UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de la bioprecipitación de cadmio por bacterias ureolíticas aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia

Juan Camilo Diez Marulanda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia
2022

Estudio de la bioprecipitación de cadmio por bacterias ureolíticas aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia

Juan Camilo Diez Marulanda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Bioquímica

Director:

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental

Grupo de Investigación:

GERMINA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2022

A mis padres, Amanda y Ricardo, a mis hermanos, Johana y Jhon, y a mi perrita, Lilo, por todo su apoyo incondicional.

Declaración de obra original

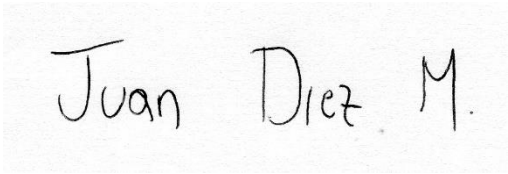
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Juan Camilo Diez Marulanda

Fecha 04/10/2022

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, Ph.D. Pedro Filipe de Brito Brandão, por su paciencia, dirección y acompañamiento durante toda la maestría. También, quiero agradecer a los miembros del grupo de investigación GERMINA, por todo el apoyo académico y personal, y por las discusiones constructivas alrededor de mi trabajo. Un agradecimiento especial a Miguel Ángel Beltrán y la Asociación de Campesinos Vecinos del Parque Natural Nacional Serranía de los Yariguies (ASOCAPAYARI), por dar acceso a las muestras de suelo usadas en este trabajo, por la ayuda suministrada durante el muestreo del suelo, y por compartir sus profundos conocimientos sobre el cacao y sus problemáticas. Muchas gracias a la profesora Ph.D. Esperanza Torres Rojas y la ingeniera Juliana Miranda, del Laboratorio de Agrobiotecnología del Departamento de Ciencias Agrarias de la UNAL, por toda su colaboración en el trabajo con ARN. Asimismo, me gustaría reconocer la ayuda brindada por la profesora Ph.D. Ibonne Aydee Garcia Romero para la cuantificación de ADNc y el trabajo en biología molecular. Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia (MinAmbiente) por los permisos de colecta y acceso a recursos genéticos (Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 – Otrosí No. 17). Igualmente, se agradece por el financiamiento a la Dirección de Investigación y Extensión sede Bogotá (DIEB), Universidad Nacional de Colombia (proyectos 37691 y 48328), y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (MinCiencias) (proyecto 110180863795/CT-190-2019). Por último, pero no menos importante, quisiera agradecerle profundamente a mi familia, amigos y amigas por todo su apoyo emocional y motivación, lo cual mantuvo mi espíritu en alto y me permitió seguir adelante con esta tesis.

Resumen

Estudio de la bioprecipitación de cadmio por bacterias ureolíticas aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico que causa problemas graves a la salud y está presente en suelos con importancia de agricultura en Colombia, como aquellos usados para el cultivo de cacao. Este metal, en su forma catiónica, puede ser tomado por la planta de cacao y bioacumulado en sus órganos. De esta forma, el Cd puede llegar a los humanos por medio del consumo de productos basados en cacao. Debido a este problema, en 2019 la Unión Europea adicionó algunos alimentos en base de cacao (ej.: chocolate, cocoa) al reglamento 1881 de 2006 que regula la cantidad de Cd en alimentos, lo cual implica una problemática para los cultivadores y exportadores de cacao del país, particularmente de Santander al tener algunos suelos con presencia de Cd y ser el mayor productor a nivel nacional. Recientemente, se ha propuesto el uso de bacterias ureolíticas por el método de precipitación de carbonatos inducida por microorganismos (MICP, por sus siglas en inglés *Microbiologically Induced Carbonate Precipitation*) como medida para mitigar la disponibilidad de Cd(II) en suelos contaminados. Así, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad para bioprecipitar Cd de una selección de bacterias ureolíticas resistentes al metal, aisladas de fincas cacaoteras de El Carmen de Chucurí, Santander. Tres bacterias ureolíticas Gram negativas resistentes a Cd, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, fueron seleccionadas basado en su actividad ureasa, formación de precipitados y crecimiento en medios de cultivo con Cd. Estas bacterias exhibieron bajas actividades ureasa (3,09; 1,34 y 0,31 µmol NH_4^+ mL^{-1} h^{-1}, respectivamente), pero tuvieron la capacidad de elevar el pH a valores cercanos a 9.0 y de producir precipitados. Se probó que el Cd(II) afecta el crecimiento de las bacterias seleccionados; sin embargo, su actividad ureasa no fue influenciada negativamente. Por otro lado, la presencia de 250 µM Ni(II) en el medio de cultivo aumentó significativamente la actividad ureasa de *Acinetobacter* sp. 6a, mientras que no hubo un efecto considerable para las dos bacterias *Serratia*. El crecimiento de *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b se inhibió desde 4 mM de Cd(II) en el medio de cultivo, en tanto *Acinetobacter* sp. 6a presentó inhibición a 1 mM de Cd(II), por lo que se concluye que las tres bacterias pueden vivir en concentraciones más altas que aquellas encontradas en los suelos a tratar. Con respecto a la eficacia de

remoción, para una concentración inicial de 0,05 mM de Cd(II) en medio líquido, se encontraron porcentajes máximos de remoción de 99,70%, 99,62% y 91,23% para *Serratia* sp. 4.1a*, Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, respectivamente, mientras que para 0,15 mM de Cd(II) inicial, las remociones fueron de 99,30%, 99,57% y 98,87%, respectivamente. Los precipitados producidos por las bacterias *Serratia* durante el proceso de remoción de Cd, fueron identificados como calcita por DRX, encontrando también por EDX que parte del Cd se inmovilizó en esta matriz. Por último, se determinó la presencia de un gen de resistencia a Cd, parte del operón *czc*, en *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a. Se pudo observar que la presencia del metal no tuvo un efecto significativo sobre su expresión, pero la presencia de urea sí. Considerando toda la información anterior, este trabajo evidencia el potencial uso de las tres bacterias seleccionadas para aplicaciones en tratamientos de muestras ambientales contaminadas con Cd. Además, es de los pocos reportes de uso de bacterias del género *Serratia* para remediar Cd, y aparentemente el primero en reportar la expresión diferencial de un gen de resistencia a Cd por acción de la urea.

Palabras clave: MICP; actividad ureasa; cadmio; biorremediación; cacao; *Serratia*; *Acinetobacter*.

Abstract

Study of cadmium bioprecipitation by ureolytic bacteria isolated from cocoa farms in Santander, Colombia

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal that causes serious health problems and is present in agriculturally important soils in Colombia, such as those used for cocoa production. This metal, in its cationic form, can be taken up by the cocoa plant and bioaccumulated in its organs. In this way, Cd can reach humans through the consumption of cocoa-based products. Due to this problem, in 2019 the European Union added some cocoa-based foods (e.g., chocolate, cocoa) to regulation 1881 of 2006 that controls the amount of Cd in food, which implies a problem for cocoa growers and exporters in the country, particularly in Santander as it has presence of Cd in some soils, and it is the largest producer at national level. Recently, the use of ureolytic bacteria by the Microbiologically Induced Carbonate Precipitation (MICP) method has been proposed as a measure to mitigate the availability

of Cd(II) in contaminated soils. Thus, the objective of the present work was to evaluate the capacity to bioprecipitate Cd of a selection of ureolytic bacteria resistant to the metal, isolated from cocoa farms in El Carmen de Chucurí, Santander. Three Gram negative ureolytic – Cd resistant bacteria, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b and *Acinetobacter* sp. 6a, were selected based on their urease activity, precipitates formation and growth in culture media containing Cd. These bacteria exhibited low urease activities (3.09, 1.34 and 0.31 µmol NH_4^+ mL^{-1} h^{-1}, respectively), but had the ability to raise pH to values close to 9.0 and to produce precipitates. Cd(II) was proven to affect the growth of selected bacteria; however, their urease activity was not negatively influenced. On the other hand, the presence of 250 µM Ni(II) in the culture medium significantly increased the urease activity of *Acinetobacter* sp. 6a, while there was no considerable effect for the two *Serratia* bacteria. The growth of *Serratia* sp. 4.1a and *Serratia* sp. 5b was inhibited at 4mM Cd(II) in the culture medium, while *Acinetobacter* sp. 6a was inhibited at 1 mM Cd(II), thus concluding that the three bacteria can live at higher concentrations than those found in the soils to be treated. Regarding removal efficiency, for an initial concentration of 0.05 mM Cd(II) in liquid medium, maximum removal percentages of 99.70%, 99.62% and 91.23% were determined for *Serratia* sp. 4.1a*, Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, respectively; while for 0.15 mM initial Cd(II), removals were 99.30%, 99.57% and 98.87%, respectively. The precipitates produced by the *Serratia* bacteria during the Cd removal process were identified as calcite by XRD, also finding by EDX analysis that part of the Cd was immobilized in this matrix. Finally, the presence of a Cd resistance gene, part of the *czc* operon, was determined in *Serratia* sp. 5b and *Acinetobacter* sp. 6a. It was observed that presence of the metal did not have a significant effect on its expression, but the presence of urea did. Considering all the above information, this work evidences the potential use of the three selected bacteria for applications in the treatment of Cd-contaminated environmental samples. In addition, it is one of the few works reporting the use of bacteria belonging to the genus *Serratia* for Cd remediation, and apparently the first to report the differential expression of a Cd resistance gene due to presence of urea.

Keywords: MICP; urease activity; cadmium; bioremediation; cocoa; *Serratia*; *Acinetobacter*.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VI**

Lista de figuras ..... **XI**

Lista de tablas ..... **XIII**

Lista de abreviaturas ..... **XIV**

1. Introducción **1**
1.1 Marco teórico 1
1.1.1 Características del cadmio 1
1.1.2 Problemática del cadmio con relación al cacao 2
1.1.3 Remediación de metales pesados en el ambiente 3
1.1.4 Biorremediación de metales pesados usando bacterias 5
1.2 Estado del arte 7
1.3 Justificación y planteamiento del problema 9

Objetivos **11**

2. Caracterización y selección de bacterias ureolíticas resistentes a Cd aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia **12**
2.1 Introducción 12
2.2 Materiales y métodos 13
2.2.1 Reactivos químicos 13
2.2.2 Aislamiento de bacterias ureolíticas resistentes a Cd 14
2.2.3 Derreplicación molecular e identificación de los aislados 14
2.2.4 Caracterización y selección de los aislados 15
2.2.5 Efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa 18
2.2.6 Análisis estadístico 19
2.3 Resultados y discusión 20
2.3.1 Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a Cd que inducen la precipitación de carbonato 20
2.3.2 Actividad ureasa y selección de aislados 27
2.3.3 Efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa 28
2.4 Conclusiones 34

3. Potencial de biorremediación de Cd basado en la precipitación de carbonatos por *Serratia* spp. y *Acinetobacter* sp. aisladas de suelos de fincas cacaoteras en Santander, Colombia **36**
3.1 Introducción 36
3.2 Materiales y métodos 38
3.2.1 Reactivos químicos 38
3.2.2 Microorganismos y medios de cultivo 38
3.2.3 Efecto del Ni(II) sobre la actividad ureasa 39
3.2.4 Ensayo de resistencia a Cd 39
3.2.5 Experimentos de bioprecipitación de Cd 40
- Remoción de Cd en solución 40

- Producción y obtención de precipitados 40

3.2.6 Análisis de los precipitados 41

- Microscopía óptica y análisis cualitativo de carbonatos 41
- Caracterización por DRX y SEM-EDX 42

3.2.7 Amplificación por PCR de genes de resistencia a Cd 42

3.2.8 Experimentos de RT-qPCR 43

3.2.9 Análisis estadístico 45

3.3 Resultados y discusión 46

3.3.1 Efecto del Ni(II) sobre la actividad ureasa 46

3.3.2 Resistencia de las bacterias a Cd 48

3.3.3 Remoción de Cd en solución 50

3.3.4 Análisis de los precipitados producidos por MICP 53

- Microscopía óptica y análisis cualitativo de carbonatos 53
- Análisis por DRX 56
- Análisis por SEM-EDX 59

3.3.5 Genes de resistencia a Cd presentes en las bacterias 63

3.3.6 Expresión diferencial del gen *czc* 65

3.4 Conclusiones 68

4. Conclusiones y recomendaciones 70

4.1 Conclusiones 70

4.2 Recomendaciones 71

Anexos 73

- **Anexo A-1:** Primers usados en el trabajo. 73
- **Anexo A-2:** Interferencia/inhibición de los medios de cultivo sobre la cuantificación de amonio por el método de fenol-hipoclorito modificado. 74
- **Anexo A-3:** Esquema del diseño experimental alternativo usado debido a las restricciones de acceso al laboratorio por el COVID-19. 75
- **Anexo A-4:** Código de R usado para hacer el análisis de regresión de modelo mixto con ajuste polinómico ortogonal. 75
- **Anexo A-5:** Precipitados mostrando diferentes morfologías. 80
- **Anexo A-6:** Análisis de integridad, pureza y cuantificación del ARN extraído. 81
- **Anexo A-7:** Prueba de la eficacia de la ADNasa I usada para remover el ADNg remanente en el ARN extraído. 82
- **Anexo A-8:** Curvas de eficiencia de los primers usados en los experimentos de RT-qPCR. 82

Referencias 83

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Interacciones más relevantes entre bacterias y metales tóxicos. 7
Figura 1-2: Reacciones involucradas en el proceso MICP ureolítico. 8
Figura 2-1: Cuantificación de la actividad ureasa por el método de fenol-hipoclorito modificado. 17
Figura 2-2: Coloración formada en la reacción de cuantificación de actividad ureasa por el método de fenol-hipoclorito modificado. 17
Figura 2-3: Esquema general para estudiar el efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa de los aislados seleccionados. 19
Figura 2-4: Fotografías de los aislados mostrando sus características morfológicas y su condición Gram. 22
Figura 2-5: Perfiles de PCR-SSCP del gen parcial *16S rRNA V4-V5* para los 13 aislados. 25
Figura 2-6: Cladograma bayesiano de las secuencias del gen *16S rRNA*, que representa las relaciones filogenéticas de los aislados bacterianos y las cepas de referencia. 26
Figura 2-7: Precipitados producidos por los tres aislados seleccionados incubados en LB + urea (30 g L^{-1}) + Ca(II) (20,4 mM) durante 5 días a 30 °C. 27
Figura 2-8: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado *Serratia* sp. 4.1a. 32
Figura 2-9: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado *Serratia* sp. 5b. 33
Figura 2-10: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado *Acinetobacter* sp. 6a. 34
Figura 3-1: Efecto de diferentes concentraciones de Ni(II) sobre el pH del medio de cultivo. 47
Figura 3-2: Efecto de diferentes concentraciones de Ni(II) sobre la producción de amonio. 48
Figura 3-3: Crecimiento bacteriano de las bacterias *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en diferentes concentraciones de Cd(II). 49
Figura 3-4: Remoción de Cd(II) por *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido LB + urea (30 g L^{-1}) suplementado con Ca(II) (6,80 mM) y Cd(II) (0,05 mM). 52
Figura 3-5: Remoción de Cd(II) por *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido LB + urea (30 g L^{-1}) suplementado con Ca(II) (6,80 mM) y Cd(II) (0,15 mM). 53
Figura 3-6: Precipitados producidos por las tres bacterias incubadas en medio sólido LB + urea (30 g L^{-1}) + Ca(II) (20,4 mM) + Cd(II) (0,15 mM). 55
Figura 3-7: Prueba cualitativa de carbonatos realizada con HCl 1,2 M. 56
Figura 3-8: Patrones de DRX de los precipitados generados por *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b en medio sólido, y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido. 58

Figura 3-9: Comparación de los patrones de DRX de los diferentes procedimientos de obtención de precipitados usados. 59
Figura 3-10: Micrografías de SEM y sus respectivos espectros EDX de los precipitados producidos por *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b. 62
Figura 3-11: Electroforesis de los productos de PCR de los genes de resistencia a Cd. 64
Figura 3-12: Estabilidad de los genes de referencia en las condiciones estudiadas. 66
Figura 3-13: Dot blot de la expresión del gen *czc* de *Serratia* sp. 5b normalizado frente a los tres genes de referencia usados, para los tres diferentes tratamientos estudiados (LB + Urea; LB + Urea + Cd(II); LB + Cd(II)). 68

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Comparación de algunas características de los métodos para la remediación de metales tóxicos en el ambiente. 3
Tabla 2-1: Identificación y caracterización de las bacterias ureolíticas resistentes a Cd(II) aisladas de suelos cacaoteros de Santander, Colombia..... 21
Tabla 3-1: Eficiencias calculadas a partir de las curvas de eficiencia para cada par de primers usados en los experimentos de RT-qPCR. 65

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosomal
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSE	Back Scattered Electrons
Ca(II)	Calcio(II)
Cd	Cadmio
Cd(II)	Cadmio(II)
CDF	Cation Diffusion Facilitator
CEC	Cation Exchange Capacity
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Co	Cobalto
Cq	Quantification Cycle
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DRX	Difracción de Rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F-AAS	Flame Atomic Absorption Spectroscopy
FD	Factor de Dilución
GOI	Gene Of Interest
Hg	Mercurio
HMA	Heavy Metal P_{1B} - ATPase
LB	Lysogeny Broth
MICP	Microbiologically Induced Carbonate Precipitation
Ni(II)	Niquel(II)
NRAMP	Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins
OD_{600}	Densidad óptica medida a 600 nm
Pb	Plomo
PCR	Polymerase Chain Reaction
PP	Probabilidad Posterior
PVP-40	Polivinilpirrolidona peso molecular 40000
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
SD	Standard Deviation
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE-SDS	Tris/EDTA-Dodecil sulfato de sodio
SE	Secondary Electrons
SEM-EDX	Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive X-Ray
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
TE	Tris/EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar

Abreviatura	Término
TSB	Tryptic Soy Broth
ZIP	Zrt/Irt-like Protein
Zn	Zinc

1. Introducción

1.1 Marco teórico

1.1.1 Características del cadmio

El Cd(II) es un catión metálico sumamente tóxico a concentraciones bajas, que se puede acumular rápidamente en el hígado y riñón humano a través de los alimentos contaminados (por ejemplo, chocolate), lo que produce enfermedades asociadas al hígado, los huesos, entre otras (Zhao *et al.*, 2016). El mecanismo de toxicidad del Cd(II) es complejo, pero esencialmente altera la maquinaria de detección de metales de la célula, lo que hace que no funcione correctamente y se bombeen los iones metálicos incorrectos, por lo que los iones esenciales (Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}) no se transportarán eficientemente (Das & Dash, 2017). Generalmente, este ion metálico posee un número de coordinación de 6 y se puede encontrar formando complejos octaédricos en minerales de ocurrencia natural (Das & Dash, 2017). Por otro lado, este metal es introducido al ambiente por actividades antropogénicas como la fundición de zinc, incineración de residuos electrónicos, uso de combustibles, producción de petróleo y uso de fertilizantes en la agricultura (Das & Dash, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2021). El Cd se puede encontrar en forma biodisponible o en forma no reactiva según las condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo, tales como capacidad de intercambio catiónico (CEC), pH, contenido de materia orgánica, diversidad de microorganismos presentes, entre otras. La CEC es la capacidad total de un suelo para retener cationes intercambiables; una CEC alta implica una alta capacidad de la superficie de las partículas en el suelo para retener e inmovilizar cationes como el Cd(II) (Meter *et al*., 2019). El pH es uno de los parámetros más importantes que influencian la biodisponibilidad del metal, ya que al aumentar el pH también aumenta la CEC, por lo que los iones Cd(II) van a estar fuertemente unidos a las partículas de suelo y no va a estar disponible para ser tomado por organismos vivos (Adriano, 2001; Meter *et al*., 2019). El contenido de materia orgánica del suelo afecta la biodisponibilidad del Cd(II) debido a que tiene una alta CEC, a la presencia de grupos quelantes con potencial de inmovilización de iones, y puede modificar otras propiedades del suelo como el pH (Adriano, 2001; Meter *et al*., 2019).

Algunas plantas, como el cacao (*Theobroma cacao* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.), pueden bioacumular el Cd(II) cuando lo toman de suelos contaminados (Lin *et al.*, 2016; Meter *et al.*, 2019). La toma de Cd(II) por parte de las plantas acumuladoras se da por procesos de transporte específicos o inespecíficos que usa la planta para tomar micro y macro nutrientes del suelo. Después de tomar el metal por las raíces, éste viaja por el xilema hasta las hojas, donde se transporta activamente hacia el floema que lo lleva hacia los frutos, o directamente pasa del xilema a los frutos (Meter *et al*., 2019). Regularmente, la concentración de Cd(II) es mayor en las hojas, seguido por el pericarpio (cáscara) y los granos, debido al transporte primario por el xilema hacia las hojas. Se han identificado varias familias de genes de transportadores de membrana que están involucrados en la toma y transporte del Cd(II) en las plantas; entre estos se incluyen las ATPasas de metales pesados (HMA), las que codifican para proteínas tipo ZRT/IRT (ZIP), y las que producen proteínas naturales de macrófagos asociadas a resistencia (NRAMP) (Guo *et al.*, 2016; Meter *et al.*, 2019). Estas familias de genes son altamente conservadas en plantas y parecen tener homólogos en el genoma del cacao (Meter *et al*., 2019).

1.1.2 Problemática del cadmio con relación al cacao

El cultivo de cacao en Colombia es una actividad importante para el sector agropecuario del país, presentando una tendencia al incremento en la producción, un aumento en las exportaciones y una disminución en las importaciones desde 2011 hasta el 2021 (Federación Nacional de Cacaoteros [FEDECACAO], 2021). La producción y área sembrada/cosechada de cacao en Colombia se encuentran actualmente en la quinta posición de los cultivos agroindustriales (Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE], 2020) precedido por los cultivos en los que se basa la economía del país, como el café, la palma de aceite y la caña de azúcar. Según las estadísticas de la Federación Nacional de Cacaoteros (2021), el departamento con mayor producción de cacao en el país es Santander, donde el municipio de El Carmen de Chucurí es de gran impacto en este rubro. Actualmente, los países europeos consumen cerca del 50% del cacao a nivel mundial, pero no lo producen en su territorio (European Commission, 2019), por lo que Europa se convierte en un lugar potencial para la exportación de productos del cultivo. En 2019 la Unión Europea adicionó algunos alimentos en base de cacao (ej.: chocolate, cocoa) al reglamento 1881 de 2006 que regula la cantidad de cadmio en alimentos (European Commission, 2019), estableciendo los siguientes niveles máximos del metal en productos de cacao: límite de 0,10 mg kg^{-1} para productos con 30% o menor

cantidad de cacao, límite de 0,30 mg kg^{-1} para productos entre 30% y 50% de cacao, límite de 0,80 mg kg^{-1} para productos con más de 50% de cacao, y 0,60 mg kg^{-1} para cocoa. En los últimos años se han detectado niveles altos de Cd(II) en suelos de Santander y granos de cacao obtenidos de esta zona (Bravo *et al.*, 2021), por lo que la acumulación del metal tóxico en los frutos de cacao es una realidad para los productores del país. Lo anterior se ha vuelto una gran problemática para muchos cultivadores de cacao en Colombia que exportan sus productos, y para la economía del país en general. Por ello, se hace imperativo buscar opciones para remediar el problema del Cd en suelos cacaoteros y productos derivados.

1.1.3 Remediación de metales pesados en el ambiente

Existen diferentes métodos para la remediación de metales tóxicos, y se pueden clasificar en tres grupos: físicos, químicos y biológicos (Tabla 1-1). Cada método tiene sus ventajas y desventajas, pero los métodos biológicos son los que han mostrado resultados más atractivos, siendo más económicos, eco amigables y sencillos de usar.

Tabla 1-1: Comparación de algunas características de los métodos para la remediación de metales tóxicos en el ambiente. Adaptado de Sharma *et al.* (2018) y Khalid *et al.* (2017).

Característica	Físicos*	Químicos*	Biológicos*
Efectividad	✓	✓	✓
Facilidad de aplicación	X	✓	✓
Eco amigable	X	X	✓
Viable económicamente	X	X	✓
Sin contaminación secundaria	✓	X	✓
No requiere procesamiento adicional	X	X	✓
Aplicación en sitios altamente contaminados	✓	✓	X

*El símbolo ✓ hace referencia a que los métodos cumplen la característica indicada, mientras que X denota que el método no cumple la característica o no la cumple tan bien comparado con los otros dos métodos.

Los métodos físicos pueden llegar a remover prácticamente cualquier contaminante presente en el medio ambiente, pero son costosos y requieren procesamiento adicional. Entre estos se encuentran el tratamiento por temperatura (Yao *et al.*, 2012), la

electrorremediación (Khalid *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018), el reemplazo de suelo (Yao *et al*., 2012), y la vitrificación (Sharma *et al*., 2018). Los métodos químicos son más usados por su alta eficiencia y facilidad para remover los metales tóxicos, pero, al igual que los métodos físicos, requieren procesamiento adicional y no son amigables con el ambiente. Entre estos están la precipitación química (Sharma *et al.*, 2018), el uso de intercambiadores iónicos (Sharma *et al.*, 2018), la lixiviación química (Khalid *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2012), y la fijación química (Sharma *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2012). Por último, están los métodos biológicos que son las opciones que presentan mayores ventajas, ya que se pueden reestablecer las condiciones naturales del suelo sin afectar considerablemente la microbiota allí presente, y son técnicas más sencillas de usar y económicas. La principal desventaja de estos métodos es que su uso está limitado según la concentración del metal contaminante y la resistencia que muestre el organismo frente a la presencia del metal; además, como se trabaja con organismos vivos, su eficiencia está condicionada por diferentes factores como temperatura, humedad, concentración de oxígeno y pH.

