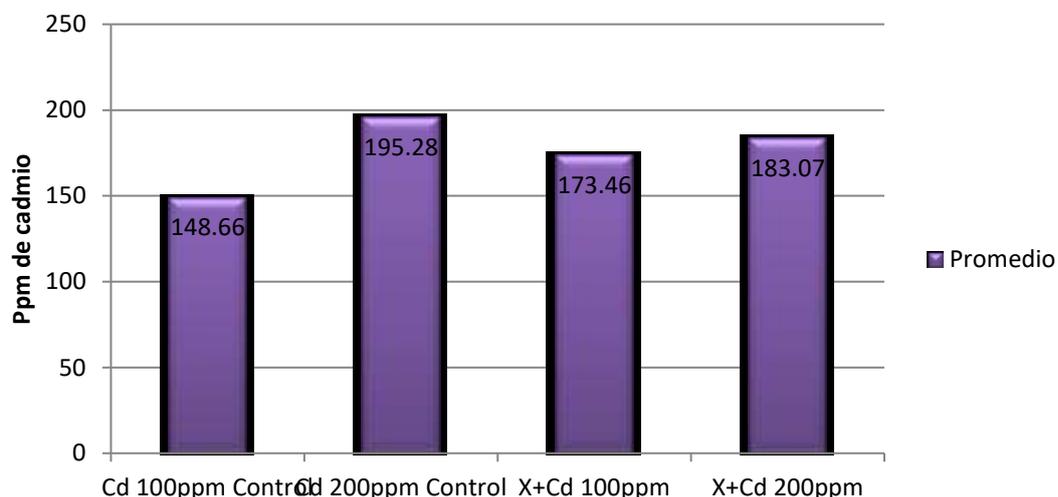


Figura 3. Absorción de cadmio para las plantas en tratamiento con la cepa X.

Prevalencia de microorganismos en el suelo

En el conteo de microorganismos en el suelo de la cepa AB5 luego de los 3 meses se observó que en el tratamiento de Cd 100ppm y la cepa no se encontró casi ninguna colonia correspondiente a esta. Lo mismo se observa en el tratamiento Cd 200 ppm y la cepa, sin embargo se observa un ligero aumento en la dilución 10^{-8} con respecto al tratamiento con Cd 100 ppm. En el caso del conteo de microorganismos para el control de la cepa si se observó un aumento en el número de colonias, en

especial en la dilución 10^{-8} en donde todas las colonias encontradas pertenecían a la cepa (Ver Tabla 1).

100+AB5		200+AB5		Control AB5	
o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)
	3×10^6	6	$\times 10^6$	$\times 10^6$	0^6

Tabla 1. Conteo de microorganismos de AB5 en tres diferentes tratamientos en UFC/ml.

Para la cepa X se encontró que en el conteo de microorganismos tanto para el tratamiento con Cd 100, Cd 200 y en control de la cepa; una gran cantidad de colonias. En especial resalta el número de colonias observadas en el tratamiento con Cd 200 ppm y X (Ver Tabla 2).

100+ X		200+X		Control X	
o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)
3×10^6	0^6	66×10^6	6	66×10^6	

Tabla 2. Conteo de microorganismos de X en tres diferentes tratamientos en UFC/ml.

En el caso de la cepa C2 en el tratamiento con Cd 100 ppm y C2 no se encontró un número importante de estos actinomicetos. Lo mismo ocurre en el tratamiento con Cd 200 ppm y C2 donde el número de colonias es casi inexistente para todas las diluciones. Para el conteo de microorganismos en el control de la cepa, se encontró un mayor número de colonias que en los tratamientos previamente mencionados (Ver Tabla 3).

100+C2		200+C2		Control C2	
o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)	o. (UFC)	(UFC)
6	0^6			6	6×10^6

Tabla 3. Conteo de microorganismos de C2 en tres diferentes tratamientos en UFC/ml.

Discusión

Para la esterilización del suelo se esterilizo la tierra 3 veces con un intervalo de 5 días entre cada esterilización para asegurar la mínima carga microbiana como se señala en estudios previos (23). En la última esterilización se obtuvo la menor carga microbiana en la menor dilución por lo que se pudo afirmar que el suelo ya se encontraba en óptimas condiciones. Este paso es también importante ya que nos brinda un sustrato ideal para la libre colonización de las cepas. Era necesario un suelo estéril para que no exista influencia alguna de otros microorganismos que pudieran alterar de cualquier manera el desenvolvimiento de las cepas. Luego se llevó a cabo la germinación de las semillas de cacao. Las semillas germinaron en vasos de plástico simples en condiciones de oscuridad, para garantizar que todas las plantas, que serán luego trasladadas a tierra estén vivas. Un paso importante para la germinación es retirar por completo el mucilago que cubre a estas semillas ya que de esa manera se acelera la maduración y se evita la fermentación (24). Pasadas 2 a 3 semanas se trasladó las semillas a la tierra estéril y se realizaron los tratamientos correspondientes.

En cuanto a los resultados de las variables biométricas obtenidos empleando la cepa X no se observó un aumento en el promedio del tamaño de las plantas en suelos contaminados con cadmio 100 y 200 ppm, en comparación a sus respectivos controles. La cepa X no fue capaz de cumplir con el objetivo principal de evitar la absorción de cadmio tanto para la concentración de 100 y 200 ppm. Esto se puede deber a que la cepa X no cuenta con los mecanismos necesarios para evitar la absorción de cadmio por parte de la planta. X fue la cepa más abundante en el suelo sin embargo, eso no le confirió la actividad biorremediadora esperada.