Los métodos biológicos de remediación, o biorremediación, se pueden clasificar por el tipo de organismo que se usa: remediación animal, fitorremediación y remediación microbiana (Sharma *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2012) o por el mecanismo involucrado en la remediación (Das & Dash, 2017): biotransformación, donde el contaminante se transforma en un compuesto inofensivo o menos tóxico; biosorción, en la cual se dan procesos de adsorción de cationes tóxicos sobre la pared celular de microorganismos; y la bioacumulación del contaminante dentro del organismo remediador. Lo ideal en esta clase de técnicas es usar organismos endógenos del ambiente que se va a tratar, para alterar lo más mínimo las interacciones complejas de la biota natural del lugar, aunque también se ha reportado el uso de microorganismos modificados genéticamente y plantas transgénicas para mejorar su capacidad biorremediadora (Das & Dash, 2017; Sharma *et al.*, 2018). La remediación animal y la fitorremediación tienen grandes desventajas con respecto a la remediación microbiana, incluyendo las limitaciones de condiciones de crecimiento de los organismos y los largos tiempos por cada ciclo de remediación (Zhao *et al.*, 2016). Los procesos de remediación microbiana se pueden llevar a cabo *in situ* o *ex situ*, siendo el primero más recomendable que el segundo. La biorremediación *in situ* consiste en eliminar el contaminante directamente en el sitio problema o inmovilizarlo, en el caso de los metales tóxicos, para disminuir su biodisponibilidad; mientras que la biorremediación *ex situ* se lleva

a cabo removiendo el suelo o bombeando el agua contaminada para aplicar la enmienda fuera del lugar (Das & Dash, 2017). La técnica *in situ* se puede realizar de dos formas (Das & Dash, 2017): i) se estimula el crecimiento de la población de microorganismos remediadores, mediante la introducción de nutrientes para aumentar su actividad metabólica (bioestimulación), o ii) se introducen ciertos microrganismos, ya sean endógenos o manipulados genéticamente, al medio contaminado para que realicen la actividad remediadora (bioaumentación).

1.1.4 Biorremediación de metales pesados usando bacterias

Entre los microorganismos más usados en biorremediación están las bacterias, ya que son altamente adaptables, poseen elementos extracromosomales (como los plásmidos) que pueden presentar genes que codifican para la resistencia a los metales pesados, se puede dar transferencia horizontal de esos genes, tienen un tiempo de generación corto, y son pequeñas y fáciles de manejar (Das & Dash, 2017). Las bacterias que viven en sitios contaminados con metales tóxicos han desarrollado mecanismos de protección contra estos contaminantes (Figura 1-1), de los cuales los transportadores de metales pesados y los fijadores de metales son los más importantes (Abbas *et al.*, 2017; Jain & Bhatt, 2014; Naz *et al.*, 2005). Estos mecanismos se pueden clasificar en pasivos o activos. Entre los mecanismos pasivos están la unión a la pared celular (biosorción y complejación con grupos funcionales presentes en la pared) y la complejación extracelular (producción de sustancias poliméricas extracelulares y sideróforos) (Abbas *et al.*, 2017). Entre los mecanismos activos están la bioprecipitación y biorreducción por acción enzimática, la bioacumulación intracelular, la expulsión del metal (eflujo) por proteínas de membrana, la producción de metalotioneínas, que son proteínas ricas en cisteína para inmovilizar los cationes metálicos dentro de la célula, entre otras (Abbas *et al.*, 2017; Das & Dash, 2017). Con respecto al Cd, los genes u operones más comunes que confieren resistencia a las bacterias son el operón *cad*, que es común en Gram positivas y codifica para una ATPasa tipo P de eflujo de Cd^{2+} (Das & Dash, 2017; Jain & Bhatt, 2013; Naz *et al.*, 2005; Nongkhlaw & Joshi; 2019; Oger *et al.*, 2003); el operón *czc*, común en Gram negativas y que codifica para una bomba de eflujo de Co/Zn/Cd (Das & Dash, 2017; Jain & Bhatt, 2013; Karelová *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2019; Nongkhlaw & Joshi; 2019; Roosa *et al.*, 2014); el gen *smtAB*, que codifica para las metalotioneínas (Khan *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016; Naz *et al.*, 2005); el gen *zntA*, que codifica para una ATPasa que transporta Pb, Cd, Zn y Hg (Khan *et al.*, 2017; Vidhyaparkavi *et al.*, 2017); y el gen *nccA*, que codifica para una proteína de

eflujo de Ni/Co/Cd perteneciente a la familia RND (Kamika & Momba, 2013; Karelová *et al.*, 2011; Roosa *et al.*, 2014). Además, la asociación entre resistencia múltiple a los antibióticos y la resistencia al Cd en bacterias se ha documentado ampliamente en los últimos años (Abbas *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2019). También, es importante notar que la expresión de estos genes puede depender de la presencia de Cd y darse de forma diferencial como respuesta frente al estrés del metal (Huang *et al.*, 2022), como fue determinado por Chi *et al.* (2020), en cuyo trabajo se reportan cambios en la expresión de algunos genes relacionados con la resistencia a Cd en *Bacillus*, en presencia y ausencia del metal.

Todos estos mecanismos, que la bacteria usa para defenderse del estrés de los metales tóxicos, están siendo y han sido estudiados para proponer métodos de biorremediación efectivos y amigables con el medio ambiente, tomando provecho de la defensa natural que estos microorganismos han desarrollado. Ejemplos de uso de bacterias para biorremediación de metales se pueden encontrar en los numerosos *Reviews* que se han publicado en los últimos años sobre el tema (por ejemplo, para Cd: Chellaiah, 2018; Jebril *et al*., 2021; Sharma *et al.*, 2018; Sreedevi *et al.*, 2022). En este tipo de estudios, es importante determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los organismos candidatos y conocer la concentración promedio del metal en la zona a remediar, ya que la resistencia de los microorganismos frente a los metales tóxicos es variable (González & Ghneim-Herrera, 2021) y depende de distintos factores. Cabe aclarar que en el presente trabajo se hace uso del término “resistencia” para referirse a la habilidad de los microorganismos para crecer y desarrollarse en presencia de metales tóxicos. Algunos autores hacen uso del término “tolerancia” para describir el mismo comportamiento, y suelen usarse ambos términos indiscriminadamente en el contexto de biorremediación de metales tóxicos. Bravo *et al.* (2018) consideran que se debe tener una caracterización fisiológica y metabólica de los microorganismos, para poder usar ambos términos correctamente. Una aproximación interesante es el uso de las definiciones de ambos términos en el ámbito de los antibióticos, ya que se discriminan claramente y hacen referencia a dos procesos diferentes. Para Brauner *et al.* (2016), el término “resistencia” se usa para describir la capacidad heredada de los microorganismos para crecer a altas concentraciones de un antibiótico, independiente de la duración del tratamiento; mientras que “tolerancia” se usa para describir la habilidad, heredada o no, de los microorganismos para sobrevivir a una exposición transitoria a altas concentraciones de un antibiótico sin un

cambio en la CMI. Así, las dos definiciones pueden ser extrapoladas al contexto de los metales tóxicos para tener una discriminación precisa entre ambas palabras.

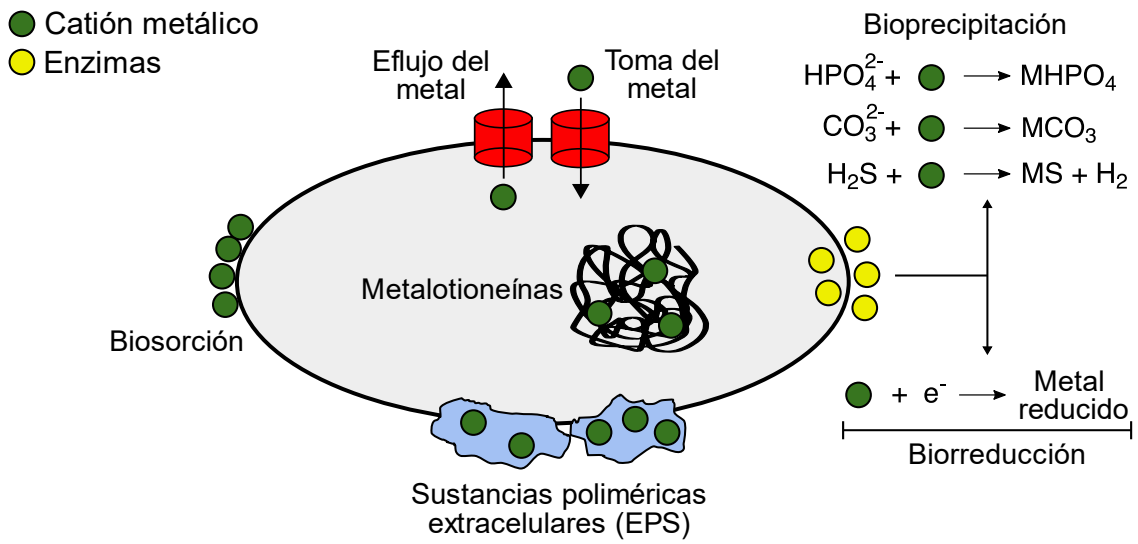


Figura 1-1: Interacciones más relevantes entre bacterias y metales tóxicos. El óvalo de color gris representa al microorganismo. Adaptado de Das & Dash (2017).

1.2 Estado del arte

Una de las técnicas de biorremediación de metales tóxicos que se está estudiando actualmente es la precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP, por sus siglas en inglés de *Microbiologically Induced Carbonate Precipitation*) por la ruta ureolítica. Este tipo de remediación usa bacterias ureasa-positivas para degradar enzimáticamente la urea, lo que conlleva a un aumento del pH que puede promover la formación de carbonatos de cationes divalentes. Los carbonatos de metales tóxicos suelen tener constantes de solubilidad (k_{ps}) bajas, del orden de $1x10^{-10}$ (Skoog *et al.*, 2014), por lo que el metal tóxico puede ser inmovilizado por medio de un proceso de MICP. El mecanismo del proceso MICP por la ruta ureolítica (Figura 1-2) se puede resumir como (Bhattacharya *et al.*, 2018; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019): i) la hidrólisis enzimática de la urea por parte de la ureasa, que conlleva a la producción de amoniaco y ácido carbónico; ii) el amoniaco en agua entra en equilibrio formando ion amonio e hidroxilo; iii) la producción de hidroxilo aumenta el pH, lo que a su vez permite que el ácido carbónico producido desplace su equilibrio en agua hacia la producción de iones bicarbonato y

carbonato; y iv) el ion carbonato reacciona con metales divalentes en el medio para precipitar carbonato del metal insoluble.

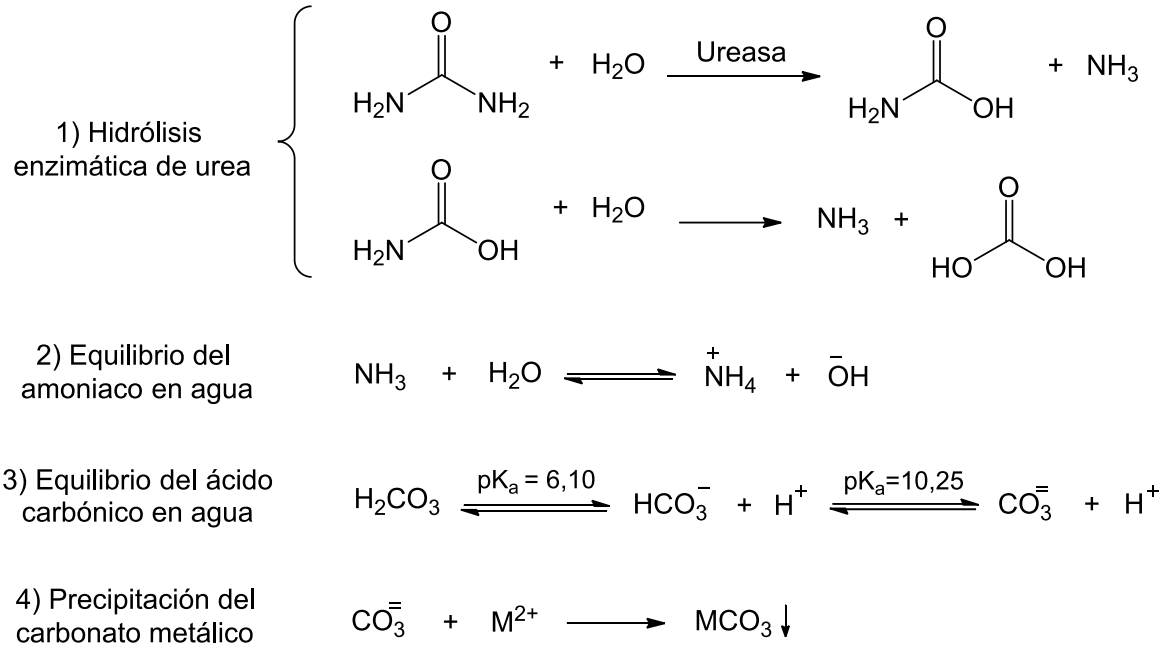


Figura 1-2: Reacciones involucradas en el proceso MICP ureolítico. M^{2+} hace referencia a un metal divalente. Los valores de pK_a se obtuvieron de Skoog *et al.* (2014). Adaptado de Tamayo-Figueroa *et al.* (2019).

Recientemente se ha reportado una gran cantidad de usos de MICP para remediar diferentes metales en muestras ambientales (Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019). Para Cd(II) particularmente se ha usado como una herramienta promisoria para el tratamiento de suelos de cultivos contaminados con el metal. Zhao *et al.* (2019) aislaron cuatro cepas bacterianas con alta actividad ureasa (~40 U mL^{-1}) que permitieron remover entre 70-80 % de Cd(II) como $CdCO_3$, después de 120 h en un experimento a escala de laboratorio. Por otra parte, Khadim *et al.* (2019) obtuvieron seis cepas bacterianas ureasa positivas resistentes a Cd(II) y Nil(II), las cuales pudieron remover altas cantidades de Cd(II) (96 %) y de niquel(II) (89 %) durante 48h de incubación en un medio con una concentración inicial de 500 mg L^{-1} de los cationes metálicos. Además, se pudo demostrar que la coprecipitación de los metales con calcita aumenta el porcentaje de remoción al proveer una nueva fuente de adsorción para los metales (la calcita funciona como sorbente en el proceso). Los beneficios de la coprecipitación de Cd(II) con calcita también fueron estudiados por

Bhattacharya *et al.* (2018), donde las bacterias ureolíticas *Serratia marcescens* NCIM 2919 y *Enterobacter cloacae* EMB19, en un medio con 20 g L^{-1} de urea, 5 mg L^{-1} de Cd(II) y 2,7 g L^{-1} de $CaCl_2$, presentaron un porcentaje de remoción de Cd(II) cercano a 96 % para la primera bacteria y 98 % para la segunda. Adicionalmente, los autores muestran un gran decaimiento en el porcentaje de remoción cuando realizan los experimentos en ausencia del ion calcio. Otro trabajo sobresaliente es el de Kumari *et al. (*2014), donde reportan el uso de la coprecipitación junto con la precipitación de $CdCO_3$ usando la bacteria *Exiguobacterium undae* a baja temperatura (10 °C).

Zhao *et al.* (2016) compararon el poder de remoción de Cd(II) por MICP y por biosorción bajo diferentes condiciones, usando una cepa aislada de suelos de minas. Ellos encontraron que con el proceso de MICP, a partir de una concentración inicial de Cd(II) de 10 mg L^{-1} y apenas 3 h de incubación, se obtiene 11 % más eficiencia de remoción que con la biosorción. Lin *et al.* (2016) también compararon la remoción por MICP con bacterias vivas y por biosorción con las bacterias muertas. Nuevamente, se encontró que las bacterias vivas proporcionan mejor eficiencia de remoción al llevar a cabo el proceso enzimático de la ureasa. Más aún, este estudio es uno de los pocos donde se hicieron experimentos con plantas, en este caso de arroz (*Oryza sativa* L.), sembradas en materas, a escala de laboratorio, para probar el potencial uso de las bacterias ureolíticas en pruebas de campo. Efectivamente, el uso de la bacteria ureolítica *Pseudomonas aeruginosa* disminuyó significativamente la acumulación de Cd(II) en granos de arroz, lo que indica, a nivel general, que este tipo de biorremediación tiene un gran potencial para disminuir la biodisponibilidad del Cd(II) y así ser usado en cultivos contaminados con este metal tóxico.

1.3 Justificación y planteamiento del problema

El uso de bacterias ureolíticas para inducir la precipitación de carbonatos de metales tóxicos es un tema relativamente nuevo, que se ha fortalecido con varios reportes desde alrededor del año 2016. La tecnología MICP se ha usado principalmente en investigaciones de biocementación (Mondal & Ghosh, 2019). En el grupo de investigación GERMINA (al cual pertenezco) del Departamento de Química, de la Universidad Nacional de Colombia, se están usando bacterias ureolíticas aisladas de materiales base cemento colombianos para ser aplicadas en procesos de biocementación y así reparar grietas de una forma económica, sencilla de emplear y eco-amigable. De estas investigaciones en el grupo

GERMINA, se resalta el trabajo de Montaño-Salazar *et al.* (2018) donde se reporta el aislamiento de bacterias ureolíticas de diferentes muestras de concreto y mortero de edificios del campus de la Universidad Nacional de Colombia, que mostraron un buen potencial en pruebas a nivel de laboratorio para ser usadas en biocementación.

Con la actual problemática de altos niveles de Cd(II) en suelos de fincas cacaoteras en Colombia, se hace necesario proponer alternativas para aliviar la situación. El presente trabajo de maestría se presenta como las primeras incursiones del grupo GERMINA en remediación de metales tóxicos utilizando la biotecnología MICP, con el objetivo de ampliar el conocimiento de este tema en Colombia y proponer el uso de estas bacterias para mitigar la problemática. Actualmente en el grupo se están realizando otras investigaciones relacionadas con el tema, que van de la mano con la presente tesis de maestría. Este trabajo se justifica en los diferentes reportes a nivel mundial del uso de MICP para remediar el metal (ver sección 1.2 Estado del arte); en los datos de alta concentración de Cd(II) en algunos de los suelos de las fincas cacaoteras de El Carmen de Chucurí (datos no mostrados), donde actualmente el grupo GERMINA tiene una colaboración con una asociación de cultivadores de cacao de El Carmen de Chucurí, la Asociación de campesinos vecinos del Parque Natural Nacional Serrania de los Yariguies (ASOCAPAYARI); por la preocupación que han expresado muchos de los productores de cacao del municipio; y por la incipiente investigación en Colombia del tema en específico (aplicación de la MICP para mitigar metales tóxicos).

A partir de la problemática del Cd(II) en suelos de algunas fincas cacaoteras del país, la regulación impuesta por la Unión Europea y el uso documentado de microorganismos para mitigar la presencia de metales biodisponibles en suelos, se propuso la siguiente pregunta de investigación:

¿Es viable el uso de bacterias ureolíticas resistentes a Cd(II), recuperadas de suelos cacaoteros de Colombia, para bioprecipitar Cd(II)?

Objetivos

General

Evaluar la capacidad para bioprecipitar cadmio de una selección de bacterias ureolíticas resistentes al metal, aisladas de fincas cacaoteras de El Carmen de Chucurí, Santander.

Específicos

1) Seleccionar un grupo de bacterias ureolíticas resistentes a cadmio(II) con características adecuadas para aplicar en ensayos de resistencia e inmovilización del metal.
2) Estudiar el efecto de cadmio(II) sobre el crecimiento de las bacterias seleccionadas.
3) Determinar la eficiencia de remoción de cadmio(II) por bioprecipitación de carbonatos, usando las bacterias seleccionadas.
4) Analizar la expresión diferencial de genes de resistencia a cadmio de las bacterias seleccionadas en presencia y ausencia del metal.

2. Caracterización y selección de bacterias ureolíticas resistentes a Cd aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia

2.1 Introducción

La presencia de metales pesados en el agua y el suelo se ha convertido en un grave problema ambiental en los últimos años. Las actividades humanas e industriales han aumentado drásticamente las concentraciones de estos metales en el medio ambiente (Bhattacharya *et al.*, 2018; Khadim *et al.*, 2019), lo que trae riesgos para los organismos acuáticos y del suelo, la producción de cultivos agrícolas y la salud humana (Lin *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). El Cd es un metal pesado altamente tóxico que se encuentra de forma natural en todo el planeta (Das & Dash, 2017; Zheng *et al.*, 2021) pero que aumenta su presencia en suelos debido al uso excesivo de fertilizantes fosfatados (Das & Dash, 2017; Lin *et al.*, 2016), la dispersión de lodos residuales (Lin *et al.*, 2016), deposición atmosférica (Das & Dash, 2017) y actividades industriales (Das & Dash, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2021), tales como minería, procesamiento de cuero, fundición de metales y producción de fertilizantes químicos.

La movilidad del Cd en el suelo es alta en comparación con otros metales pesados (Das & Dash, 2017) y depende directamente de varios factores como el pH, la capacidad de intercambio catiónico (CEC), el contenido de materia orgánica, la diversidad de microorganismos en el suelo, entre otros (Meter *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021). El catión divalente, Cd(II), es la especie de Cd móvil y soluble en agua (Zheng *et al.*, 2021), lo que favorece su movimiento en condiciones ácidas. Dada la alta movilidad del metal, puede ser fácilmente captado y bioacumulado por algunas plantas de interés agronómico, por ejemplo, el cacao (*Theobroma cacao* L.) (Meter *et al.*, 2019) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Lin *et al.*, 2016; Meter *et al.*, 2019), llegando fácilmente a los humanos u otros animales a través de la cadena alimenticia. La exposición o el consumo de Cd, incluso en concentraciones muy bajas (0,001-0,1 mg L^{-1}) (Lin *et al.*, 2016), conlleva a muchos efectos negativos en la salud humana y animal, entre los que se encuentran mutaciones, alteraciones endocrinas, daños pulmonares, alteraciones en la regulación del Ca(II), enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cáncer, entre otras enfermedades (Das & Dash, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2021). Los efectos tóxicos del Cd

dependerán de diferentes factores, como lo son el tiempo de exposición al metal, la dieta del individuo, el peso del individuo, entre otras. Además, el Cd tiene efectos nocivos en algunas plantas, impidiendo su crecimiento normal (Sharma *et al.*, 2018) y dificultando su proceso de absorción de nutrientes (Meter *et al.*, 2019).

Recientemente, la MICP, como mecanismo para remediar metales pesados, ha atraído la atención de los investigadores (Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021). Varios procesos de MICP pueden conducir a la precipitación de carbonatos metálicos, como la fotosíntesis, la desnitrificación, la amonificación, la reducción de sulfatos y la oxidación de metano (Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019), pero el principal y más estudiado es la ureólisis o hidrólisis enzimática de la urea (Figura 1-2). Los carbonatos de metales pesados suelen tener constantes de solubilidad (k_{ps}) bajas, del orden de $1x10^{-10}$ (Skoog *et al.*, 2014), por lo que es factible proponer un uso biotecnológico de los microorganismos ureolíticos en la inmovilización de metales pesados. Además, se considera un proceso eficiente, ecológico y barato para remediar metales (Anbu *et al.*, 2016).

En Colombia se han venido realizando trabajos de investigación para la remediación del Cd en suelos de cultivos de cacao y con presencia del metal (Meter *et al.*, 2019). Sin embargo, este tipo de estudios aún se encuentran en sus etapas iniciales y los reportes sobre el uso de bacterias ureolíticas en este contexto son escasos. Así, el objetivo de este estudio fue seleccionar un grupo de bacterias ureolíticas resistentes a Cd a partir de aislamientos obtenidos de suelos de fincas cacaoteras del municipio de El Carmen de Chucurí, Santander, Colombia. Los aislados fueron derreplicados por análisis SSCP e identificados por secuenciación del gen 16S rRNA. Dos bacterias del género *Serratia* y una del género *Acinetobacter*, con gran potencial para ser usadas en aplicaciones de remediación de suelos, fueron seleccionadas y caracterizadas, y se estudió el efecto del metal sobre su crecimiento y actividad ureolítica.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Reactivos químicos

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Las soluciones stock de Cd(II) (10 mM), Ca(II) (1,27 M) y urea (500 g L^{-1}) se prepararon usando $CdCl_2.H_2O$ (Merck, Darmstadt, Alemania), $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (PanReac AppliChem, Alemania) y urea (ChemCruz, Dallas, EE.UU.), respectivamente. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121°C, 15 psi durante 30 minutos) antes de su uso. Las soluciones stock de Cd(II), Ca(II) y urea se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania) y se añadieron a los medios de cultivo en condiciones asépticas.

2.2.2 Aislamiento de bacterias ureolíticas resistentes a Cd

Muestras de suelo con presencia de Cd, recolectadas en fincas cacaoteras del municipio de El Carmen de Chucurí, Santander, fueron usadas para el aislamiento de bacterias ureolíticas con resistencia a Cd. Este procedimiento se realizó en un trabajo anterior (Diez-Marulanda, 2020) perteneciente al mismo proyecto de investigación. Brevemente, cada suelo (~1 g) se colocó en 9 mL de NaCl al 0,85% y se incubó durante 6 h a temperatura ambiente con agitación rotativa. A continuación, se hicieron diluciones en serie con NaCl al 0,85% (diluciones hasta 10^{-7}). Cada dilución se sembró por extensión en un medio de selección (Zhao *et al.*, 2019) compuesto por peptona de carne 5 g L^{-1}, triptosa 10 g L^{-1}, urea 30 g L^{-1}, NaCl 5 g L^{-1}, fenolftaleína 15 mL L^{-1}, Cd(II) 0,025 mM y agar 15 g L^{-1}. Los cultivos se incubaron a 30 °C hasta que se observó la formación de colonias. Las bacterias con colonias visualmente distinguibles, capaces de crecer en presencia de Cd(II), y que mostraban un cambio de color en el medio, se seleccionaron y se mantuvieron en medio TSA suplementado con urea 30 g L^{-1} y Cd(II) 0,05 mM. Los cultivos axénicos se criopreservaron en TSB con 20% de glicerol a -80 °C.

2.2.3 Derreplicación molecular e identificación de los aislados

Se usó el análisis de polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP) de las regiones V4-V5 del gen *16S rRNA* para derreplicar los aislados. El ADN genómico (ADNg) se extrajo con el kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Co., EE.UU.) siguiendo las recomendaciones sugeridas por el proveedor. Las amplificaciones por reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones V4-V5 se realizaron con los primers 519F y 909R, mientras que los primers 27F y 1492R se usaron para amplificar el gen *16S rRNA* completo (Anexo A-1). Para ambas regiones, las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL con buffer de amplificación 1X (2,0 µL de buffer 10X), Mg^{2+} 1,5 mM (0,6 µL de $MgCl_2$ 50 mM), dNTPs 2 mM (0,4 µL de mezcla de dNTPs 10 mM), 0,4 mM de cada primer (0,8 µL de primer 10 mM), 1 U de Taq polimerasa (0,2 µL de Taq 5 U μL^{-1}, Bioline) y 1 µL de ADN molde (aproximadamente 100 ng), completando volumen con agua libre de nucleasas. El programa de amplificación usado fue: 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de 94 °C durante 20 s, 55 °C durante 20 s y 72 °C durante 40 s; y por último 72 °C durante 5 min (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). La concentración de amplicones se determinó por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific) y electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (HyAgarose™, HydraGene, China). El gel se reveló con SYBR Safe (Invitrogen, EE. UU.) y se fotodocumentó (Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator, Invitrogen).

El análisis SSCP se llevó a cabo como se reportó previamente (Brandão *et al.*, 2002) en MDE 0,7X a 5 W de potencia constante por 16 h 30 min. La tinción se realizó con nitrato de plata (Montaño-Salazar *et al.*, 2018). Los productos de amplificación purificados del gen *16S rRNA* entero fueron secuenciados (Macrogen, Corea). Las secuencias se editaron con el software BioEdit (Hall, 1999) versión 7.2.5, se depositaron en GenBank (números de acceso OL_376679 a OL_376690) y se identificaron mediante BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para el análisis filogenético de cada aislado, se consideraron las cuatro cepas de referencia con mayor porcentaje de identidad en BLASTn respecto a las secuencias analizadas. Los alineamientos de estas secuencias se realizaron mediante ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) en el software MEGAX (Kumar *et al.*, 2018). Los árboles filogenéticos se construyeron en BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) con análisis por Inferencia Bayesiana; además, se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+G+I (G: 5 categorías) (Tavaré, 1986; Yang, 1996) por ser el modelo más rico en parámetros (Abadi *et al.*, 2019). Se generaron 10.000 árboles, de los cuales se seleccionó uno, con el mayor producto de probabilidades posteriores (PP) para todos los clados del árbol, usando el complemento TreeAnnotator v1.10.4. El árbol seleccionado se visualizó y editó con el programa FigTree v1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

2.2.4 Caracterización y selección de los aislados

La actividad ureasa de cada aislado se determinó como la cantidad de amonio (NH_4^+) producida por la actividad bacteriana, medida a lo largo de un determinado tiempo de crecimiento. Se cuantificó con una modificación del método de fenol-hipochlorito (Yu *et al.*, 2021), basado en la reacción de Berthelot (Figura 2-1). Ésta consiste en tres pasos: (A) Se genera cloramina por reacción entre el amonio presente en la muestra y el hipoclorito de sodio; (B) la cloramina generada se sustituye electrofílicamente sobre la posición *p*- del anillo aromático del salicilato; y por último (C) la especie generada por la sustitución electrofílica reacciona con el excedente de salicilato para formar el indofenol, cuya coloración es azul esmeralda oscuro (Figura 2-2).

Brevemente, los cultivos de cada aislado se hicieron crecer en TSB suplementado con urea 30 g L^{-1} y Cd(II) 0,05 mM, a 30 °C y 150 rpm durante 24 h. Se tomó una alícuota de cada cultivo, se centrifugó y se filtró para obtener el sobrenadante con el amonio producido por cada aislado. Las alícuotas tuvieron que ser diluidas ya que el medio de cultivo presentaba inhibición de la reacción (Anexo A-2). A cada dilución (150 µL) se añadieron 40 µL de Na_2EDTA 0,15 M, 160 µL de solución de salicilato de sodio 0,50 M + nitroprusiato de sodio 0,02 M, 80 µL de hipoclorito al 0,5% en solución básica de $NaOH$-Na_2HPO_4, y se llevó a un volumen total de 1 mL con agua desionizada. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y el resultado se midió por espectrofotometría a 670 nm. El amonio producido por cada aislado se determinó por interpolación en una curva de calibración (0,25 - 2 mg L^{-1}) realizada con un estándar de NH_4^+ (Merck, Alemania), teniendo en cuenta la dilución de medio de cultivo que se usó para las muestras (Anexo A-2).

La morfología de los aislados se determinó mediante tinción de Gram (Sanders & Miller, 2010) en un microscopio óptico (CX31 Upright Microscope, Olympus) acoplado a una cámara digital (CMOS Sensor, Aptina). También se registró la morfología de las colonias como parte de la caracterización de estos aislados. Tanto la tinción de Gram como la determinación de morfología de las colonias se realizó en el trabajo previo donde se aislaron las bacterias (Diez-Marulanda, 2020). Además, se monitoreó la producción de precipitados de cada aislado mediante estereoscopía (Cambridge Instruments) y microscopía (CX31 Upright Microscope, Olympus). De este modo, se seleccionaron los

aislados con mejor actividad ureasa, crecimiento y producción de precipitados para los siguientes ensayos.

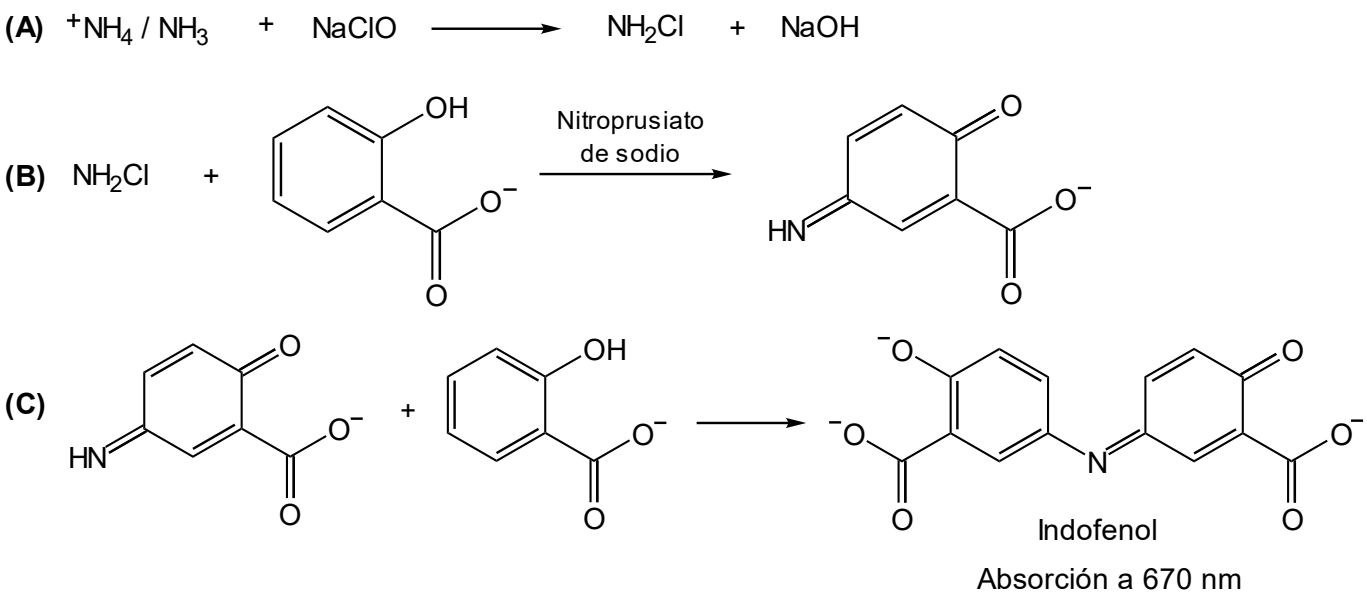


Figura 2-1: Cuantificación de la actividad ureasa por el método de fenol-hipoclorito modificado. Se usa salicilato de sodio en vez de fenol. (A) Generación de monocloramina; (B) Sustitución electrofílica catalizada por nitroprusiato; (C) Formación del indofenol coloreado. Figura adaptada de Yu *et al.*, 2021.

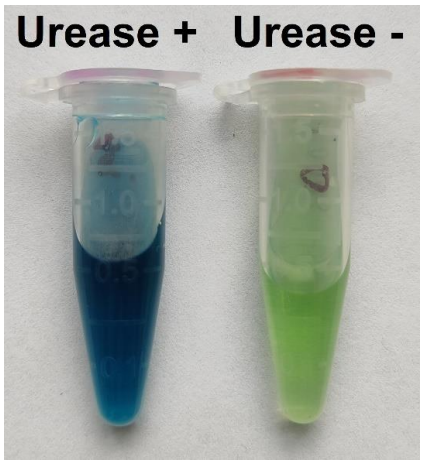


Figura 2-2: Coloración formada en la reacción de cuantificación de actividad ureasa por el método de fenol-hipoclorito modificado. La coloración depende de la presencia y cantidad de amonio en la muestra; es azul esmeralda cuando es positivo (izquierda) y verde/amarillo cuando es negativo (derecha).

2.2.5 Efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa

El efecto del Cd(II) sobre el crecimiento y la actividad ureasa de los aislados seleccionados se determinó con cultivos en presencia y ausencia del metal (Figura 2-3). En matraces Erlenmeyer, debidamente esterilizados por autoclave, se añadieron 80 mL de dos tipos de medios: (1) LB + urea y (2) LB + urea suplementada con Cd(II) (0,05 mM). Para cada medio se hizo un control (sin bacterias) y tres inóculos de cada aislado (triplicado). Se inocularon células (1%) de un cultivo de la noche anterior y se incubaron a 30 °C bajo agitación constante durante 48 h. Para los dos aislados *Serratia* los experimentos se hicieron a 40 y 90 rpm, mientras que para el aislado *Acinetobacter* sólo se usó la agitación a 90 rpm. Durante el tiempo de incubación, se tomó una alícuota (1 mL) cada 3 h de cada matraz para medir el crecimiento bacteriano, el pH y la producción de amonio. El crecimiento se monitoreó por medio de OD a 600 nm (OD_{600}), el pH se determinó con un medidor de pH (pH 510 Series Meter, Oakton) y el amonio se cuantificó por el método descrito anteriormente (Ver sección 2.2.4 Caracterización y selección de los aislados). Con los datos colectados, las respectivas curvas para cada aislado fueron graficadas.

Debido a las restricciones de tiempo en las horas de laboratorio, impuestas por la universidad como medida contra la pandemia de COVID-19, el seguimiento durante las 48 h de crecimiento no pudo hacerse de forma continua. Por lo tanto, fue necesario colocar dos conjuntos de cultivos (cada conjunto compuesto por un control y un triplicado en ausencia y presencia de Cd(II)) a diferentes tiempos de inoculación, incubados durante tres días (Anexo A-3). Así, el primer conjunto se inoculó por la mañana y el segundo por la noche, registrando los datos sólo durante el día (de 8 AM a 7 PM). Esto permitió cubrir todos los tiempos de muestreo durante las 48 h del experimento, sin violar las restricciones de permanencia dentro de la universidad.

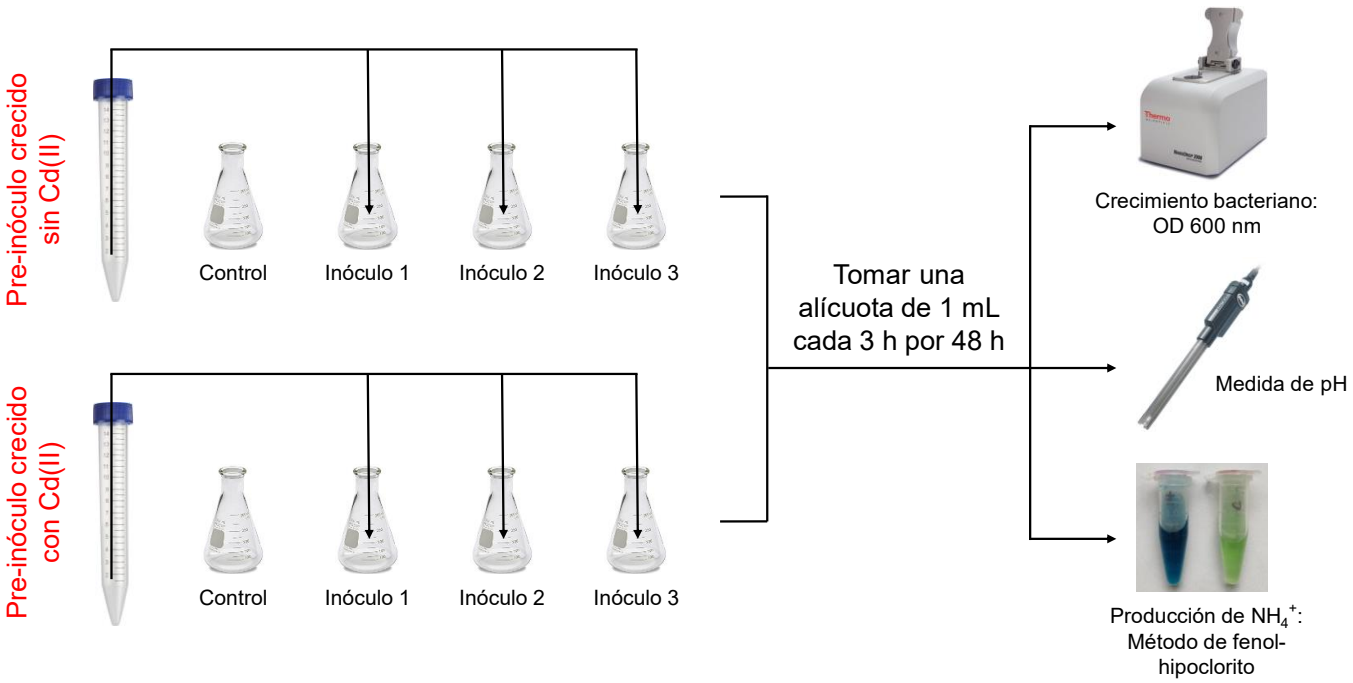


Figura 2-3: Esquema general para estudiar el efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa de los aislados seleccionados.

2.2.6 Análisis estadístico

La mayoría de los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD). Las barras de error en los gráficos muestran 1 SD (desviación estándar) de las mediciones. Se usó un ANOVA para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos (ausencia y presencia de Cd) a lo largo del tiempo, por medio de un análisis de regresión de modelo mixto con ajuste polinómico ortogonal (Anexo A-4). Estos análisis se realizaron con ayuda del software estadístico R versión 4.2.0 (R Core Team, 2021) trabajado en el ambiente RStudio IDE versión 2022.2.2.485 (RStudio Team, 2022). Un p-valor < 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a Cd que inducen la precipitación de carbonato

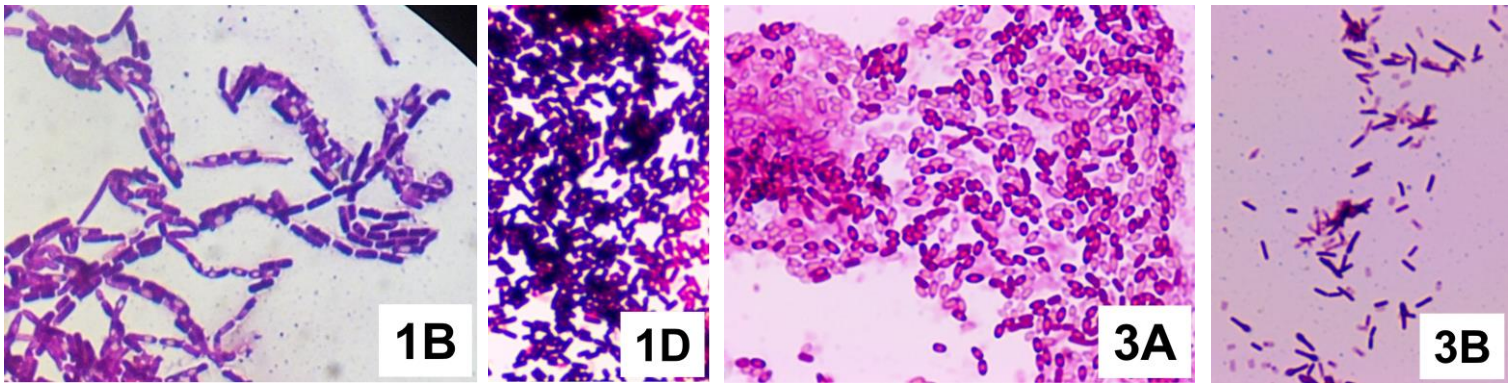
Se hicieron aislamientos de muestras de suelo de cuatro fincas de cacao en El Carmen de Chucurí, Santander, Colombia. Estos suelos tenían presencia de Cd en concentraciones variables (datos no mostrados), similares a las reportadas por Bravo *et al.* (2021) para suelos de la misma zona de trabajo (0,01 - 27,00 mg kg^{-1}, con un contenido promedio de 1,90 mg kg^{-1}). Las bacterias se aislaron en medios selectivos de resistencia a Cd con fenolftaleína para la indicación visual del aumento del pH. Se recuperaron quince aislados con la facultad de crecer en medios con presencia de Cd y capaces de hidrolizar la urea. Sus colonias cambiaron el color del medio de amarillo a púrpura debido al viraje de la fenolftaleína, lo que indica un aumento del pH por hidrólisis enzimática de la urea (Figura 1-2) (Bhattacharya *et al.*, 2018). Las colonias eran en su mayoría circulares, convexas, con un borde entero, de superficie lisa y brillante, y de color crema/blanco. Cuatro aislados (códigos 4a, 4b, 4.1a y 4.1b) mostraban colonias rojizas, y un aislado (código 7b) excretaba una sustancia azul-gris en el medio. Estas características especiales sirvieron para la posterior identificación de estos aislados, ya que coincidieron con las coloraciones que exhiben las bacterias a las cuales fueron asignadas molecularmente; color rojizo característico de algunas bacterias del género *Serratia* (Haddix & Shanks, 2018) y excreción de piocianina en *Pseudomonas aeruginosa* (Hall *et al.*, 2016), cuya coloración es azul grisáceo.

Los aislados se identificaron con rasgos fenotípicos y mediante técnicas moleculares (Tabla 2-1). Seis aislados se caracterizaron como Gram positivos con morfología de bacilo, exceptuando el aislado 4C, que presentó una forma de vibrio (Figura 2-4). Los restantes aislados se determinaron como bacterias Gram negativas, en su mayoría cocos y bacilos (Figura 2-4). La producción de ureasa en ambos tipos de bacterias se ha reportado previamente (Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019), pero las bacterias Gram positivas suelen ser las más estudiadas en este campo (Chuo *et al.*, 2020; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019) debido a su capacidad para formar endosporas, lo que les permite resistir condiciones desfavorables.

Tabla 2-1: Identificación y caracterización de las bacterias ureolíticas resistentes a Cd(II) aisladas de suelos cacaoteros de Santander, Colombia.

Código aislado	Gram	Código perfil SSCP[a]	Identificación tentativa[b]	Porcentaje de identidad (%)	Número de acceso GenBank	Actividad ureasa (µmol mL^{-1} h^{-1})
1B	+	ndi	ndi	ndi	ndi	0,42
1D	+	B	*Bacillus safensis*	99,93	OL376679	0,34
3A	+	I	*Oceanobacillus caeni*	98,71	OL376680	ndi
3B	+	A	*Pseudogracilibacillus endophyticus*	99,15	OL376681	ndi
4a	-	nde	ndi	ndi	ndi	2,33
4b	-	nde	*Serratia marcescens*	99,35	OL376685	2,75
4.1a	-	nde	*Serratia marcescens*	99,15	OL376682	3,09
4.1b	-	nde	*Serratia marcescens*	99,27	OL376683	2,84
4A	+	H	*Bacillus depressus*	98,75	OL376684	ndi
4C	+	ndi	ndi	ndi	ndi	0,72
5b	-	C	*Serratia surfactantfaciens*	99,92	OL376686	1,34
5C	-	G	*Bacillus timonensis*	99,49	OL376687	ndi
6a	-	D	*Acinetobacter vivianii*	99,93	OL376688	0,31
6C	-	F	*Mezorhizobium thiogangeticum*	99,23	OL376689	ndi
7b	-	E	*Pseudomonas aeruginosa*	99,93	OL376690	0,44

ndi, no disponible.
[a] Cada letra mayúscula indica un perfil único de SSCP. nde (no determinado) indica que el perfil para el aislado no pudo ser determinado.
[b] Nombre del microorganismo con el porcentaje de identidad más alto obtenido por BLAST.



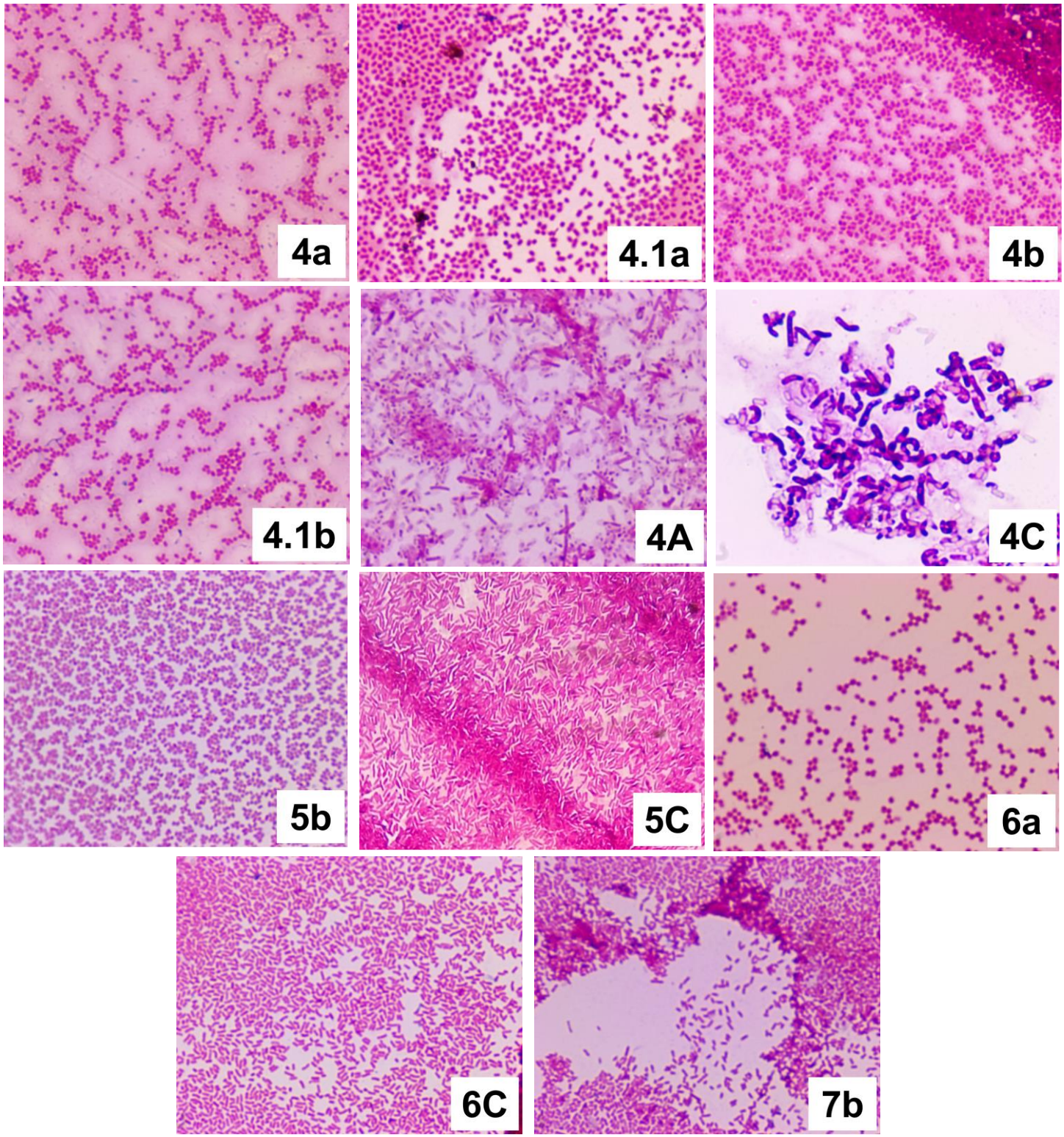


Figura 2-4: Fotografías de los aislados mostrando sus características morfológicas y su condición Gram. Estas imágenes fueron obtenidas por microscopía óptica (Olympus CX31; 1000X de aumento) acoplada a una cámara digital (Aptina CMOS Sensor).