El tratamiento con la cepa AB5 logró resultados favorables al principio del experimento cuando fue utilizada en los tratamientos con suelos contaminados con cadmio 100 y 200 ppm. Se obtuvo un mayor promedio del tamaño de la planta en los tratamientos de cadmio 100 y 200 ppm con la cepa en comparación a sus respectivos controles y también en comparación al control agua. La cepa AB5 no cumplió con el objetivo de biorremediar el suelo contaminado con las concentraciones de 100 y 200 ppm ya que casi ninguna planta logro sobrevivir para poder ser posteriormente analizada. Esta afirmación se respalda con el conteo de microorganismos en el suelo en donde se aprecia la poca cantidad de colonias en las distintas diluciones.

Para la cepa C2 solo hubo un ligero aumento en el promedio del tamaño (25 cm) con el tratamiento de C2 con Cd 100 ppm en comparación a su control (24 cm), para el tratamiento con la cepa y Cd 200 ppm no hubo ninguna mejora con respecto a su control. En el análisis de absorción de cadmio (Ver fig.2) se observa que la cepa fue capaz de reducir el promedio de absorción en un 39.67% con el tratamiento con la cepa y Cd 100 ppm con respecto a su control ($p=0.0585$). Además redujo en un 21.13% el promedio absorción de cadmio con el tratamiento con la cepa y Cd 200 ppm, sin embargo este dato no es significativo ($p=0.1673$) Estos datos nos indican que la característica predominante de la cepa C2 es la de bioremedación. La habilidad de C2 para hacerle frente a este contaminante puede deberse a que absorbe extracelularmente el metal uniéndolo a su pared celular, esto es característico de las bacterias Gram positivas, también puede ser explicado por procesos de bioabsorción, queladores extracelulares entre otros mecanismos (25). A pesar de poseer actividad biorremediadora para la acumulación de cadmio en plantas de cacao, la cepa C2 no tuvo un buen recuento de colonias en los dos tratamientos, lo que podría indicar que no es necesaria una gran biomasa para que C2 ejerza su actividad biorremediadora.

Conclusión

De las 3 cepas estudiadas, la cepa C2 tiene actividad biorremediadora ya que reduce la absorción de cadmio en plantas de cacao, en un promedio de 39.67% en el tratamiento con Cd 100 ppm y la cepa, con respecto a su control ($p=0.58$) y reduce la absorción de cadmio en un promedio de 21.13% en el tratamiento con Cd 200 ppm y la cepa, con respecto a su control ($p=0.16$). Es necesario realizar estudios del efecto de esta cepa en suelos no estériles para ver su capacidad de competencia con la microbiota nativa existente en el suelo.

Bibliografía

1. OEEE-MINAG. Modulo de Consulta a la Base de Datos de la DGIA. [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 17]. Available from: <http://frenteweb.minagri.gob.pe/sisca/?mod=salida>
2. García Carrión LF. Cultivares de cacao del Perú. Minist Agric. 2012;112.
3. Doster N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hoja botánica: Cacao. Primera ed. Luebert F, editor. 2011. 19 p.
4. 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;(2014):20.
5. COMMISSION REGULATION (EC). COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 [Internet]. 2006 [cited 2017 Aug 31]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20150521>
6. 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;1:22.
7. Méndez P, Ramírez G, César A, Gutiérrez R, Alma D, García P. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Trop Subtrop Agroecosystems.

2009;10(1):29–44.

8. 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.
9. OMS-FAO. Evaluación de diversos aditivos alimentarios y los contaminantes: mercurio, plomo y cadmio. Información técnica No 50. 1997.
10. E.Kothe, C.Dimkapa, G.Haferburg, A. Schmidt, A SE. Streptomycete Heavy Metal Resistance: Extracellular and Intracellular Mechanisms. Vol. 19, Soil boil. 2010. 225-235 p.
11. Kothe E, Bergmann H, Büchel G. Molecular mechanisms in bio-geo-interactions: From a case study to general mechanisms. *Chemie der Erde - Geochemistry*. 2005;65(SUPPL. 1):7–27.
12. Haferburg G, Kothe E. Microbes and metals: Interactions in the environment. *J Basic Microbiol*. 2007;47(6):453–67.
13. 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;44(2):129–32.
14. Pacheco S. Determinacion de la capacidad biofertilizante de actinomicetos. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
15. 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 p. 86–95.
16. Hurtado JE. Aislamiento, purificación y presencia de plasmidos en cepas nativas de Thiobacillus ferrooxidans. Univerisdad Peruana Cayetano Heredia; 1984.
17. Hurtado JE. Variaciones bioquimicas y geneticas durante la seleccion de cepas de Acidithiobacillus ferrooxidans resistentes a arsenico lixiviado de concentrados refractarios de arsenopirita. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2003.
18. Kortemaa H, Rita H, Haahtela K, Smolander A. Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant Soil* [Internet]. 1994 Jun [cited 2017 Apr 17];163(1):77–83. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00033943>
19. Zuñiga D. Manual de microbiologia agricola: Rhizobium , PGPR , indicadores de fertilidad e inocuidad. Primera ed. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
20. 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;12(1):137–53.
21. Díaz Vargas P, Ferrera-Cerrato R, Almaraz-Suárez JJ, González GA. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra* [Internet]. 2001 [cited 2017 Apr 17]; Available from: <https://chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art327-335.pdf>
22. 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;7(AUG):1–11.
23. Trevors JT. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J Microbiol Methods*. 1996;26(1–2):53–9.
24. Frederick H. Manual de Cacao. Edicion en. Antonio Lehmann; 1961. 12-13 p.
25. Schütze, Eileen ; Kothe E. Heavy Metal-Resistant Streptomycetes in Soil. In: Kothe, Erika, Varma A, editor. *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils* [Internet]. Heidelberg. 2012. p. 163–82.