Además de la tinción de Gram, los aislados fueron derreplicados mediante el análisis SSCP y se identificaron mediante la secuenciación del gen *16S rRNA*. La técnica SSCP se basa en las diferentes conformaciones espaciales que adoptan las hebras de ADN después de un proceso de desnaturalización, lo que permite diferenciar las secuencias de ADN por electroforesis, aun cuando sólo tengan un polimorfismo de un solo nucleótido (Dong & Zhu, 2005; Montaño-Salazar *et al.*, 2018). Así, en el caso del SSCP del gen *16S rRNA*, se obtiene un perfil electroforético único para cada cepa bacteriana (Montaño-Salazar *et al.*, 2018), permitiendo la discriminación de las secuencias antes de la secuenciación. El análisis SSCP de las regiones hipervariables V4-V5 del gen *16S rRNA* de los aislados reveló nueve perfiles únicos (Tabla 2-1); cuatro aislados (4a, 4b, 4.1a y 4.1b) no mostraron bandas (Figura 2-5). En consecuencia, se secuenció el gen *16S rRNA* completo para los nueve aislados con patrón SSCP único y los cuatro aislados que no presentaron bandas. Los aislados 1B y 4C no pudieron ser identificados molecularmente debido a problemas con la secuenciación. Tradicionalmente, se ha asumido que una similitud de > 95% entre las secuencias del gen *16S rRNA* define la categoría taxonómica de género, mientras que >97% lo hace a nivel de especie (Johnson *et al.*, 2019). Sin embargo, en la actualidad no existe una definición universal para definir las especies mediante *16S rRNA* (Janda & Abbott, 2007), además, la secuenciación del gen *16S rRNA* no se considera suficiente para discriminar las bacterias a este nivel, dada la gran similitud de secuencias entre algunas especies (Janda & Abbott, 2007; Peker *et al.*, 2019). Por consiguiente, consideramos altamente confiable la identificación de nuestros aislados a nivel de género y somos cautelosos en cuanto a las asignaciones a nivel de especie. Así, el análisis BLAST (Tabla 2-1) y el análisis filogenético por inferencia bayesiana (Figura 2-6) mostraron que los aislados pertenecen a los filos Firmicutes y Proteobacteria, con cinco y siete especies, respectivamente. Los cinco aislados de Firmicutes pertenecen a la clase Bacilli, orden Bacillales, mientras que los aislados Proteobacteria pertenecen a los órdenes Pseudomonadales, Enterobacterales e Hyphomicrobiales de las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Además, los aislados pertenecen a géneros que se han reportado previamente en el contexto de MICP y algunos en uso para la remediación de Cd. Las bacterias del género *Bacillus* han sido uno de los microorganismos más utilizados en MICP (Chuo *et al.*, 2020; Khadim *et al.*, 2019; Omoregie *et al.*, 2020; Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2021), tanto para usos más convencionales (por ejemplo, biocementación) como para usos relativamente nuevos (por ejemplo, biorremediación de metales tóxicos). También se ha

reportado el uso de bacterias de los géneros *Oceanobacillus* (Rahman *et al.*, 2020; Rajasekar *et al.*, 2021), *Pseudogracillibacillus* (Omoregie *et al.*, 2020), *Acinetobacter* (Chuo *et al.*, 2020; Rajasekar *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2019;) y *Pseudomonas* (Chuo *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2016; Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021) para la precipitación de carbonatos. Por el contrario, el uso potencial en MICP de las especies de los géneros *Serratia* y *Mesorhizobium* no ha sido explotado de la mejor manera, con sólo un informe de uso en biorremediación por MICP para *Serratia* (Bhattacharya *et al.*, 2018), y ningún informe para *Mesorhizobium*. Más aún, la resistencia a Cd se ha reportado para los anteriores géneros: *Bacillus* (Khadim *et al.*, 2019; Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2021), *Oceanobacillus* (Alhindi & Albdaiwi, 2022), *Acinetobacter* (Méndez *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2019), *Pseudomonas* (Lin *et al.*, 2016; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021), *Serratia* (Bhattacharya *et al.*, 2018; Choudhary *et al.*, 2012), *Mesorhizobium* (Maynaud *et al.*, 2013), exceptuando a *Pseudogracilibacillus* que, hasta donde sabemos, no tiene reportes aún. Así, en este trabajo se reporta por primera vez la habilidad para resistir Cd de un aislado *Pseudogracilibacillus*.

El porcentaje de identidad por BLAST fue superior al 99% para casi todos los aislados, excepto para los aislados 3A y 4A que presentaron un 98,71 y 98,75% (Tabla 2-1), respectivamente. Algunos clados encontrados en el cladograma bayesiano presentaron PP inferiores a 0,8 (Figura 2-6), lo que se consideró como ramas mal soportadas. Los valores de la PP muestran la probabilidad de que el modelo filogenético sea correcto (Nascimento *et al.*, 2017) y, por lo tanto, se interpreta comúnmente como un indicador de precisión filogenética (Simmons *et al.*, 2004), pero suele presentar un soporte sobreestimado en comparación con otras pruebas, como Bootstrap o jackknife (Simmons *et al.*, 2004). El umbral de la PP para el presente estudio se eligió de forma arbitraria, debido a la falta de definición en literatura científica, aunque cabe destacar que los límites oscilan entre 0,5 y 0,95 en otros estudios de filogenia basados en inferencia bayesiana del gen *16S rRNA* (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2008). En términos de la identificación a nivel de especie, se encontraron incoherencias entre los resultados del BLAST y los resultados de la inferencia filogenética, de acuerdo con la discusión anterior sobre la identificación de especies usando *16S rRNA*. Por ejemplo, los aislados 4b, 4.1a y 4.1b fueron identificados como *Serratia marcescens* por BLAST (Tabla 2-1) con un porcentaje de identidad > 99% (lo suficientemente bueno para ser considerado

tradicionalmente como una coincidencia de especie (Janda & Abbott, 2007; Johnson *et al.*, 2019)). Sin embargo, los mismos aislados se agruparon en un clado con pleno soporte de PP, que al mismo tiempo está directamente relacionado (PP = 0,999) con el clado de *Serratia ficaria* (Figura 2-6). Se observa un comportamiento similar cuando se emplean otros enfoques filogenéticos como el de *Maximum Likelihood* y el de *Neighbor Joining* (datos no mostrados). Por ello, se decidió nombrar a todos los aislados como sp. del género (por ejemplo, *Pseudogracilibacillus* sp. 3B; *Pseudomonas* sp. 7b) para evitar interpretaciones erróneas de la identificación. Se sugiere el uso de otros marcadores moleculares, como los genes *gyr* o *rpoB*, para tener más confianza en la determinación de la especie.

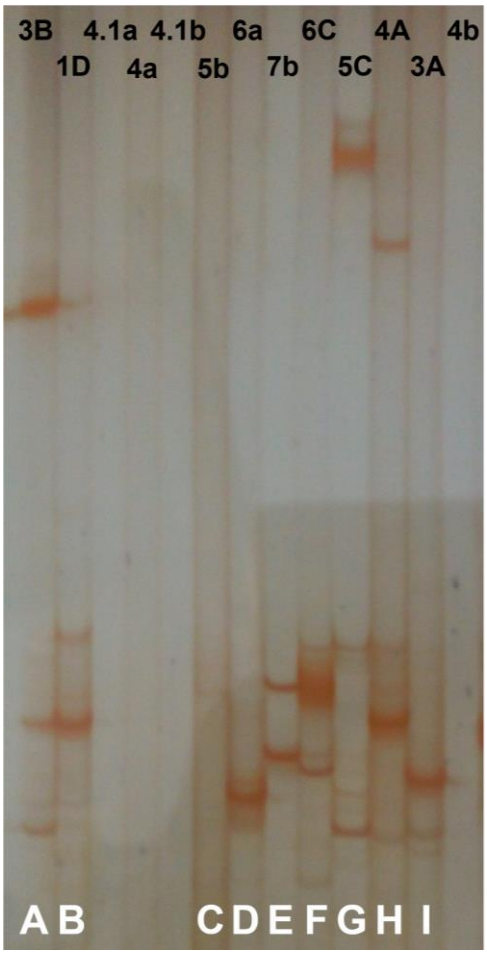


Figura 2-5: Perfiles de PCR-SSCP del gen parcial *16S rRNA V4-V5* para los 13 aislados. Los códigos de cada aislado se muestran en la parte superior y los códigos de perfil SSCP en la parte inferior.

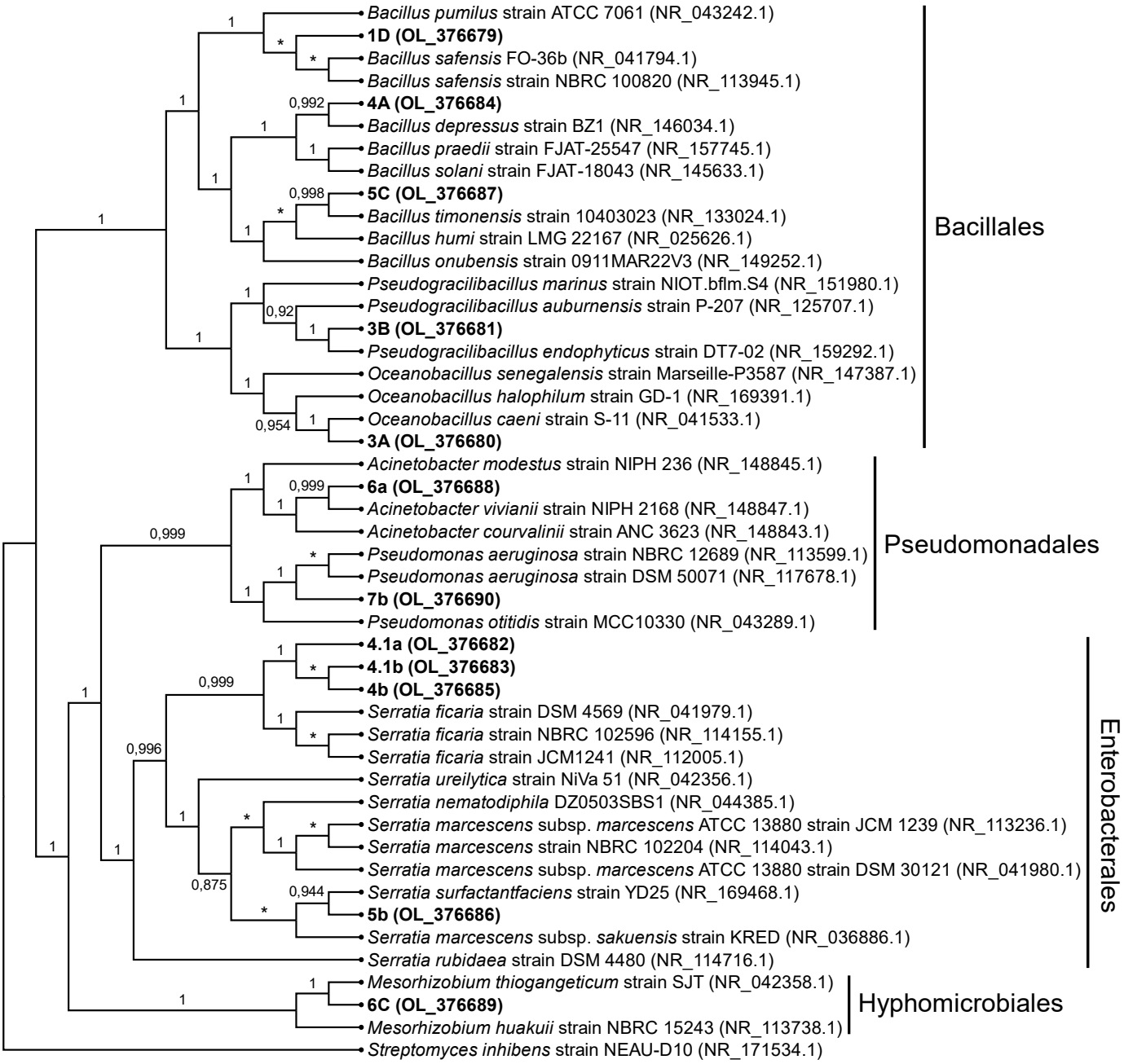
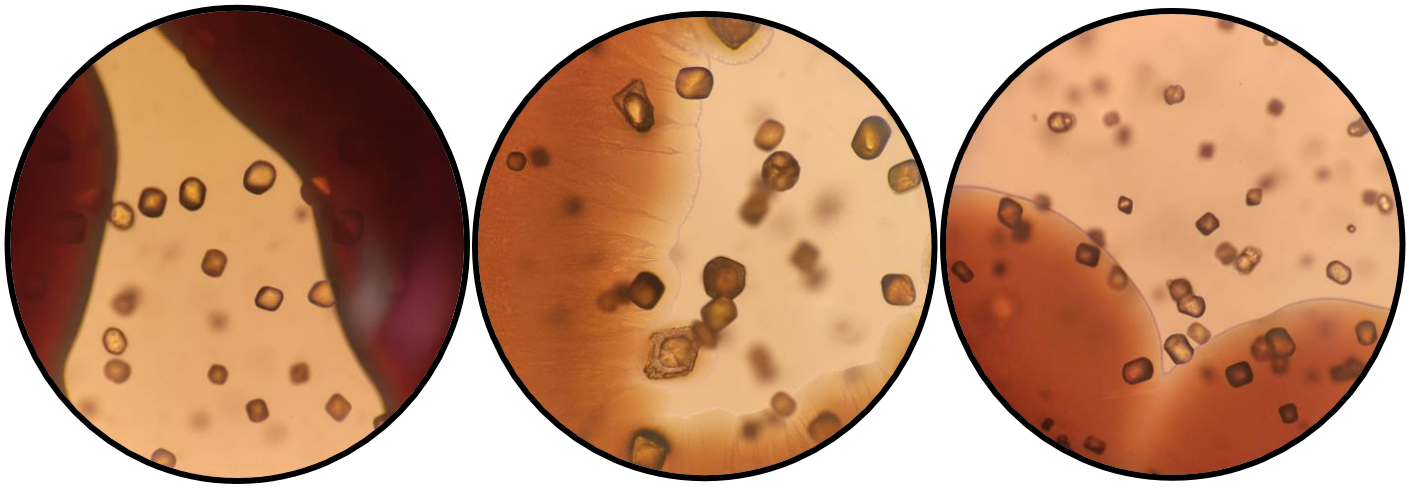


Figura 2-6: Cladograma bayesiano de las secuencias del gen *16S rRNA*, que representa las relaciones filogenéticas de los aislados bacterianos y las cepas de referencia. Los aislados se representan con los códigos indicados en la Tabla 2-1. Los números de acceso de Genbank para cada secuencia se muestran entre paréntesis. La secuencia del gen *16S rRNA* de la cepa *Streptomyces inhibens* NEAU-D10 se usó como *outgroup*. Los números encima de las ramas son la probabilidad posterior (PP) que soporta cada clado. Los asteriscos indican PP < 0,8.

2.3.2 Actividad ureasa y selección de aislados

Todos los aislados presentaron lo que puede considerarse como niveles bajos de actividad ureasa (Konstantinou *et al.*, 2021), oscilando entre 0,31 y 3,09 µmol NH_4^+ mL^{-1} h^{-1} (Tabla 2-1). Esto puede explicarse por la presencia de Cd(II) que puede inhibir la actividad enzimática (Bhattacharya *et al.*, 2018), o por la pérdida de amoníaco gaseoso durante el proceso ureolítico. De cualquier modo, los aislados fueron capaces de aumentar el pH y precipitar carbonato cuando se cultivaron en medios suplementados con urea y Ca(II). Se seleccionaron tres aislados para su posterior análisis en función de su actividad ureasa, su crecimiento en los medios usados y la producción de precipitados (Figura 2-7). Los seleccionados fueron el aislado 4.1a, que tuvo la máxima actividad ureasa; 5b, que presentó la segunda mayor actividad, excluyendo los otros aislados *Serratia* (4a, 4b y 4.1b) que son muy similares morfológica y filogenéticamente a 4.1a; y 6a, que, a pesar de mostrar la menor actividad ureasa, exhibió una alta producción de precipitados (Figura 2-7). Los demás aislados no se consideraron para la selección debido al lento crecimiento y a la baja producción de biomasa, a pesar de tener mejor actividad ureasa que el aislado 6a.



Aislado 4.1a *Serratia* sp. | Aislado 5b *Serratia* sp. | Aislado 6a *Acinetobacter* sp.

Figura 2-7: Precipitados producidos por los tres aislados seleccionados incubados en LB + urea (30 g L^{-1}) + Ca(II) (20,4 mM) durante 5 días a 30 °C. Observación al microscopio óptico con 100X de aumento.

2.3.3 Efecto del Cd sobre el crecimiento y la actividad ureasa

En general, el Cd(II) 0,05 mM afectó notablemente al crecimiento de los aislados, aunque la actividad ureasa no se vio influenciada negativamente por la presencia de Cd (Figura 2-8, Figura 2-9, Figura 2-10). Un comportamiento similar fue encontrado por Khan *et al.* (2016) para un aislado de *Salmonella enterica* con extrema resistencia a los metales pesados, cuyo crecimiento fue significativamente diferente en ausencia y presencia (1 mM) de Cd(II). Se seleccionó una concentración de Cd(II) de 0,05 mM porque las muestras de suelo usadas para el aislamiento tenían valores similares (datos no mostrados), y superaba el contenido medio de Cd en los suelos de cacao de Santander (Bravo *et al.*, 2021). Para cada variable estudiada (OD, pH y producción de amonio), se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (presencia y ausencia de Cd) ajustando las curvas a un polinomio ortogonal y comparándolas por ANOVA.

En cuanto al crecimiento, el aislado *Serratia* sp. 4.1a presentó diferencias significativas a lo largo de toda la curva de crecimiento para ambas velocidades de agitación (Figura 2-8 A-B). Por lo tanto, se puede concluir que el Cd(II) 0,05 mM tuvo un impacto importante en el crecimiento de este aislado. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos sobre el pH y la producción de amonio cuando el aislado fue cultivado a 40 rpm (Figura 2-8 E); pero, a 90 rpm, el amonio fue notablemente mayor en presencia de Cd que en su ausencia (Figura 2-8 F). Lo anterior puede ser explicado como una respuesta bacteriana frente al estrés producido por el Cd, promoviendo los mecanismos asociados a la resistencia al metal, como por ejemplo un aumento en la actividad ureasa para inducir la mineralización del metal, disminuyendo así la toxicidad del Cd(II) (Huang *et al.*, 2022). Curiosamente, el pH se vio significativamente afectado por la presencia de Cd (Figura 2-8 D), aunque cabe destacar que, para este experimento y el del aislado *Serratia* sp. 5b a 90 rpm (Figura 2-9 D), el stock de Cd se preparó en HNO_3, lo que explica la gran diferencia de pH en las etapas iniciales, de 0 – 9 h de crecimiento, justo antes de que el pH subiera debido a la actividad ureasa.

La falta de diferencias importantes en la actividad ureasa entre los tratamientos en las dos velocidades de agitación puede deberse a que *Serratia* spp. son bacterias anaerobias facultativas (Choudhary *et al.*, 2012), por lo que la velocidad de agitación no afecta dramáticamente su desarrollo. Esto resalta el potencial del aislado *Serratia* sp. 4.1a para

ser empleado en la remediación de suelos superficiales contaminados, así como para suelos más profundos (niveles bajos de oxígeno), considerando que a menor disponibilidad de oxígeno (40 rpm) todavía se presenta una buena actividad ureasa, y la presencia/ausencia de Cd no parece afectar esa actividad. Finalmente, se infiere que la ureasa se produce entre las fases estacionarias media y temprana, considerando que los momentos en los que aumenta el pH y comienza la producción de amonio, se corresponden con los tiempos de esas fases (Figura 2-8). Cabe destacar que el pH disminuye en los tiempos iniciales de crecimiento, lo que podría deberse a los ácidos orgánicos generados por el metabolismo bacteriano. Así, el aumento del pH debido a la actividad ureasa puede tardar más tiempo en producirse que el inicio de la producción de amonio (como puede verse en la Figura 2-8 C y E, donde el pH empieza a aumentar entre 9 y 13 h mientras que la producción de amonio aumenta entre 6 a 9 h) debido a la neutralización de los ácidos orgánicos por los iones OH^- producidos en la reacción de ureólisis.

Se observaron comportamientos similares para el aislado *Serratia* sp. 5b. El crecimiento fue significativamente diferente en presencia y ausencia de Cd (Figura 2-9 A-B). En contraste con el aislado 4.1a, el aislado *Serratia* sp. 5b presentó diferencias significativas en todas las curvas de pH y de producción de amonio. A 40 rpm, el aumento del pH fue significativamente mayor en ausencia de Cd (Figura 2-9 C), lo mismo sucedió para el amonio (Figura 2-9 E). Por el contrario, el pH y la producción de amonio fueron significativamente mayores en presencia de Cd para *Serratia* sp. 5b cultivado a 90 rpm (Figura 2-9 D y F). Estos resultados muestran una posible respuesta de *Serratia* sp. 5b frente a la toxicidad del Cd(II), aumentando la actividad ureasa, como se indicó previamente para *Serratia* sp. 4.1a., sugiriendo el potencial uso de *Serratia* spp. en aplicaciones de biorremediación. También sugiere que *Serratia* sp. 5b puede ser usada preferiblemente, pero no exclusivamente, para biorremediación de Cd en ambientes con niveles de oxígeno normales, considerando la disminución de actividad ureasa en presencia de Cd a niveles de oxígeno más bajos (40 rpm). También, la producción de ureasa del aislado *Serratia* sp. 5b ocurre en torno a la fase exponencial media y tardía.

El aislado *Acinetobacter* sp. 6a no mostró un pH y una producción de amonio tan buena como los aislados *Serratia*. Además, esta bacteria no pudo cultivarse a 40 rpm debido a la disminución de oxígeno disponible en el medio, que es vital para las bacterias aeróbicas

como *Acinetobacter* spp. De nuevo, la presencia de Cd fue un factor significativo para el crecimiento del aislado (Figura 2-10 A), la dinámica del pH (Figura 2-10 B) y la generación de amonio (Figura 2-10 C). En este caso, la actividad ureasa comienza más tarde que en los aislados *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b. Para estos últimos, la actividad comenzó alrededor de las 6-12 h de crecimiento, pero para *Acinetobacter* sp. 6a se produjo 3 horas más tarde, al mismo tiempo que comenzó la fase estacionaria (Figura 2-10). La presencia de Cd parece tener un impacto retardador en el crecimiento, porque la fase de adaptación se prolongó durante 9 horas en comparación con la fase de adaptación de 3 horas sin Cd. Además, el metal tuvo efectos similares sobre la producción de amonio.

Los tres aislados, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, tienen un buen potencial para ser aplicados en remediación de Cd por MICP. El metal no tuvo una influencia perjudicial sobre la actividad de la ureasa de las bacterias. Además, en algunos casos la presencia de Cd parecía ser beneficiosa para la actividad, a pesar de que el crecimiento se viera afectado.

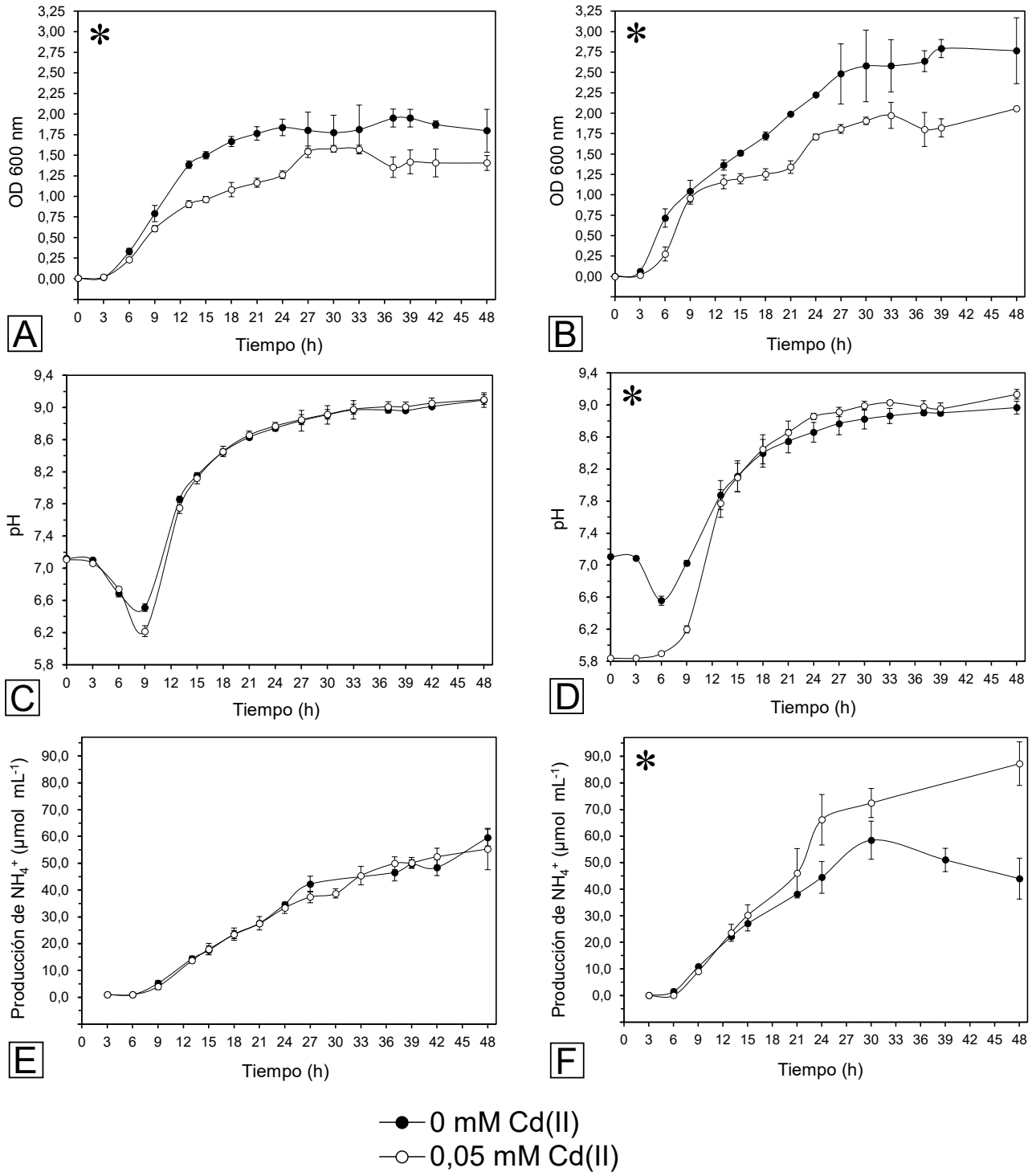


Figura 2-8: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado Serratia sp. 4.1a incubado a 30 °C y 40 rpm (A, C, E) o 90 rpm (B, D, F) de agitación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (presencia y ausencia de Cd(II)) como se indica en la sección de Análisis estadístico.

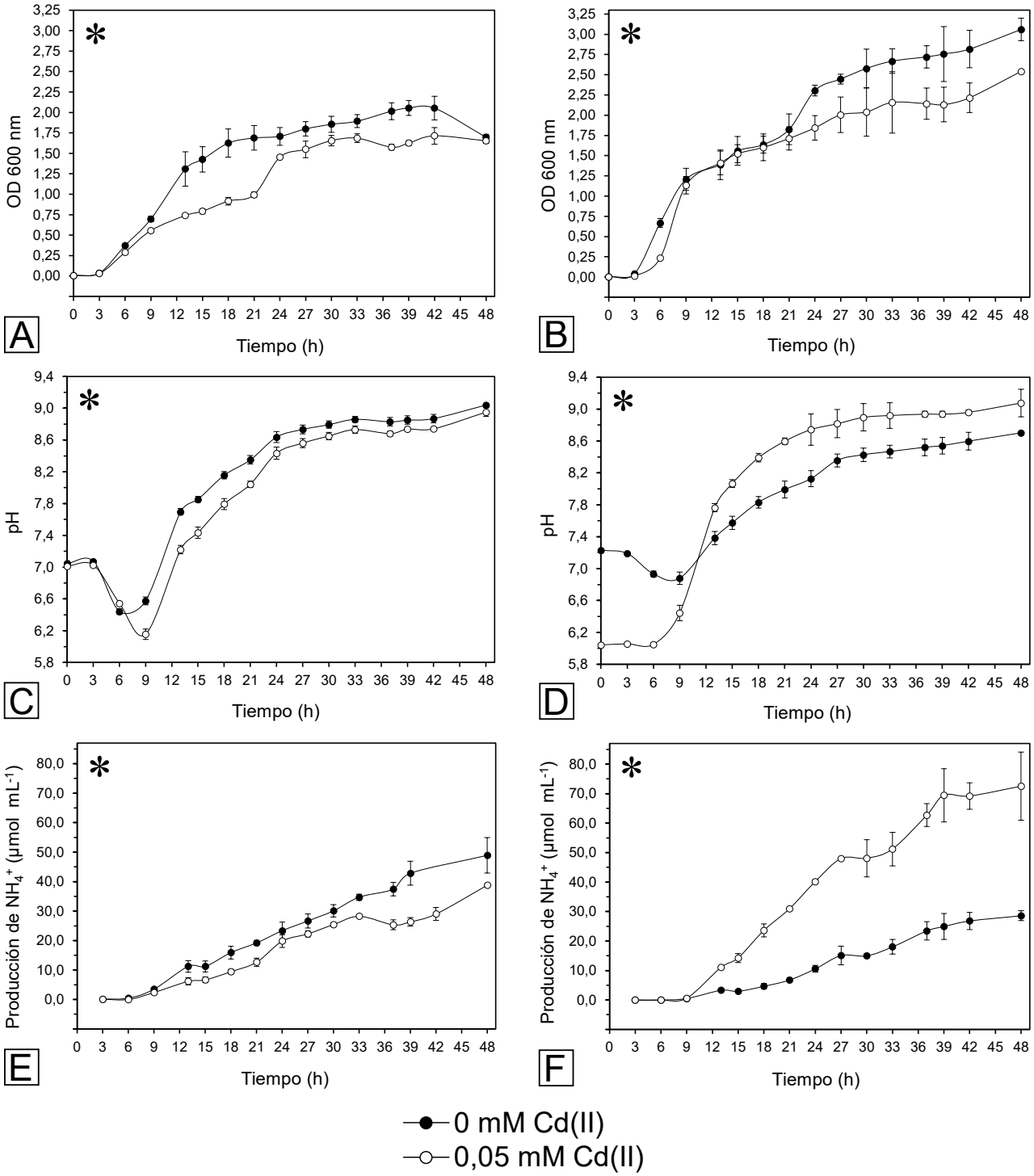


Figura 2-9: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado *Serratia* sp. 5b incubado a 30 °C y 40 rpm (A, C, E) o 90 rpm (B, D, F) de agitación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (presencia y ausencia de Cd(II)) como se indica en la sección de Análisis estadístico.

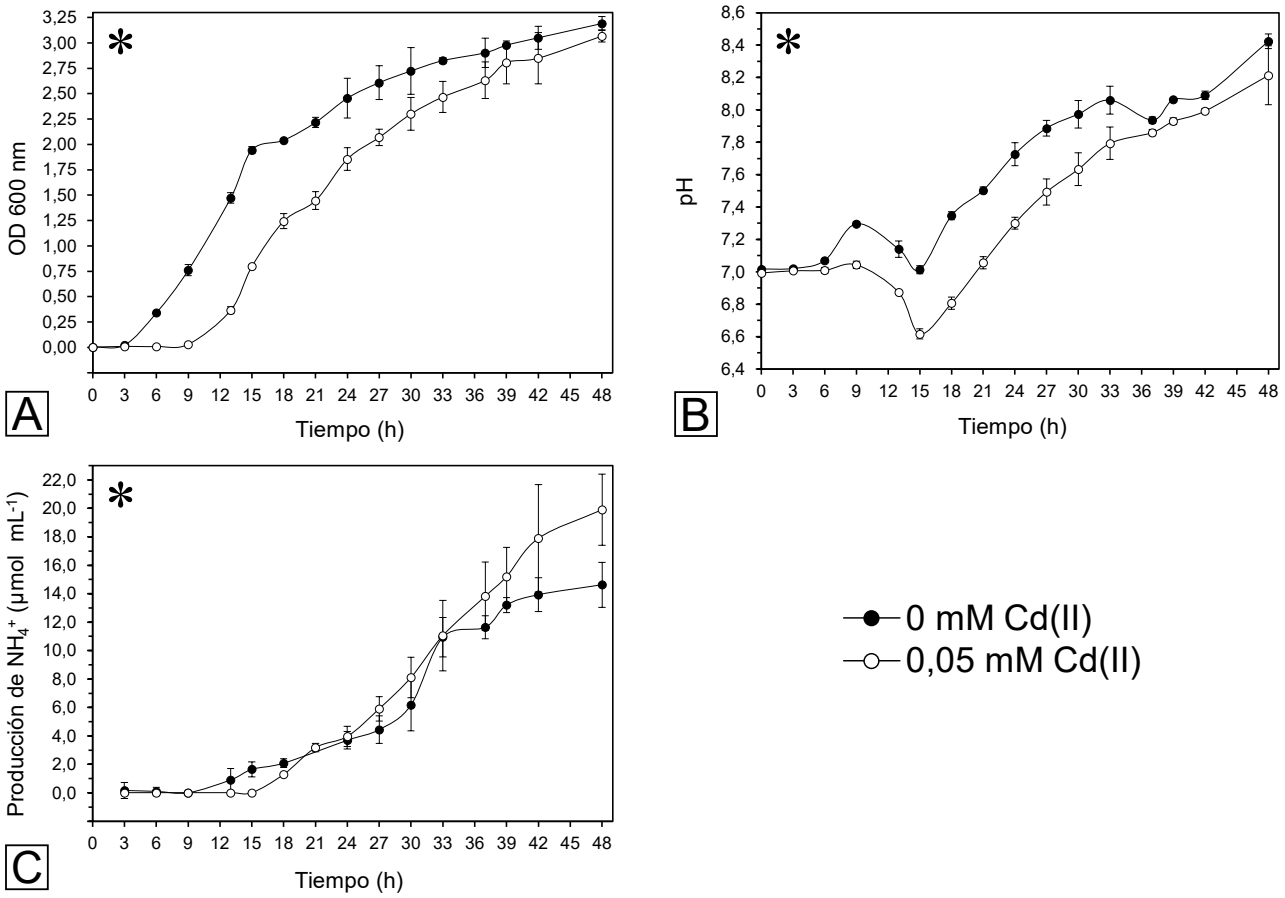


Figura 2-10: Curvas de crecimiento, pH y producción de amonio para el aislado *Acinetobacter* sp. 6a incubado a 30 °C y 90 rpm de agitación. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (presencia y ausencia de Cd(II)) como se indica en la sección de Análisis estadístico.

2.4 Conclusiones

Se recuperó una variedad de bacterias ureolíticas resistentes a Cd de suelos con presencia del metal tóxico. De ellas, tres aislados, pertenecientes a los géneros *Serratia* y *Acinetobacter*, presentaron buenas características para ser usadas en la remediación de Cd. Los tres pudieron resistir y crecer bajo el estrés del metal, en concentraciones superiores a las que se pueden encontrar en los suelos de interés. Además, el Cd no tuvo un impacto negativo sobre la actividad ureasa de los aislados. En consecuencia, se considera que la concentración de Cd en esos suelos no inhibiría el crecimiento o la actividad ureasa de las bacterias, lo cual es una ventaja para su posible uso en

aplicaciones en campo. También cabe destacar que los dos aislados *Serratia* pueden hidrolizar urea en niveles de oxígeno bajos independientemente de la presencia de Cd.

Este estudio proporciona nueva información sobre la microbiota presente en los suelos de Santander y contribuye a la investigación de la MICP en Colombia. Además, muestra el uso potencial de microorganismos endógenos que inducen la precipitación de carbonatos, para promover nuevas aproximaciones de remediación de la contaminación por Cd.

3. Potencial de biorremediación de Cd basado en la precipitación de carbonatos por *Serratia* spp. y *Acinetobacter* sp. aisladas de suelos de fincas cacaoteras en Santander, Colombia

3.1 Introducción

Actualmente, la contaminación de suelos y aguas con metales pesados representa uno de los problemas más graves a nivel ambiental en el planeta (Khalid *et al.*, 2017; Roosa *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2018), ya que tiene el potencial de afectar directamente la calidad del ambiente y la salud de los organismos vivos. Debido a esto, diversos estudios se han llevado a cabo en torno a la búsqueda de técnicas para mitigar la presencia de estos metales en el ambiente (Abbas *et al.*, 2017; Khalid *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2018; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2012; Zaghloul & Saber, 2019). Una de las técnicas que recientemente ha venido ganando interés investigativo en este contexto es la precipitación de carbonatos inducida microbiológicamente (MICP) por la ruta ureolítica (Figura 1-2), donde microorganismos productores de ureasa son usados para inmovilizar los metales pesados por precipitación en forma de carbonato (Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021).

Para que la remediación de metales por MICP se puede llevar a cabo, es necesario que los microorganismos remediadores presenten resistencia frente a la toxicidad del metal. La presencia de metales pesados en los suelos genera una gran alteración en la comunidad de microorganismos presentes (Sandaa *et al.*, 1999). En general, la comunidad de microorganismos en el suelo se transforma paulatinamente en virtud del estrés ejercido por los metales pesados (Ashraf & Ali, 2007; Karelová *et al.*, 2011), resultando en un aumento y selección de los microorganismos resistentes que previamente habitaban esos suelos (Roosa *et al.*, 2014), y en la aparición de nuevos microorganismos con resistencia, debido a transferencia horizontal de genes involucrados en la resistencia frente a estos metales (Coombs & Barkay, 2004; Oger *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008). Se conocen varios mecanismos genéticos bacterianos involucrados en la resistencia contra metales pesados (Figura 1-1) (Abbas *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2017; Silver, 1996), los más representativos

son los transportadores de metales pesados y los fijadores de metales (Abbas *et al.*, 2017; Jain & Bhatt, 2014; Naz *et al.*, 2005). Los transportadores están ampliamente distribuidos en el dominio Bacteria (Nies, 2003; Nongkhlaw & Joshi; 2019) y se pueden clasificar en tres grupos: *Root Nodulation Diffusion family* (RND), *Cation diffusion family* (CDF) y *PIB-type family* (Nongkhlaw & Joshi; 2019). Las principales proteínas de fijación de metales son las metalotioneínas, cuya función en las bacterias es enlazar los metales libres y fijarlos/inmovilizarlos para evitar su toxicidad (Abbas *et al.*, 2017). Con respecto al Cd, los genes u operones más comunes que confieren resistencia a las bacterias son el operón *cad*, que es común en Gram positivas y codifica para una ATPasa tipo P de eflujo de Cd^{2+} (Das & Dash, 2017; Jain & Bhatt, 2013; Naz *et al.*, 2005; Nongkhlaw & Joshi; 2019; Oger *et al.*, 2003); el operón *czc*, común en Gram negativas y que codifica para una bomba de eflujo de Co/Zn/Cd (Das & Dash, 2017; Jain & Bhatt, 2013; Karelová *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2019; Nongkhlaw & Joshi; 2019; Roosa *et al.*, 2014); el gen *smtAB*, que codifica para las metalotioneínas (Khan *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2016; Naz *et al.*, 2005); el gen *zntA*, que codifica para una ATPasa que transporta Pb, Cd, Zn y Hg (Khan *et al.*, 2017; Vidhyaparkavi *et al.*, 2017); y el gen *nccA*, que codifica para una proteína de eflujo de Ni/Co/Cd perteneciente a la familia RND (Kamika & Momba, 2013; Karelová *et al.*, 2011; Roosa *et al.*, 2014).

En condiciones naturales, la concentración de Cd es baja en el ambiente, con valores promedio de 0,2 mg kg^{-1} en la litosfera y 0,53 mg kg^{-1} en los suelos superficiales (Liu *et al.*, 2017). En algunas zonas de Colombia hay una alta presencia del metal en suelos con importancia agrícola. Por ejemplo, el departamento de Santander tiene un contenido promedio de Cd en suelo de 1,90 mg kg^{-1} (Bravo *et al.*, 2021), que supera ampliamente los límites recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para Cd en suelos y aguas residuales agrícolas (Kinuthia *et al.*, 2020). Además, Santander es el mayor productor de cacao a nivel nacional, con 28.037 toneladas producidas en 2021 (FEDECACAO, 2021), lo que equivale a 40,6% de la producción nacional. La elevada presencia del metal supone una amenaza para los productores de la zona ya que, para exportar sus productos, tienen que cumplir con ciertos límites máximos de Cd, como los impuestos por la Comisión Europea en 2019 (Meter *et al.*, 2019). También, la presencia de Cd en los productos derivados del cacao supone un riesgo a la salud del consumidor (Das & Dash, 2017; Zhao *et al.*, 2016). Por lo tanto, es urgente desarrollar y aplicar métodos

eficaces para mitigar la presencia de Cd en suelos cacaoteros con presencia del metal en Santander.

Revisando en literatura, sólo se encontró un reporte del uso de una bacteria del género *Serratia* para la remediación de Cd por MICP (Bhattacharya *et al.*, 2018). Asimismo, el género *Acinetobacter* tampoco ha sido ampliamente usado en este contexto (Chuo *et al.*, 2020; Su *et al.*, 2019). El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de remoción de Cd por tres bacterias ureolíticas (*Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a) aisladas de fincas cacaoteras de Santander, Colombia. Se analizó la remoción en dos concentraciones de Cd y los precipitados generados en estos procesos fueron identificados y caracterizados por microscopía óptica, DRX y SEM-EDX. También, se estudió la presencia de ciertos genes asociados a la resistencia de Cd y la posible influencia del metal sobre su expresión.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos químicos

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Las soluciones stock de Cd(II) (10 mM), Ni(II) (50 mM) y urea (500 g L^{-1}) se prepararon usando $CdCl_2.H_2O$ (Merck, Darmstadt, Alemania), $NiSO_4.6H_2O$ (Scharlau, Turkey) y urea (ChemCruz, Dallas, EE.UU.), respectivamente. Las soluciones de Ca(II) se prepararon desde $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (PanReac AppliChem, Alemania) o $CaCl_2.2H_2O$ (PanReac AppliChem, Alemania) según se especifique. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (121 °C, 15 psi durante 30 min) antes de su uso. Las soluciones de Cd(II), Ni(II), Ca(II) y urea se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania) y se añadieron a los medios de cultivo en condiciones asépticas.

3.2.2 Microorganismos y medios de cultivo

Las bacterias productoras de ureasa y resistentes a Cd usadas en este estudio, *Serratia* sp. 4.1a (Número de acceso GenBank OL376682), *Serratia* sp. 5b (Número de acceso GenBank OL376686) y *Acinetobacter* sp. 6a (Número de acceso GenBank OL376688), fueron aisladas previamente de suelos de fincas cacaoteras de Santander, Colombia (ver Capítulo 2: Caracterización y selección de bacterias ureolíticas resistentes a Cd aisladas

de fincas cacaoteras de Santander, Colombia). Para facilitar su uso, las tres bacterias se mantuvieron en un banco de trabajo, que consistió en cultivos en LB (peptona 10 g L^{-1}, extracto de levadura 5 g L^{-1}, NaCl 5 g L^{-1}) con 20% glicerol que se preservaron a -20 °C. Para cada experimento realizado, se hicieron subcultivos desde el banco de trabajo en medio de cultivo fresco (pre-inóculo) previo a su uso en el experimento.

Las bacterias se crecieron en medio LB suplementado con 30 g L^{-1} urea (LB + urea) y otras sustancias, según se especifica para cada experimento (ver abajo).

3.2.3 Efecto del Ni(II) sobre la actividad ureasa

El efecto de diferentes concentraciones de Ni(II) sobre el aumento del pH y la producción de amonio fue analizado para las tres bacterias. Un medio LB + urea se suplementó con concentraciones de Ni(II) que variaban de 0 a 300 µM. Cada bacteria se inoculó al 1% en cada concentración del metal y se incubó a 30 °C con 90 rpm de agitación durante 48 h. El pH se midió con un potenciómetro (pH 510 Series Meter, Oakton) y la producción de amonio se estableció con el método descrito anteriormente en este documento (ver sección 2.2.4 Caracterización y selección de los aislados). Los experimentos a cada concentración y para cada bacteria se realizaron por triplicado. Las medidas obtenidas para cada bacteria en el medio sin Ni(II) agregado, fueron tomadas como controles de la actividad ureasa.

3.2.4 Ensayo de resistencia a Cd

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cd(II) para cada bacteria se determinó mediante la técnica de dilución en caldo (Zhao *et al.*, 2016). A partir de un pre-inóculo cultivado durante la noche, se realizó una inoculación al 1% en un medio LB + urea, suplementado con concentraciones de Cd(II) que variaban de 0,01 a 4,00 mM. El crecimiento de las bacterias se midió como densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific), tras 72 h de incubación a 30 °C y agitación a 90 rpm. Los experimentos a cada concentración y para cada microorganismo se realizaron por triplicado. El crecimiento de las bacterias en medios sin Cd(II) se tomó como control positivo, mientras que la ausencia de turbidez en el medio sin bacterias se tomó como control negativo (Haroun *et al.*, 2017). La concentración más baja de Cd(II) que inhibió completamente el crecimiento se consideró como la CMI.

3.2.5 Experimentos de bioprecipitación de Cd

- Remoción de Cd en solución

La capacidad de remoción de Cd por MICP con coprecipitación de Ca(II), se determinó para las tres bacterias ureolíticas de interés. En matraces Erlenmeyer, debidamente esterilizados por autoclave, se añadieron 80 mL de medio LB + urea (30 g L^{-1}) suplementado con Ca(II) (6,80 mM desde $CaCl_2.2H_2O$) y Cd(II) (0,05 mM o 0,15 mM, según sea el caso). Para cada bacteria se hizo un control (sin bacterias) y tres inóculos (triplicado). Se inocularon células (1%) de un pre-inóculo cultivado la noche anterior y se incubaron a 30 °C bajo agitación constante durante 144 h. Para *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b los experimentos se hicieron a 40 rpm, mientras que para *Acinetobacter* sp. 6a se usó la agitación a 90 rpm. Durante el tiempo de incubación, se tomó una alícuota (1 mL) cada 24 h de cada matraz, se centrifugó y filtró con filtros de 0,22 µm, y se cuantificó el Cd en el sobrenadante por Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (F-AAS) (contrAA700, Analytik Jena). Todos los reactivos y muestras analizadas por F-AAS se prepararon por pesada. Previo a la cuantificación, a cada alícuota se le hizo un tratamiento ácido agregando 5 mL de HNO_3 concentrado (65%) y 2 mL de H_2O_2 concentrado (30%), y se diluyeron apropiadamente con HCl (1%) para que entraran dentro de la curva de calibración. Las eficacias de remoción de Cd (%R) en solución se calcularon comparando la concentración de Cd en el control sin bacteria ($C_{control}$) y las concentraciones de Cd residual en los tratamientos con bacteria ($C_{residual}$) (Ecuación (3.1)), para cada tiempo de muestreo durante las 144 h del experimento.

$$\%\mathrm{R} = \frac{C_{control} - C_{residual}}{C_{control}} \times 100 \qquad \text{Ecuación (3.1)}$$

- Producción y obtención de precipitados

Los precipitados analizados se obtuvieron por tres procedimientos diferentes, con el fin de probar cuál era el más adecuado. Para los tres casos, las bacterias se cultivaron en medio LB + urea (30 g L^{-1}) + Ca(II) (20,4 mM) + Cd(II) (0,15 mM) y se incubaron a 30 °C por al menos dos semanas o hasta observar la formación de precipitados en el medio. Se probaron ambas fuentes de Ca(II) ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$ y $CaCl_2.2H_2O$) para cada bacteria.

Todos los cristales lavados se recuperaron por filtración al vacío con filtros de 0,45 µm (Sartorius Biolab Products, Alemania).

El primer procedimiento se basó en los reportes de Bhattacharya *et al.* (2018) y Zhao *et al.* (2019). Brevemente, se centrifugó el cultivo líquido (4000 rpm, 10 min), se retiró el sobrenadante, se lavó el precipitado tres veces con agua repitiendo los dos anteriores pasos entre lavados, y finalmente se obtuvo el sólido por filtración. Para el segundo procedimiento, basado en los estudios de Montaño-Salazar *et al.* (2018) y Montoya *et al.* (2005), se partió de cultivo sólido, cortado en pedazos, que se adicionaron a 30 mL de agua desionizada en un tubo falcón. La mezcla se calentó en microondas (700 W) hasta derretir el agar, se esperó la sedimentación del precipitado y se retiró el medio de cultivo con pipeta. El precipitado se lavó tres veces con agua desionizada, repitiendo los anteriores pasos entre cada lavado, y se recuperó por filtración. Por último, el tercer procedimiento fue similar al segundo, pero partiendo de cultivo líquido. El cultivo se centrifugó (8500 rpm, 15 min), se retiró el sobrenadante, se añadieron 30 mL de agua desionizada y se calentó a ebullición durante 20 min para separar las bacterias de los precipitados generados; estos últimos se recuperaron por filtración.

Los precipitados recuperados se secaron a 60 °C durante al menos 2 días y se maceraron en mortero de ágata previo a los análisis. Para la bacteria *Acinetobacter* sp. 6a no se pudieron recuperar precipitados del segundo y tercer procedimiento.

3.2.6 Análisis de los precipitados

- Microscopía óptica y análisis cualitativo de carbonatos

La producción de precipitados y su morfología se monitoreó por microscopía óptica (CX31 Upright Microscope, Olympus). La presencia de carbonato se determinó cualitativamente añadiendo unas gotas de HCl 1,2 M a los precipitados, lo que genera efervescencia en presencia de carbonato debido a la producción de CO_2 (Ecuación (3.2), Montoya *et al.*, 2005). Esta reacción se siguió bajo el microscopio, ya que macroscópicamente fue difícil observar el burbujeo esperado.

$$CaCO_3 + 2\,HCl \longrightarrow CaCl_2 + H_2O + CO_2 \qquad \text{Ecuación (3.2)}$$

- Caracterización por DRX y SEM-EDX

La identificación de los precipitados generados por las bacterias se llevó a cabo por difracción de rayos X (DRX) (X-pert PRO Difractometer, PANalytical). Los análisis de DRX se hicieron bajo radiación CuKα 1,540598 Å, a un voltaje de 45 kV, una corriente de tubo de 40 mA, y un rango de barrido de 10 a 90° (2θ) en pasos de 0,026°. La identificación se llevó a cabo en el software HighScore Plus versión 3.0.5 (PANalytical, 2012, Almelo, The Netherlands) por comparación con los patrones de difracción reportados en la base de datos ICSD (Zagorac *et al.*, 2019). La morfología y tamaño de los precipitados se analizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) (VEGA3, TESCAN) haciendo uso de los detectores de electrones retrodispersados (BSE) y de electrones secundarios (SE). Los precipitados se montaron en cintas adhesivas de carbono conductoras, pegadas en portamuestras de aluminio, previo a la toma de imágenes por SEM. El análisis elemental de las muestras se realizó mediante espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX) (XFlash 410, Bruker) acoplada al equipo de SEM.

3.2.7 Amplificación por PCR de genes de resistencia a Cd

Se exploró la presencia de diferentes genes asociados a resistencia de Cd en las tres bacterias trabajadas. Para ello, se probaron varios primers, algunos reportados en literatura y otros diseñados. La información correspondiente a los primers trabajados se consigna en el Anexo A-1. Los primers cadSM-F, cadSM-R, zntA-F y zntA-R se diseñaron con la herramienta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012), a partir de dos genes de resistencia a metales pesados presentes en el genoma de *Serratia marcescens* RSC-14 (Khan *et al.*, 2017), que está depositado en GenBank bajo el número de acceso NZ_CP012639.1. Los códigos de los dos genes trabajados son AN479_RS08980 (gen *czc*) y AN479_RS21320 (gen *zntA*). Se buscaron pares de primers para generar amplicones entre 70 a 300 pb, con una temperatura de *melting* (Tm) de 59-61 °C, y una diferencia máxima de Tm de 1 °C entre el primer *forward* y el *reverse*. Para los demás parámetros en Primer-BLAST se usaron los valores por defecto.

El ADN de las tres bacterias se extrajo con el kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Co., EE.UU.) siguiendo las recomendaciones sugeridas por el proveedor. Las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los genes de resistencia a Cd se realizaron en un volumen final de 20 µL con buffer de amplificación 1X (2,0 µL de

buffer 10X), Mg^{2+} 1,5 mM (0,6 µL de $MgCl_2$ 50 mM), dNTPs 2 mM (0,4 µL de mezcla de dNTPs 10 mM), 0,4 mM de cada primer (0,8 µL de primer 10 mM), 1 U de Taq polimerasa (0,25 µL de Taq 5 U μL^{-1}, SMOBIO) y 1 µL de ADN molde (aproximadamente 100 ng), completando volumen con agua libre de nucleasas. El programa de amplificación usado fue: 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, X °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s; y por último 72 °C durante 5 min (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). La X en el programa de amplificación hace referencia a la temperatura de *annealing*, cuyo valor es específico para cada par de primers y se encuentra en el Anexo A-1. En los casos donde se presentaron productos inespecíficos de reacción, se repitió la PCR aumentando y disminuyendo las temperaturas de *annealing* en 1-3 °C. La producción de amplicones se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (HyAgarose™, HydraGene, China). El gel se reveló con SYBR Safe (Invitrogen, EE.UU.) y se fotodocumentó (Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator, Invitrogen). Los genes que amplificaron productos específicos y de tamaño esperado, fueron seleccionados para analizar su expresión diferencial en presencia y ausencia de Cd por RT-qPCR.

3.2.8 Experimentos de RT-qPCR

Las bacterias seleccionadas para experimentos de expresión diferencial fueron cultivadas a 30 °C y 90 rpm de agitación, durante 12 h (fase exponencial tardía), en tres medios (condiciones del experimento): 1) LB + urea 30 g L^{-1}; 2) LB + urea 30 g L^{-1} + Cd(II) 0,15 mM; y 3) LB + Cd(II) 0,15 mM. Para cada medio se hicieron tres cultivos, generando tres réplicas biológicas. A partir de estos cultivos se realizó la extracción de ARN. En todos los casos se usó material de plástico nuevo, estéril y libre de ARNasas/ADNasas. El material de vidrio usado (por ejemplo, vasos de precipitados para la preparación de soluciones) se lavó previo a su uso con hipoclorito de sodio (1%), descontaminante de superficies RNAse AWAY™ (Thermo Scientific, EE. UU.) y agua ultra-pura MilliQ libre de ARNasas. Igualmente, los reactivos usados fueron de grado de biología molecular y todas las soluciones se prepararon en agua DEPC. Todos los materiales y soluciones usadas se autoclavaron (121 °C, 15 psi durante 20 min) dos veces antes de su uso. El trabajo de la extracción se realizó bajo cabina de flujo laminar (Labconco), y todas las superficies involucradas se limpiaron constantemente con RNAse AWAY™ (Thermo Scientific™, EE. UU.) y etanol al 70%. La extracción del ARN se basó en un protocolo *in house*, amablemente compartido por la profesora Ph.D. Esperanza Torres Rojas de la Facultad

de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá. Brevemente, se recuperaron las bacterias del cultivo por centrifugación (5000 rpm, 4 °C) y se resuspendieron en una solución de lisozima (5 mg mL^{-1}) en buffer TE para incubar durante 30 min a 37 °C. Lo anterior se trató con un buffer de lisado/extracción (CTAB 2%; Tris HCl pH 8,0 100 mM; NaCl 1,4 M; Na_2SO_3 1%; PVP-40 2%; y 2-mercaptoetanol 2%) a 65 °C por 15 min para lisar las células y liberar el ARN. Posteriormente, se purificaron los ácidos nucleicos del lisado tratándolo con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) dos veces. De esta solución purificada, se precipitó el ARN por adición de LiCl 4M durante toda una noche a 4 °C. Después, el ARN se recuperó por centrifugación (12.000 rpm por 30 min a 4 °C), se trató con buffer TE-SDS para remover las proteínas asociadas al ARN, y se volvió a precipitar con isopropanol en medio con fuerza iónica alta (NaCl 5M). Finalmente, el *pellet* se lavó dos veces con etanol 70%, se secó al aire en la cabina de flujo laminar y se resuspendió en agua DEPC. La integridad del ARN extraído se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, EE. UU.). El gel se reveló (RNA EZ-Vision®, VWR, EE.UU.) y se fotodocumentó (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad). También, se cuantificó y midió la pureza del ARN por espectrofotometría (NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific). El ARN se trató con ADNasa I (Invitrogen, EE.UU.), según el protocolo del fabricante, para digerir el ADN que pudo ser coextraído y así evitar futuros falsos positivos en las qPCR. La digestión efectiva del ADN se verificó haciendo una PCR de tiempo final del gen *16S rRNA* (para las condiciones de la reacción ver sección 2.2.3 Derreplicación molecular e identificación de los aislados), usando el ARN digerido con ADNasa como molde. El ARN tratado con ADNasa se preservó a -80 °C y se trabajó en alícuotas para evitar degradación por ciclos de congelación/descongelación.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando el *ExcelRT™ Reverse Transcription Kit* (SMOBIO, Taiwán), siguiendo las recomendaciones sugeridas por el proveedor. Para cada reacción se partió de 5 µL de ARN tratado con ADNasa (aproximadamente 500 ng) y se hizo la transcripción reversa a 45 °C. El ADNc obtenido se cuantificó por fluorescencia (Qubit™ Fluorometer, Invitrogen) con el *Qubit™ ssDNA Assay Kit* (Invitrogen, EE. UU.). Basado en los datos de fluorescencia, los ADNc se diluyeron dos veces con agua DEPC; primero hasta llegar a 2 ng μL^{-1}, y después estas diluciones se volvieron a diluir (FD: 10; hasta llegar a 0,2 ng μL^{-1}). Los ADNc de la primera dilución se usaron como molde para las qPCR del gen de interés (GOI), mientras que los de la segunda dilución se usaron para las reacciones de los genes de referencia. El ADNc se preservó a -20 °C.

Cada reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 15 µL con Luna® Universal qPCR Master Mix 1X (New England Biolabs, EE. UU.) (7,5 µL del Master Mix 2X), 0,6 mM de cada primer (0,9 µL de primer 10 mM) y 2 µL de ADNc molde, completando a volumen con agua libre de nucleasas. Las reacciones fueron incubadas a 95 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, X °C durante 20 s y 60 °C durante 20 s (CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). La X en el programa de amplificación hace referencia a la temperatura de *annealing*, cuyo valor es específico para cada par de primers y se encuentra en el Anexo A-1. Tres réplicas técnicas se corrieron por cada réplica biológica. Al final de los ciclos de PCR, se realizó un análisis de curva de *melting* para validar la especificidad de los productos de PCR obtenidos. Los genes de referencia usados para normalizar los niveles de expresión por el método comparativo de C_q (Schmittgen & Livak, 2008) fueron *16S rRNA V4-V5*, *rpoB* y *gyrB*; los primers de estos dos últimos se consignan en Anexo A-1 y fueron diseñados con la herramienta Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012), a partir de secuencias de estos genes reportadas en bacterias del género *Serratia*. El cálculo de cada ΔCq se hizo restando el Cq del gen de interés (Cq_{GOI}) al Cq del gen de referencia (Cq_{REF}), como se observa en la Ecuación (3.3). Para evaluar cuál gen de referencia era más estable en las diferentes muestras analizadas, se usó el software RefFinder (http://www.heartcure.com.au/reffinder; Xie *et al.*, 2012). Se determinaron curvas de eficiencia para cada par de primers, por medio de diluciones seriadas de 10, usando ADNg como molde (Yun *et al.*, 2006). Las eficiencias (E) y los porcentajes de eficiencia (%E) se calcularon a partir de las pendientes de las curvas de eficiencia, siguiendo la Ecuación (3.4) y la Ecuación (3.5) (Bustin *et al.*, 2009).

$$\Delta Cq = Cq_{REF} - Cq_{GOI} \qquad \text{Ecuación (3.3)}$$

$$E = 10^{-1/pendiente} - 1 \qquad \text{Ecuación (3.4)}$$

$$\%E = E \times 100 \qquad \text{Ecuación (3.5)}$$

3.2.9 Análisis estadístico

La mayoría de los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar (SD). Las barras de error en los gráficos muestran

1 SD (desviación estándar) de las mediciones. Se usó un ANOVA de una sola vía para determinar las diferencias significativas entre concentraciones de Ni(II) sobre el pH y la producción de amonio. Este análisis se realizó con el software OriginPro versión 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Pruebas-t no pareadas se usaron para comparar las medias de ΔCq entre los tratamientos explorados en los experimentos de RT-qPCR (Presencia de Cd vs. Ausencia de Cd; Presencia de Cd sin urea vs. Presencia de Cd con urea). El anterior análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism versión 9.0.0. Un p-valor < 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Efecto del Ni(II) sobre la actividad ureasa

En general, la suplementación del medio de cultivo con Ni(II) no tuvo un efecto importante sobre el pH y la actividad ureasa de las bacterias del género *Serratia*, sin embargo, para *Acinetobacter* sp. 6a sí se presentó un impacto a 250 µM (Figura 3-1, Figura 3-2). Con respecto al pH, se apreció que la adición de Ni(II) no tuvo efecto en *Serratia* sp. 4.1a, mientras que para *Serratia* sp. 5b se dio un aumento estadísticamente significativo a 250 µM, comparado con el control sin Ni(II) adicionado (Figura 3-1). También, la presencia de 250 µM de Ni(II) en el medio de cultivo produjo un aumento muy significativo ($p < 0,001$) en el pH de *Acinetobacter* sp. 6a, comparado con las demás concentraciones de Ni(II) testeadas (Figura 3-1). Un comportamiento similar se presentó con respecto a la producción de amonio, donde no hubo cambios significativos para *Serratia* sp. 5b, se dio un aumento significativo a 100 µM con respecto al control para *Serratia* sp. 4.1a, y *Acinetobacter* sp. 6a a 250 µM presentó un aumento muy significativo ($p < 0,001$) en la producción del ion amonio (Figura 3-2).

El Ni(II) es importante para la actividad ureasa de las bacterias ya que sirve como cofactor de las ureasas (Liu *et al*., 2017b), y en algunos casos induce su transcripción (Benoit & Maier, 2011; Dosanjh & Michel, 2006). La mayoría de ureasas bacterianas se componen de tres genes estructurales (*ureA*, *ureB* y *ureC*), que forman la proteína, y cuatro genes accesorios (*ureE*, *ureE*, *ureG* y *ureD*), que están involucrados en la incorporación de Ni(II) en la apoureasa y su posterior buen funcionamiento (Benoit & Maier, 2011; Liu *et al*., 2017b). Así, la presencia de Ni(II) es vital para el buen funcionamiento de las ureasas, y es de esperarse que a mayor cantidad del ion mayor será la actividad ureasa. Alonso *et al.*

(2017) encontraron que la actividad ureasa de una cepa bacteriana ureolítica, aislada de suelos alcalinos semiáridos de México, aumentó significativamente con la adición de 8 y 10 mM de sulfato de níquel. De manera similar, Liu *et al.* (2017b) observaron un aumento en la actividad ureolítica de una apoureasa expresada en *E. coli* BL21(DE3), en presencia de 0,5 mM de Ni(II). Además, ellos encontraron que a concentraciones más altas de Ni(II) la actividad ureasa disminuye. Lo anterior se debe a que este metal a altas concentraciones reprime la transcripción de los genes de la ureasa (Benoit & Maier, 2011) y puede llegar a ser tóxico para las bacterias (Dosanjh & Michel, 2006). Este comportamiento se ratifica con nuestros resultados, ya que para *Acinetobacter* sp. 6a crecida en 300 µM de Ni(II), se observa una caída dramática del pH y la producción de amonio con respecto a los valores obtenidos en 250 µM (Figura 3-1, Figura 3-2).

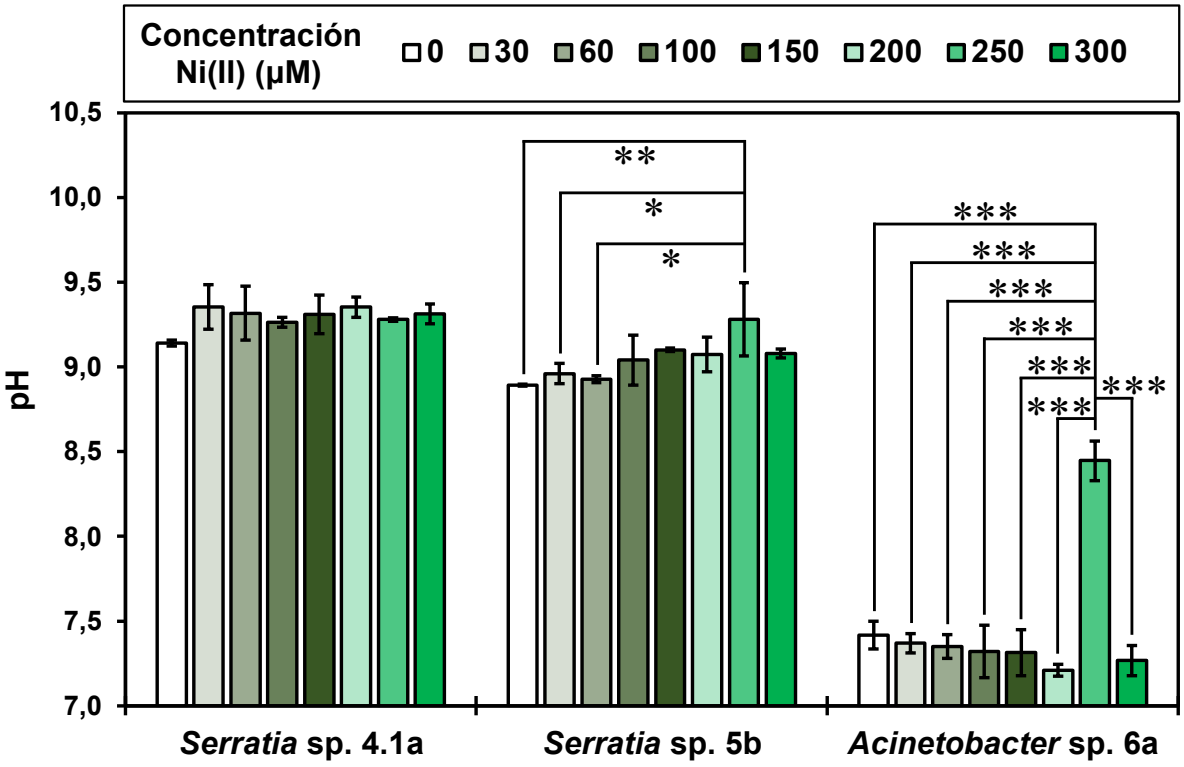


Figura 3-1: Efecto de diferentes concentraciones de Ni(II) sobre el pH del medio de cultivo después de 48 h de incubación a 30 °C y 90 rpm. Diferencias estadísticamente significativas: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

Con los resultados obtenidos se puede concluir que es necesario suplementar el medio de cultivo de *Acinetobacter* sp. 6a con 250 µM de Ni(II), para mejorar notablemente su

actividad ureasa. En cuanto a *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b, los medios de cultivo se podrían suplementar con 100 y 250 µM de Ni(II), respectivamente. Esta suplementación generaría que ambas bacterias *Serratia* tengan una mejora en su actividad ureasa desde la perspectiva estadística, pero en la práctica y desde la perspectiva bioquímica, el aumento no es tan importante.

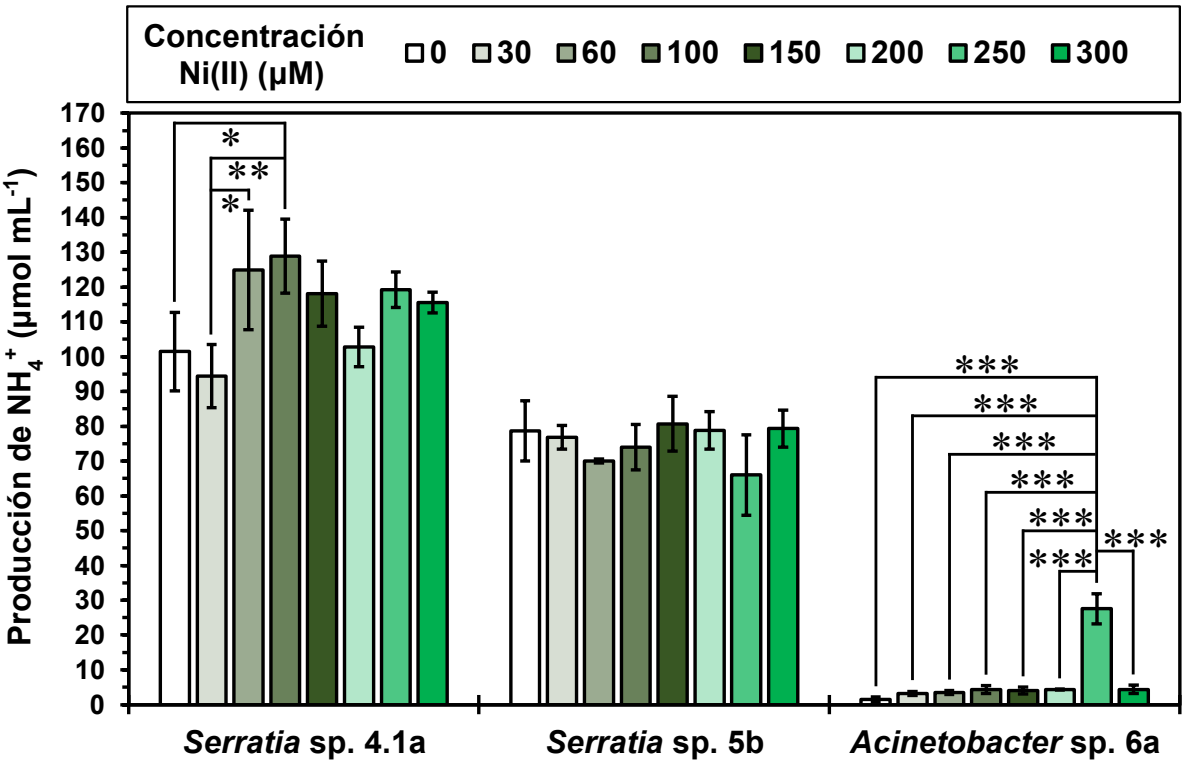


Figura 3-2: Efecto de diferentes concentraciones de Ni(II) sobre la producción de amonio después de 48 h de incubación a 30 °C y 90 rpm. Diferencias estadísticamente significativas: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

3.3.2 Resistencia de las bacterias a Cd

La bacteria *Acinetobacter* sp. 6a mostró una inhibición completa del crecimiento a 1,00 mM, mientras que las bacterias *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b presentaron crecimiento hasta 2,00 mM e inhibición completa a 4,00 mM (Figura 3-3). Estos resultados concuerdan con otros valores de CMI determinados en estudios para otras bacterias, incluyendo los géneros *Acinetobacter* y *Serratia*. Haroun *et al.* (2017) encontraron una inhibición completa del crecimiento a 20 mM y un crecimiento muy bajo a 10 mM para un aislado de

Pseudomonas aeruginosa. Por otro lado, Choudhary *et al.* (2012) trabajaron con cepas bacterianas aisladas de residuos de minas de uranio, que presentaron CMI de Cd alrededor de 0,1 y 2,0 mM. Entre ellas, dos aislados *Serratia* exhibieron inhibición del crecimiento a 0,1 mM. Otro ejemplo proviene del trabajo de Méndez *et al.* (2017), donde se evaluó la tolerancia a los metales pesados de varias cepas de *Acinetobacter*, encontrando valores de CMI de Cd entre 0,22 y 1,23 mM.

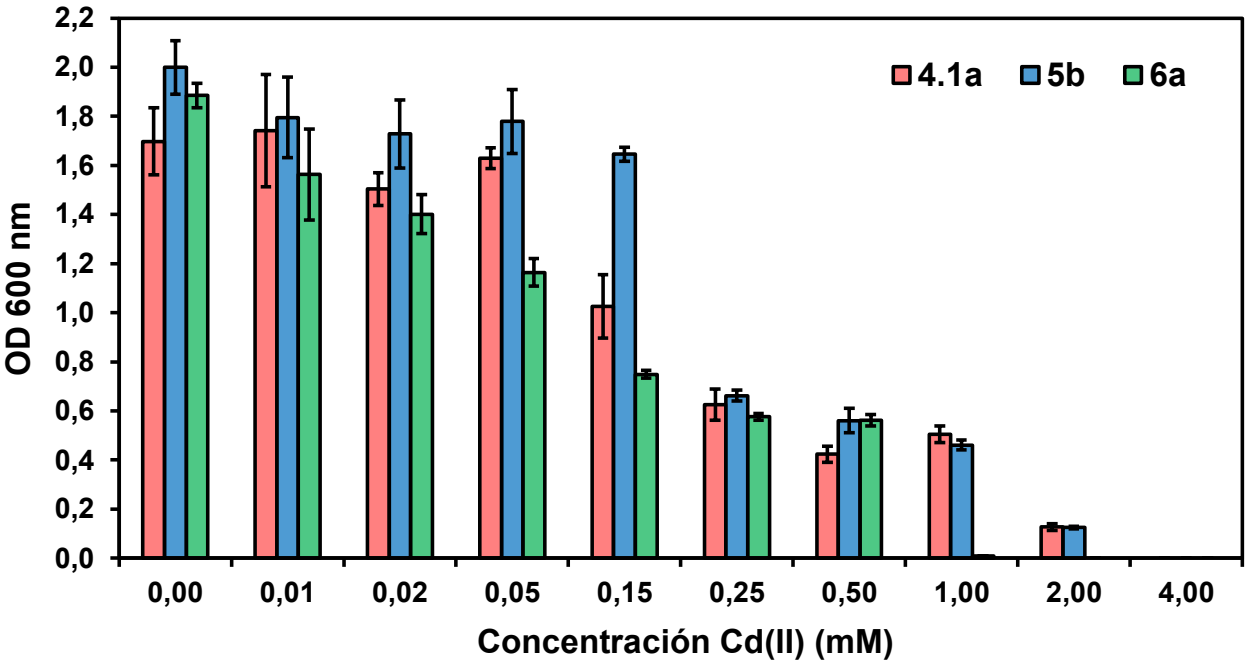


Figura 3-3: Crecimiento bacteriano de las bacterias *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en diferentes concentraciones de Cd(II), después de 3 días de incubación a 30 °C.

La toxicidad del Cd a determinada concentración es uno de los factores más cruciales para su eficiente eliminación por parte de las bacterias. Es importante porque el Cd afecta directamente al crecimiento bacteriano y puede inhibir las actividades enzimáticas, lo que puede conducir a la disminución de la actividad ureasa (Bhattacharya *et al.*, 2018) y la afectación de otros mecanismos de eliminación de metales pesados. Por lo tanto, las concentraciones de Cd que se pueden encontrar en los suelos cacaoteros del departamento de Santander (0,01 - 27,00 mg kg^{-1} (Bravo *et al.*, 2021), que, haciendo las conversiones pertinentes, equivalen aproximadamente a $8{,}90 \times 10^{-5}$ - 0,24 mM) son un factor limitante para el uso de bacterias como técnica de remediación. Tomando en cuenta

lo anterior, las bacterias trabajadas en el presente estudio pueden crecer a las concentraciones presentes en los suelos de cacao, e incluso crecer a concentraciones de metal más altas. Así, la alta resistencia de estos aislados frente al Cd, a las concentraciones presentes en los suelos a remediar, representa una ventaja para futuros usos de estas bacterias en aplicaciones de campo.

3.3.3 Remoción de Cd en solución

Se pudo determinar que las tres bacterias, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, presentaron un alto porcentaje de remoción de Cd en solución. Las que mejor removieron el metal fueron las dos bacterias del género *Serratia*, presentando porcentajes de remoción de más del 99% (Figura 3-4, Figura 3-5) en las dos concentraciones de Cd(II) trabajadas. Para 0,05 mM de Cd(II) se dieron porcentajes máximos de remoción de 99,70% (*Serratia* sp. 4.1a) y de 99,62% (*Serratia* sp. 5b). Por su parte, para 0,15 mM de Cd(II) se presentaron máximos de remoción de 99,30% (*Serratia* sp. 4.1a) y 99,57% (*Serratia* sp. 5b). Para ambas bacterias se tuvieron porcentajes de remoción mayores al 99% desde las 48 h de tratamiento en 0,05 mM de Cd(II) (Figura 3-4), mientras que este mismo porcentaje de remoción se alcanzó a las 96 h para el aislado *Serratia* sp. 5b y a las 120 h para *Serratia* sp. 4.1a en 0,15 mM de Cd(II) (Figura 3-5). El único reporte de uso de bacterias del género *Serratia* para biorremediación de Cd por MICP es el de Bhattacharya *et al.* (2018), donde encontraron 96% de remoción de Cd en un medio con Cd(II) 5 mg L^{-1} (aproximadamente 0,0445 mM), urea y Ca(II) durante 96 h de incubación. Cabe destacar que las dos cepas del género *Serratia* (*Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b) aquí reportadas presentan mejores remociones que la reportada por Bhattacharya *et al.* (2018) y, además, estos resultados se encontraron en concentraciones más altas que las trabajadas por esos autores. También vale la pena señalar que *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b presentaron porcentajes de remoción de Cd comparables y aún más altas que las reportados para otras bacterias (Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa et al., 2019; Zheng *et al.*, 2021). Todo esto sugiere que las dos bacterias del género *Serratia* evaluadas tienen buena prospección para ser usadas en aplicaciones de biorremediación del metal.

Por otro lado, el aislado *Acinetobacter* sp. 6a presentó un máximo de remoción de 98,87% en el tratamiento con 0,15 mM de Cd(II) (Figura 3-5), mientras que para 0,05 mM se dio un máximo de 91,23% de remoción (Figura 3-4). En general no se encontró un desempeño

tan bueno como el encontrado para los aislados *Serratia*, pero igualmente presenta porcentajes de remoción que se consideran buenos y son comparables con aquellos reportados para otras bacterias (Rajasekar *et al.*, 2021; Tamayo-Figueroa *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2021). Su *et al.* (2019) reportaron un porcentaje de remoción de Cd del 100% por parte de *Acinetobacter* sp. en condiciones óptimas determinadas en el trabajo. Así, los resultados del presente trabajo son comparables con este reporte, teniendo en cuenta que no se hizo una optimización de las condiciones. Esto demuestra que la *Acinetobacter* sp. 6a también podría ser seleccionada como candidata en aplicaciones de biorremediación en campo.

Con respecto a la concentración inicial de Cd(II) en el medio de cultivo, se observó que ésta tiene un efecto de retraso sobre la eficacia de remoción del metal, es decir, el proceso de remoción es más lento entre más concentración de Cd(II) esté presente en el medio. Las dos bacterias del género *Serratia* lograron remover más del 90% de Cd(II) durante las primeras 24 h de tratamiento en 0,05 mM de concentración inicial del metal; mientras que, para el mismo tiempo pero en 0,15 mM, se tienen porcentajes de remoción más bajos, de 33,45 y 9,84% para *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b, respectivamente. Esto se debe a que el aumento en la concentración de Cd(II) tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano (Figura 3-3) y la actividad enzimática (Bhattacharya *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2014). En el caso de *Acinetobacter* sp. 6a, para ambas concentraciones trabajadas, la remoción no sucede abruptamente en 24 h como para las *Serratia* en 0,05 mM de Cd(II), sino que aumenta progresivamente durante las 144 h del experimento (Figura 3-4, Figura 3-5). Curiosamente, la *Acinetobacter* sp. 6a fue capaz de remover más metal al final del tratamiento en 0,15 mM que en 0,05 mM. Este resultado se puede deber a un aumento en la actividad ureasa de la bacteria crecida en 0,15 mM de Cd(II) en comparación con el cultivo en 0,05 mM. Esto sugiere una posible respuesta frente al estrés generado por presencia de una mayor concentración de Cd(II) (Chen *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2022) (Como se observó en el anterior capítulo en las curvas de pH y producción de amonio de *Acinetobacter* sp. 6a, Figura 2-10).

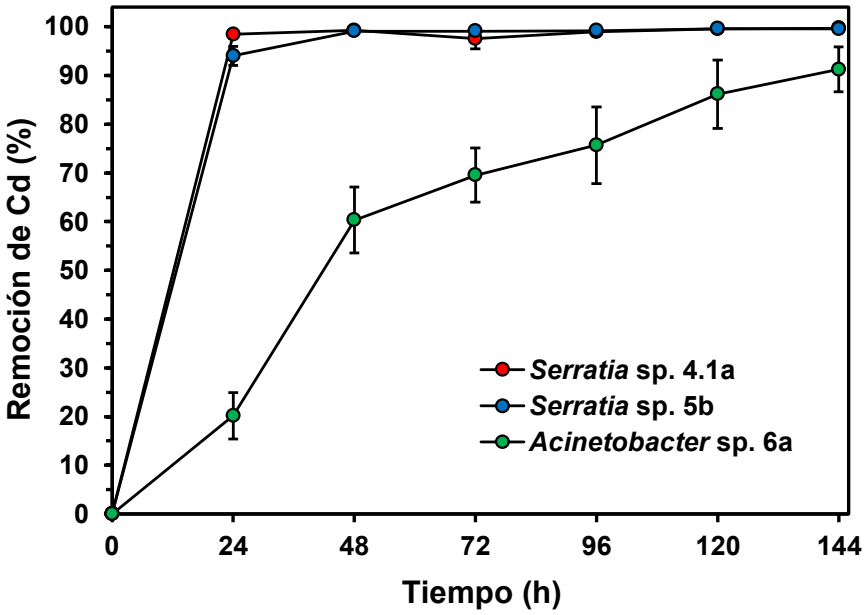


Figura 3-4: Remoción de Cd(II) por *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido LB + urea (30 g L^{-1}) suplementado con Ca(II) (6,80 mM) y Cd(II) (0,05 mM). Las bacterias se crecieron en agitación constante a 30 °C.

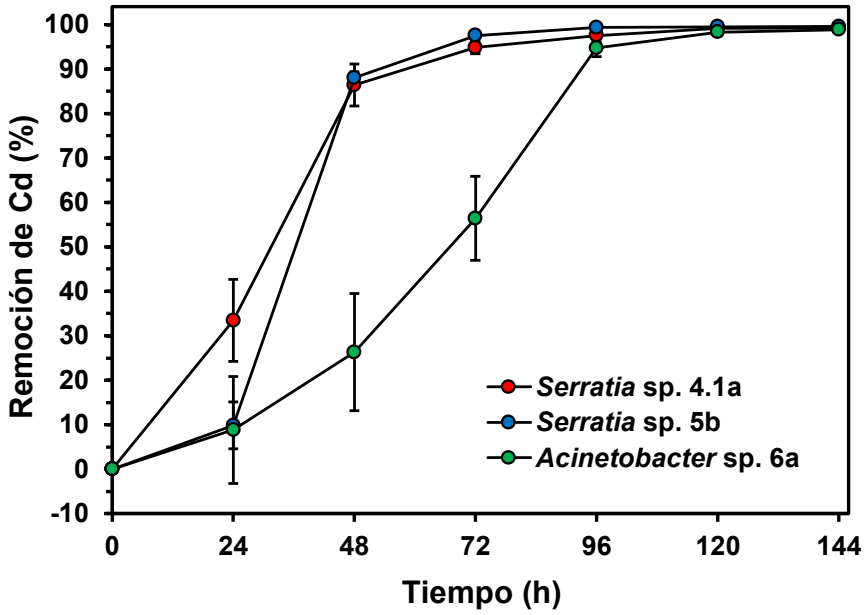


Figura 3-5: Remoción de Cd(II) por *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido LB + urea (30 g L^{-1}) suplementado con Ca(II) (6,80 mM) y Cd(II) (0,15 mM). Las bacterias se crecieron en agitación constante a 30 °C.

3.3.4 Análisis de los precipitados producidos por MICP

- Microscopía óptica y análisis cualitativo de carbonatos

Las tres bacterias produjeron precipitados en el medio de cultivo suplementado con urea, Ca(II) y Cd(II). Las bacterias *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b formaron alta cantidad de precipitados cuando la fuente de Ca(II) fue $CaCl_2.2H_2O$ (Figura 3-6 A y C), mientras que en $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ se observó menor precipitación o incluso ausencia del fenómeno (Figura 3-6 B y D). Esto es un comportamiento esperado, ya que la fuente de Ca(II) que se usa en el proceso de MICP tiene un efecto directo sobre la actividad ureasa y la producción de cristales de las bacterias (Achal & Pan, 2014). Por otro lado, la bacteria *Acinetobacter* sp. 6a formó precipitados con ambas fuentes de Ca(II) (Figura 3-6 E y F), aunque estos fueron escasos y de menor tamaño. Con respecto a la morfología de los precipitados, se pudo observar que, en medio sólido, los cristales generados por las bacterias del género *Serratia* presentan formas esféricas o cúbicas sin los bordes definidos, mientras que aquellos producidos por *Acinetobacter* sp. 6a presentan en general una forma octaédrica (bipirámide con base cuadrada). Es importante destacar que la bacteria *Serratia* sp. 4.1a también forma cristales con formas bipiramidales cuando se encuentra en medio líquido (Anexo A-5).

Para tener un primer indicio de si los precipitados generados por las bacterias eran carbonatos, se hizo una prueba cualitativa con HCl sobre los precipitados recuperados desde medios de cultivo líquido sin calentamiento (primer procedimiento de obtención de precipitados descrito en la sección 3.2.5 Producción y obtención de precipitados). A partir de estos experimentos se encontró que hay presencia de carbonatos en los precipitados generados por las bacterias, ya que en contacto con HCl se produjo efervescencia (Figura 3-7 C-E), lo cual indica producción de CO_2 desde CO_3^{-2} (Ecuación (3.2)). Fue importante probar que la producción de gas no se diera por reacción entre el HCl y la bacteria o residuos de esta, por lo que se hizo la reacción con bacteria recuperada de cultivo sin urea, para evitar la formación de precipitados, obteniendo ausencia de efervescencia (Figura 3-7 A y B). Asimismo, un control positivo de la reacción se usó con fines de comparación visual (Figura 3-7 F). Generalmente este tipo de experimento cualitativo se hace por observación macroscópica al ojo desnudo, pero, a partir de los resultados obtenidos, se concluye que la observación bajo microscopio es necesaria en los casos donde se tenga

poca muestra, ya que permite una clara observación del fenómeno de efervescencia, disminuyendo la posibilidad de tener un falso negativo.

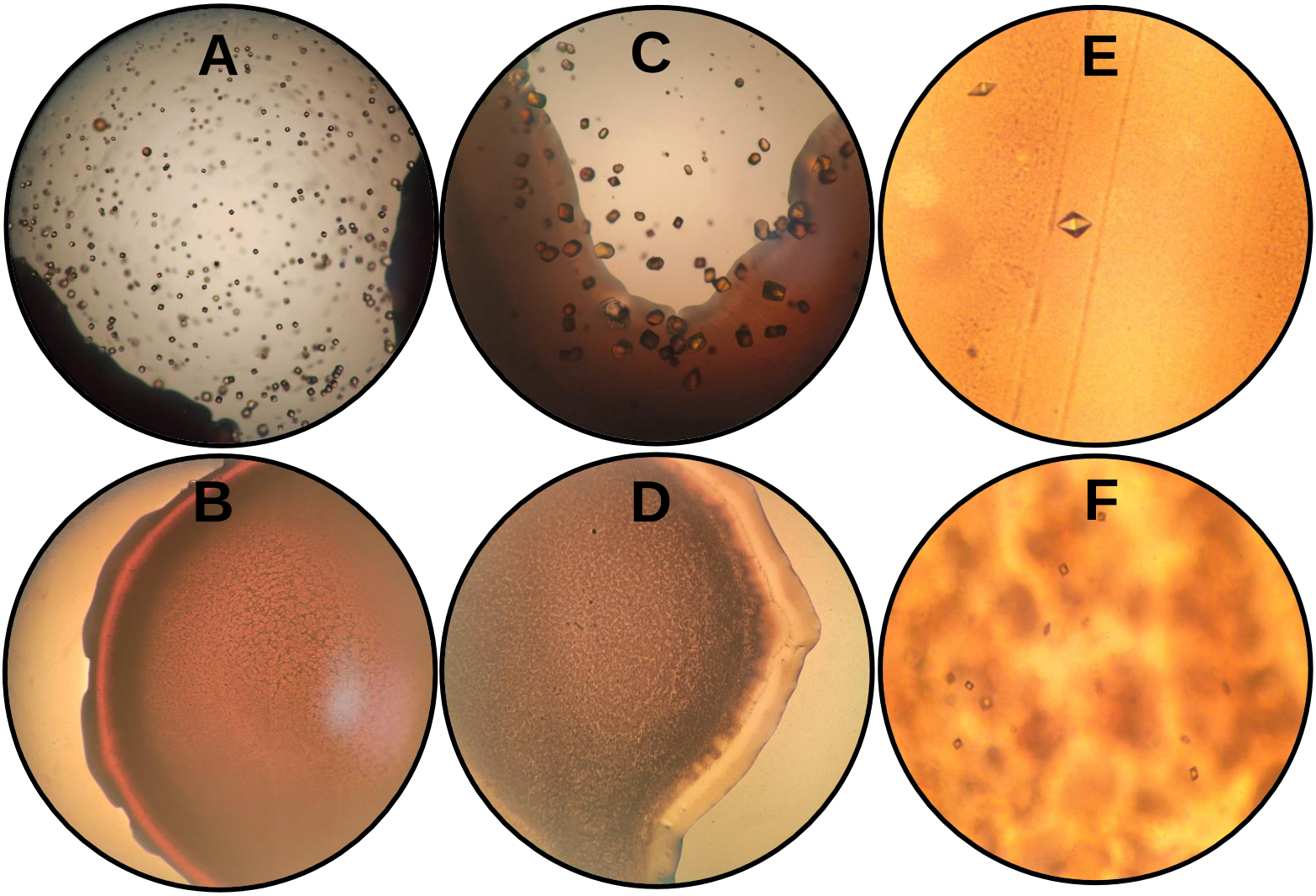


Figura 3-6: Precipitados producidos por las tres bacterias incubadas en medio sólido LB + urea (30 g L^{-1}) + Ca(II) (20,4 mM) + Cd(II) (0,15 mM), durante 6 días a 30 °C. Se probaron dos fuentes de Ca(II), $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ y $CaCl_2.2H_2O$. (A) Precipitados de *Serratia* sp. 4.1a con $CaCl_2.2H_2O$; (B) Precipitados de *Serratia* sp. 4.1a con $Ca(NO_3)_2.4H_2O$; (C) Precipitados de *Serratia* sp. 5b con $CaCl_2.2H_2O$; (D) Precipitados de *Serratia* sp. 5b con $Ca(NO_3)_2.4H_2O$; (E) Precipitados de *Acinetobacter* sp. 6a con $CaCl_2.2H_2O$; (F) Precipitados de *Acinetobacter* sp. 6a con $Ca(NO_3)_2.4H_2O$. Observación al microscopio óptico con 40X de aumento, exceptuando las imágenes E y F que se tomaron a 100X.

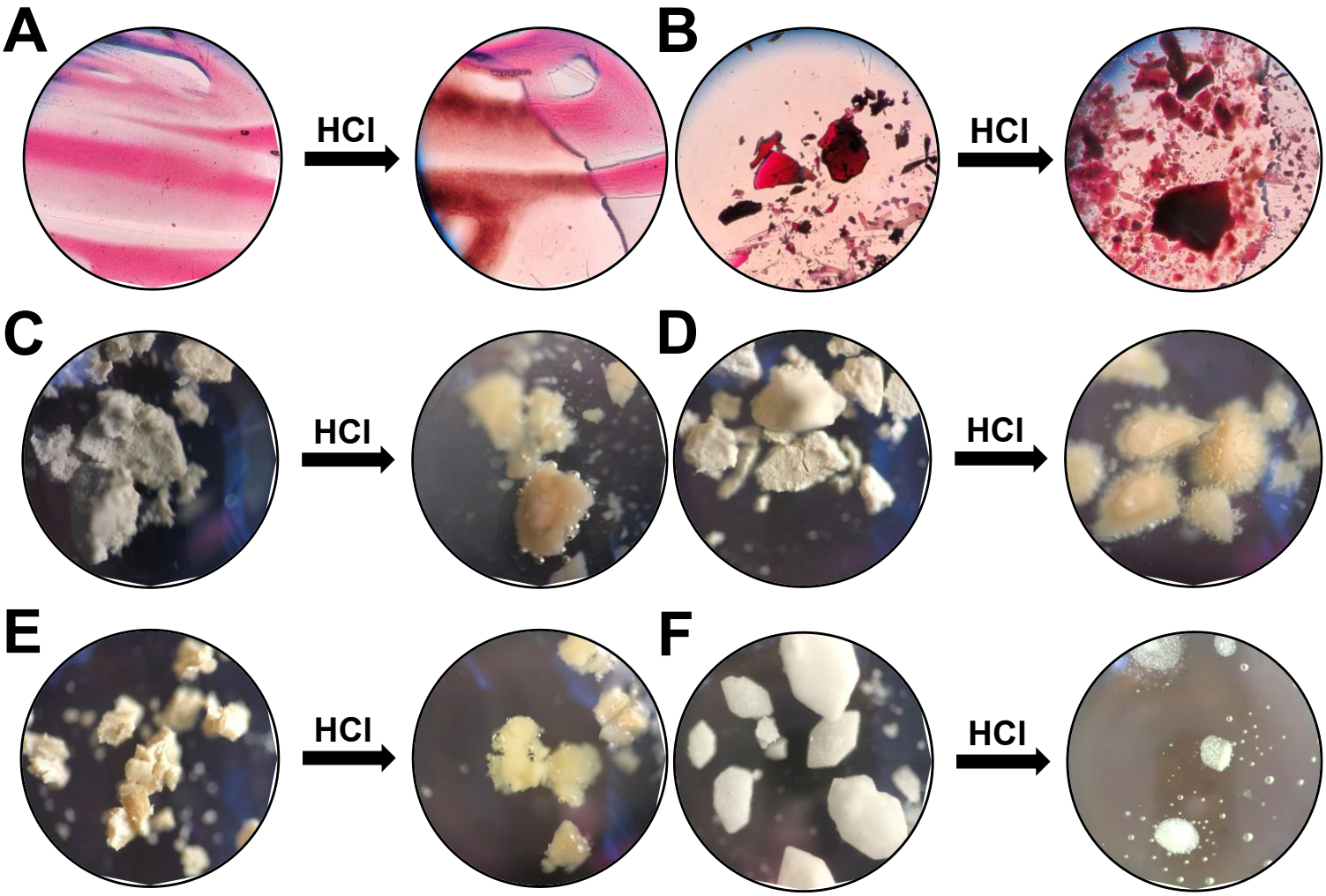


Figura 3-7: Prueba cualitativa de carbonatos realizada con HCl 1,2 M. Imágenes tomadas bajo microscopio óptico (Olympus CX31; 100X de aumento). (A) Control negativo, bacteria fresca sin precipitados; (B) Control negativo, bacteria seca sin precipitados; (C) Precipitados de *Serratia* sp. 4.1a; (D) Precipitados de *Serratia* sp. 5b; (E) Precipitados de *Acinetobacter* sp. 6a; (F) Control positivo, Na_2CO_3.

- Análisis por DRX

Los precipitados obtenidos a partir de *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b fueron identificados como calcita por comparación de los patrones de DRX con bases de datos (Figura 3-8). Infortunadamente, en el caso de la bacteria *Acinetobacter* sp. 6a no se pudo hacer la identificación, debido a que en el proceso de filtrado y obtención de los precipitados se presentaron problemas que impidieron tener suficiente cantidad y calidad

de muestra para los análisis. Los tres principales inconvenientes fueron la baja cantidad de precipitado formado por *Acinetobacter* sp. 6a, el pequeño tamaño de los pocos cristales formados, y la capacidad de producción de surfactantes por parte de bacterias del género *Acinetobacter* (Chen *et al.*, 2012), lo cual impidió la correcta filtración. Aun así, usando el primer procedimiento de obtención de precipitados (desde medio de cultivo líquido y sin calentamiento), se pudo recuperar un precipitado cuyo patrón de DRX (Figura 3-8) se asemeja al del carbonato de calcio amorfo (Wang *et al.*, 2015). De esta manera, se confirma la capacidad de precipitación de carbonatos por parte de las bacterias *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b. Por otro lado, todo el trabajo realizado con *Acinetobacter* sp. 6a apunta a que los precipitados obtenidos a partir de esta bacteria son carbonatos, pero aun así se necesita hacer la identificación con una técnica robusta (por ejemplo, DRX) para afirmar inequívocamente esta premisa.

En la mayoría de artículos científicos consultados para este trabajo, no se encontró una descripción clara del proceso de recuperación de precipitados/cristales. Para nuestro caso, con el procedimiento más reportado y común en literatura (el que llamamos “primer procedimiento”, desde cultivo líquido y sin calentamiento), se obtenían sólidos que a simple vista se veían muy contaminados con biomasa de bacterias. Por lo anterior, se probaron otros dos procedimientos de recuperación de precipitados, cuya diferencia fundamental radicó en el uso de calentamiento para desligar los cristales de las bacterias (Montoya *et al.*, 2005) y disminuir la solubilidad del carbonato de calcio en agua (Coto *et al.*, 2012). Como ya fue mencionado anteriormente, los precipitados de *Acinetobacter* sp. 6a sólo se recuperaron usando el primer procedimiento, por lo que no se pudo hacer comparación de métodos de recuperación de precipitados para esta bacteria, siendo solo realizado para las bacterias del género *Serratia*. Se observó que el calentamiento tuvo un alto impacto en la calidad de precipitado recuperado. Esto se observa claramente en la diferencia entre los patrones de DRX obtenidos para los precipitados recuperados sin calentamiento y con calentamiento (Figura 3-9). Para el caso del primer procedimiento (desde medio líquido y sin calentamiento), se obtiene un patrón similar al del carbonato de calcio amorfo (Wang *et al.*, 2015), el cual indica una baja cristalinidad. Al contrario, para el segundo y tercer procedimiento (desde medio sólido con calentamiento y medio líquido con calentamiento, respectivamente), se obtienen patrones de difracción con picos claros que coinciden con los de la calcita. Se proponen dos hipótesis para explicar este comportamiento: (1) en los precipitados obtenidos por el procedimiento sin calentamiento quedan muchas bacterias

adheridas, lo que genera una disminución en la pureza y cristalinidad, mientras que al calentar las bacterias estas se desprenden del sólido lo que permite obtener un cristal menos contaminado; y (2) las bacterias *Serratia* están generando carbonato de calcio amorfo que se puede transformar a calcita al someterlo a un proceso de calentamiento (Cartwright *et al.*, 2012; Garvie *et al.*, 2022). Se requieren más experimentos y el uso de otras técnicas más robustas para probar o refutar estas hipótesis.

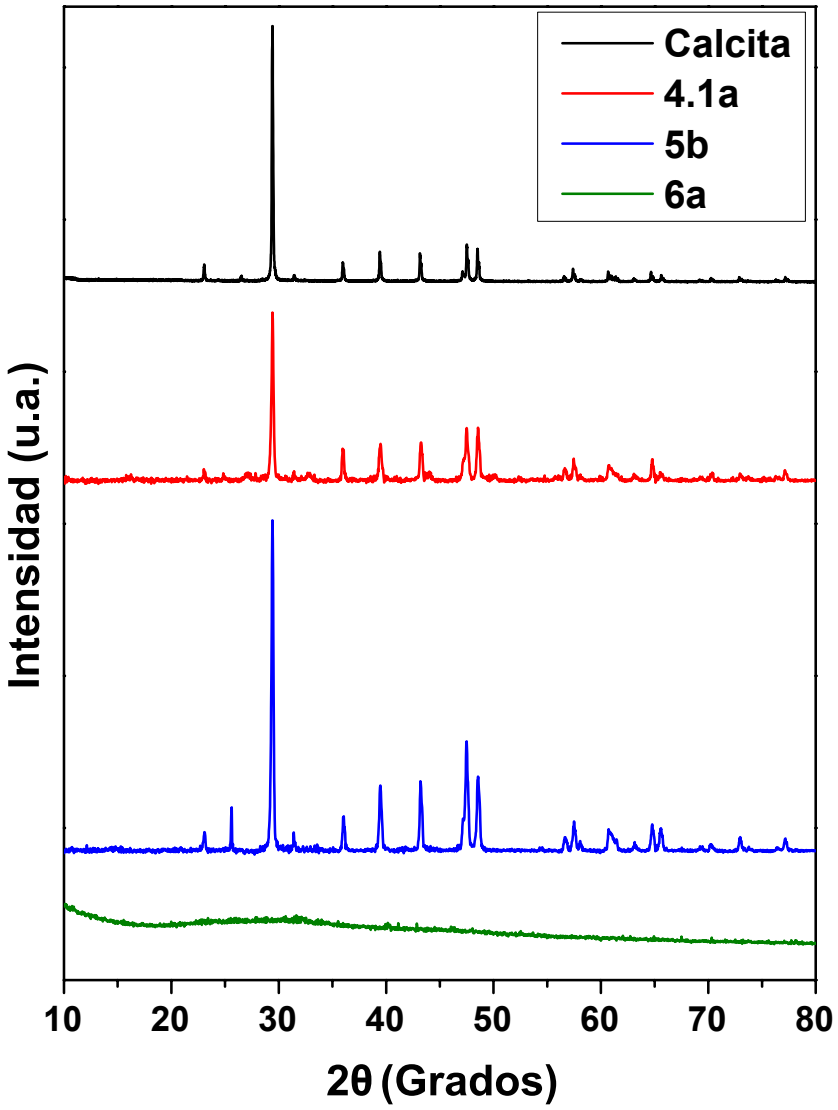


Figura 3-8: Patrones de DRX de los precipitados generados por *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b en medio sólido, y *Acinetobacter* sp. 6a en medio líquido. El patrón del control de calcita se tomó de la base de datos RRUFF.

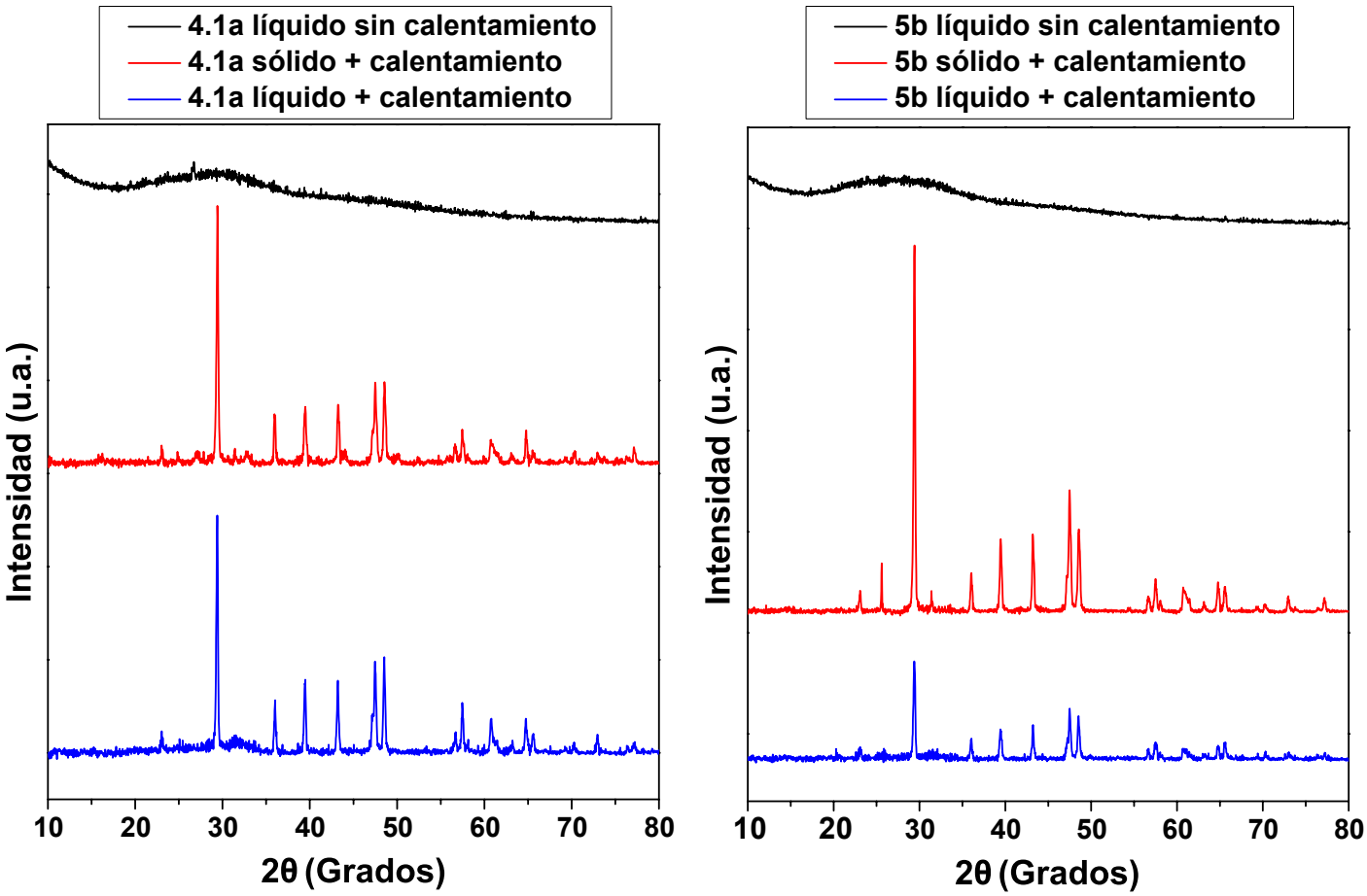


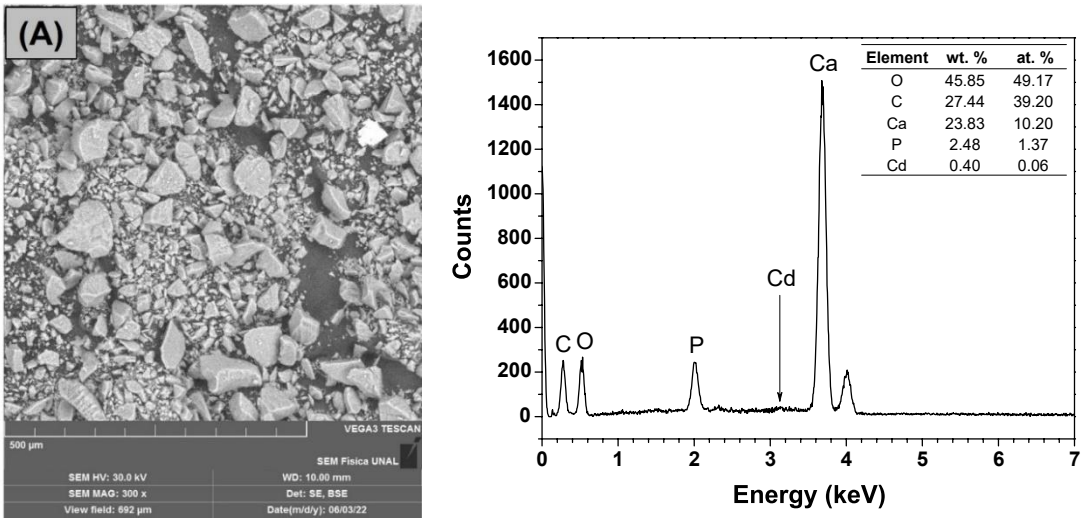
Figura 3-9: Comparación de los patrones de DRX de los diferentes procedimientos de obtención de precipitados usados. Difractogramas de los precipitados de *Serratia* sp. 4.1a (izquierda) y de *Serratia* sp. 5b (derecha). "líquido sin calentamiento" hace referencia al primer procedimiento, "sólido + calentamiento" al segundo procedimiento, y "líquido + calentamiento" al tercer procedimiento.

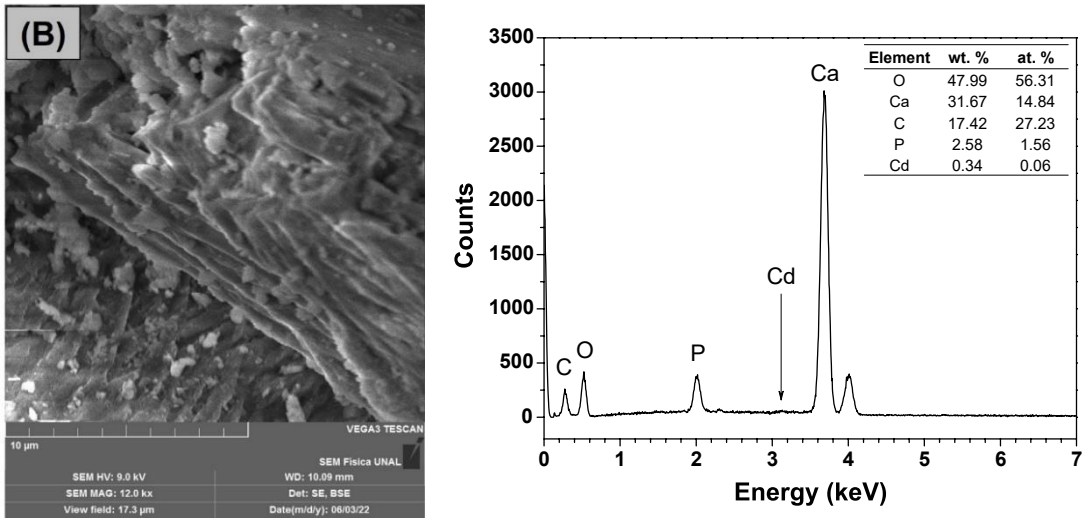
- <u>Análisis por SEM-EDX</u>

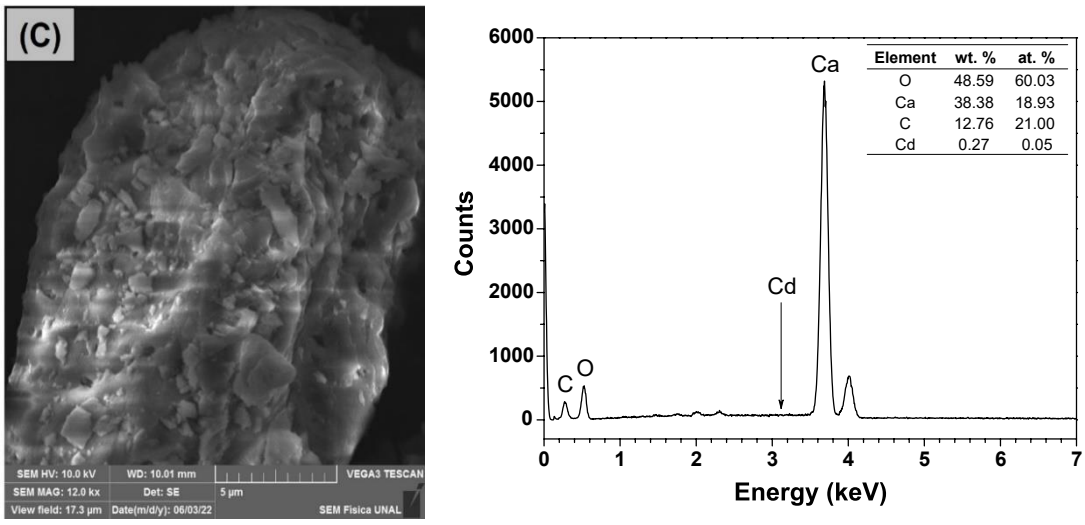
Los precipitados generados por *Serratia* sp. 4.1a y *Serratia* sp. 5b presentaron variedad de formas y tamaños. En general, se observaron cristales aglomerados y con formas irregulares (Figura 3-10). Bhattacharya *et al.* (2018) también encontraron formas similares para el carbonato de calcio y cadmio precipitado por una cepa de *Serratia marcescens*. Los tamaños de los precipitados variaron mucho, encontrándose sólidos aglomerados de 100 µm de diámetro, hasta pequeños cristales con diámetros entre 2 y 5 µm. La variación en tamaños y formas de estos precipitados se debe a que los microorganismos tienen un

impacto directo sobre la nucleación y formación de estos minerales (Benzerara *et al.*, 2011; Zhao *et al*., 2019), por ejemplo, pueden inhibir el crecimiento de los cristales en ciertas direcciones al producir ciertas moléculas, lo que conlleva a la formación de precipitados con formas particulares (Benzerara *et al.*, 2011). Así, el proceso de bioprecipitación dependerá de cada especie y de distintos factores biológicos (Frankel & Bazylinski, 2003; Li *et al*., 2010), produciendo precipitados con diferentes formas y tamaños. Cabe destacar que ambas bacterias produjeron precipitados en forma de placas apiladas (Figura 3-10 B y E), estructura que ha sido reportada anteriormente para carbonato de calcio (Cheng *et al.*, 2014; Li *et al*., 2010).

Con respecto al análisis elemental por EDX, se observó la presencia de Cd en los precipitados y se confirmó la precipitación de carbonato de calcio por parte de las bacterias (Figura 3-10). De esta forma se demuestra que el Cd se está inmovilizando sobre el carbonato de calcio precipitado por las bacterias, fenómeno que ya había sido descrito y comprobado experimentalmente en otros trabajos (Bhattacharya *et al.*, 2018; Khadim *et al.*, 2019). Es importante notar que la proporción de Cd frente a los demás elementos es muy baja, y hasta en algunas zonas de los precipitados no se pudo encontrar (datos no mostrados). Lo anterior se puede explicar debido a tres razones: (1) en el medio de cultivo inicial la cantidad de Ca(II) es mucho mayor a la de Cd(II), con 136 veces más del primero que del segundo ([Ca(II)]/[Cd(II)]=136); (2) el EDX es una técnica de superficie, por lo que el análisis elemental que se está obteniendo sólo tiene en cuenta la parte exterior de los precipitados, mas no analiza el Cd que se está inmovilizando dentro del *bulk* de carbonato de calcio; y (3) no se tuvieron en cuenta los otros mecanismos de inmovilización de Cd (ver sección 1.1.4 Biorremediación de metales pesados usando bacterias), que muy probablemente tengan una buena participación en la remoción del metal, por lo que habría menos Cd disponible para inmovilizarse en forma de carbonato. Por lo tanto, se hace prudente analizar y cuantificar el Cd retenido en estos precipitados, para tener una mejor idea del papel de la MICP en la remoción de Cd por parte de las bacterias trabajadas.


(A)
500 µm
VEGA3 TESCAN
SEM Fisica UNAL
SEM HV: 30.0 kV
WD: 10.00 mm
SEM MAG: 300 x
Det: SE, BSE
View field: 692 µm
Date(m/d/y): 06/03/22
Counts
Energy (keV)
C
O
P
Cd
Ca
Element wt. % at. %
O 45.85 49.17
C 27.44 39.20
Ca 23.83 10.20
P 2.48 1.37
Cd 0.40 0.06


(B)
10 µm
VEGA3 TESCAN
SEM Fisica UNAL
SEM HV: 9.0 kV
WD: 10.09 mm
SEM MAG: 12.0 kx
Det: SE, BSE
View field: 17.3 µm
Date(m/d/y): 06/03/22
Counts
Energy (keV)
C
O
P
Cd
Ca
Element wt. % at. %
O 47.99 56.31
Ca 31.67 14.84
C 17.42 27.23
P 2.58 1.56
Cd 0.34 0.06


(C)
SEM HV: 10.0 kV
WD: 10.01 mm
VEGA3 TESCAN
SEM MAG: 12.0 kx
Det: SE
5 µm
View field: 17.3 µm
Date(m/d/y): 06/03/22
SEM Fisica UNAL
Counts
Energy (keV)
C
O
Cd
Ca
Element wt. % at. %
O 48.59 60.03
Ca 38.38 18.93
C 12.76 21.00
Cd 0.27 0.05

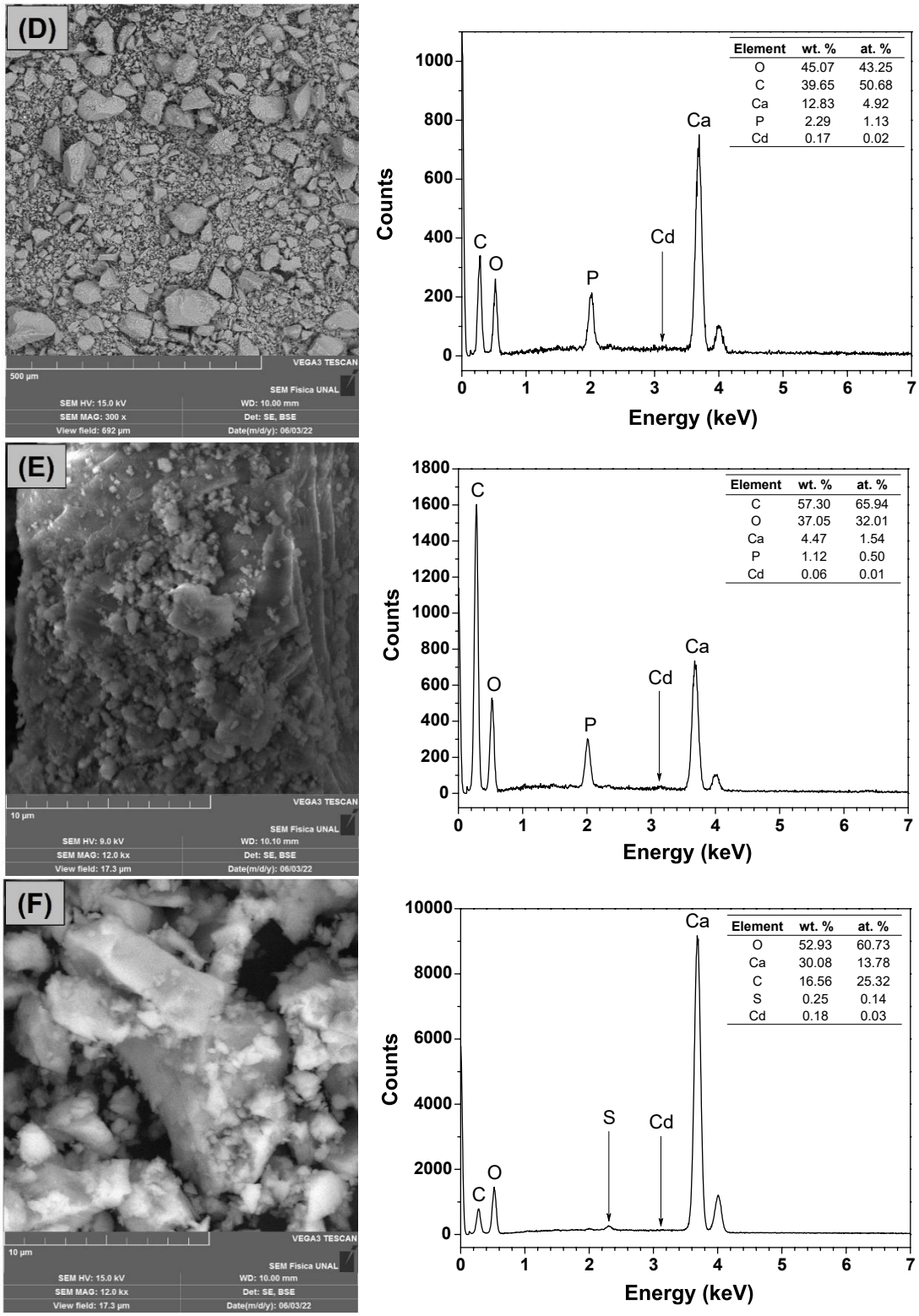


Figura 3-10: Micrografías de SEM (*izquierda)* y sus respectivos espectros EDX (*derecha*) de los precipitados producidos por *Serratia* sp. 4.1a (A-C) y *Serratia* sp. 5b (D-F).

3.3.5 Genes de resistencia a Cd presentes en las bacterias

Para evaluar el posible origen de la resistencia a Cd de las bacterias *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, se amplificaron diferentes genes asociados a resistencia a Cd (Anexo A-1) por PCR de tiempo final, a partir del ADN de las tres bacterias en cuestión. Se determinó la presencia de genes asociados al operón *czc* en *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, como se observa en la Figura 3-11 en el tercer carril de la zona E y en el cuarto carril de la zona C, respectivamente. Este operón codifica para una bomba de eflujo que permite el transporte de Co, Zn y Cd por difusión hacia el interior/exterior de la célula (Das & Dash, 2017; Kamika & Momba, 2013), mecanismo que usan las bacterias para bioacumular los metales tóxicos o expulsarlos, y así resistir al estrés causado por estas especies químicas. Esto indica que las cepas *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, tienen la capacidad de acumular el Cd y de esta forma inmovilizarlo. Así, como era de esperarse, estas bacterias no sólo dependen de la actividad ureasa como respuesta frente al estrés del metal, sino que poseen al menos otro mecanismo extra para hacer frente a este obstáculo.

Con respecto a los otros primers probados, se encontró que en algunos casos no hubo amplificación (por ejemplo, para los genes *cadA* y *nccA*, Figura 3-11 zonas A y D), mientras que en otros hubo amplificación inespecífica (por ejemplo, para los genes *smtAB* y *zntA*, Figura 3-11 zonas B y F). De lo anterior no se puede concluir la ausencia de ciertos genes en las bacterias, sólo se puede afirmar que los primers usados no fueron adecuados para determinar la presencia de estos genes. Por consiguiente, se podrían probar otros primers, ya sean reportados en literatura o diseñados, para seguir explorando la presencia de genes de resistencia a Cd en estas bacterias; o mejor, se debería hacer uso de otras técnicas más robustas para tal fin, como lo son la metagenómica funcional (Zheng *et al*., 2019) o los estudios de transcriptómica por RNA-seq (Lu *et al*., 2017). Por ejemplo, Huang *et al.* (2022) estudiaron el mecanismo molecular por el cual *Bacillus velezensis* LB002 lleva a cabo el proceso de mineralización de Cd en altas concentraciones de éste. Para ello, usaron la aproximación de RNA-seq con confirmación por RT-qPCR, encontrando que el estrés de Cd permite una regulación positiva sobre algunos genes relacionados con la producción de vaterita, indicando que esta bacteria puede inducir la mineralización del Cd para reducir la toxicidad del mismo.

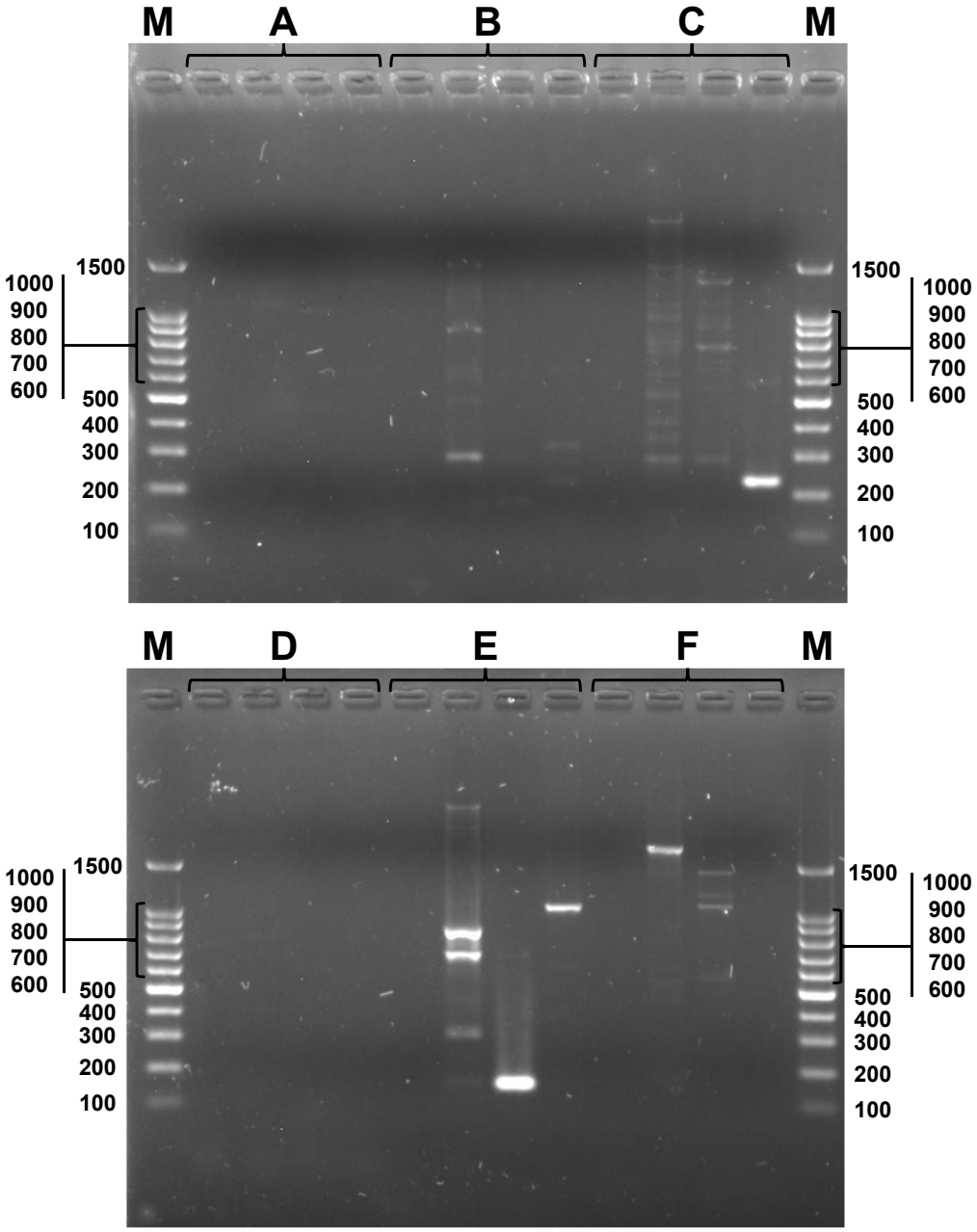


Figura 3-11: Electroforesis de los productos de PCR de los genes de resistencia a Cd. Cada letra mayúscula de A a F corresponde a los productos de PCR para un gen, con las muestras ordenadas en cada carril de izquierda a derecha como Control negativo, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a. Genes: *cadA* (A), *smtAB* (B), *czcA* (C), *nccA* (D), *czc* (E), *zntA* (F). Condiciones de corrida: Gel de agarosa 1,5%, buffer TBE, 90 V, 70 min de corrida. M, marcador molecular 100 bp plus DNA Ladder (Bioron). Valores de escalera molecular en bp (pares de bases).

3.3.6 Expresión diferencial del gen *czc*

Los experimentos de expresión diferencial se llevaron a cabo para el gen *czc* en la bacteria *Serratia* sp. 5b. No se pudo realizar este análisis para *Acinetobacter* sp. 6a, a pesar de que el gen se encuentra también en esta bacteria (Figura 3-11), debido a problemas en su crecimiento y en la extracción del ARN. El ARN total obtenido de los cultivos de *Serratia* sp. 5b se mantuvo intacto al final del proceso de extracción (Anexo A-6), presentando en la electroforesis dos bandas claramente definidas para los ARNr 23S/16S y sin un *smearing* considerable (Winz *et al.*, 2017). Además, la pureza de estas muestras de ARN se confirmó midiendo las relaciones 260/280 y 260/230 por espectrofotometría (Anexo A-6), tal como se solicita en las guías MIQE para publicar datos de RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2009). La ausencia de ADNg en las muestras de ARN, y por consiguiente la eficacia de la ADNasa I usada, se comprobó (Anexo A-7), obteniendo productos de PCR del gen *16S rRNA* únicamente en los controles positivos (ADNg y muestras de ARN sin tratar con ADNasa). Así, con la información anterior, se concluye que el ARN usado para los experimentos tenía las características adecuadas para realizar las reacciones de transcripción reversa.

Tabla 3-1: Eficiencias calculadas a partir de las curvas de eficiencia (Anexo A-8) para cada par de primers usados en los experimentos de RT-qPCR.

Gen	Primers	Eficiencia	Porcentaje de eficiencia (%)
czc (GOI[a])	cadSM-F cadSM-R	1,08	108
gyrB	gyrB-F gyrB-R	1,12	112
rpoB	rpoB-F rpoB-R	1,03	103
16S rRNA V4-V5	519F 909R	1,10	110

[a] GOI: Gene of Interest

Para hacer un correcto análisis de expresión diferencial de genes, es necesario que la eficiencia de los primers usados para las qPCR presenten valores en el rango de 90-110%

(Schmittgen & Livak, 2008). Los primers usados en el presente trabajo presentaron eficiencias dentro de este rango (Tabla 3-1), exceptuando aquellos para el gen *gyrB* cuyo porcentaje es un poco más alto que el máximo permitido. También, es importante destacar que el gen de referencia *16S rRNA V4-V5* fue el que menor variación en la expresión presentó en las tres condiciones estudiadas (Figura 3-12), es decir, se considera el gen de referencia más estable para el presente estudio. El gen *gyrB* fue el menos estable, lo que significa que en las condiciones probadas su expresión varía considerablemente.

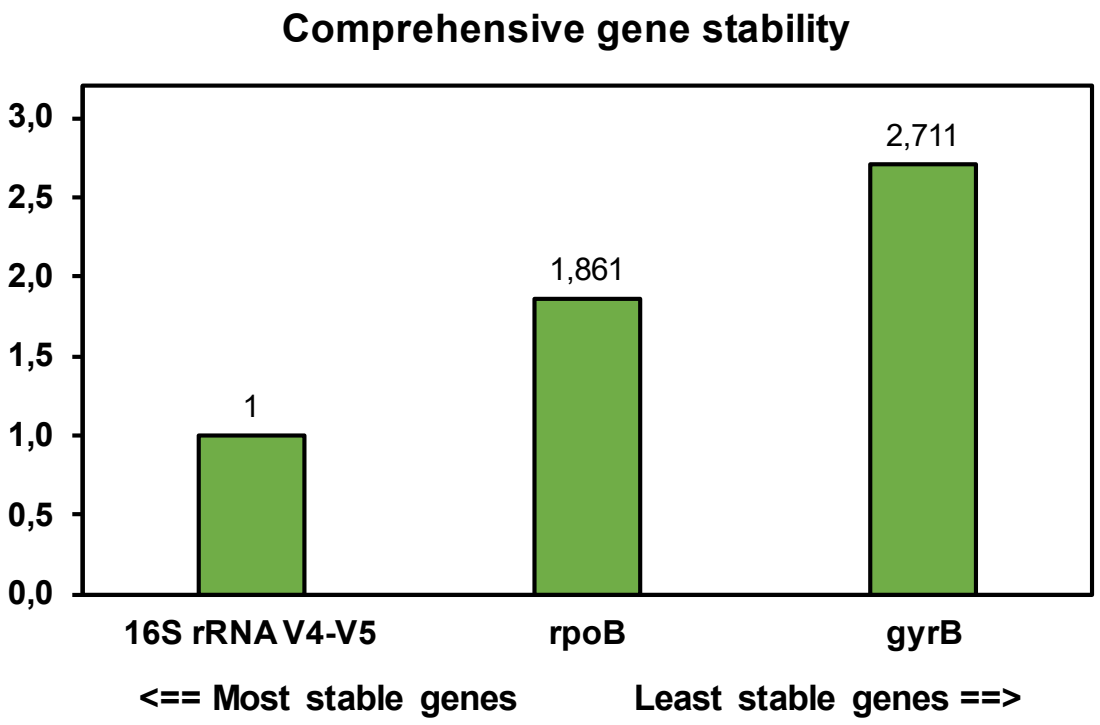


Figura 3-12: Estabilidad de los genes de referencia en las condiciones estudiadas. Ranking final entregado por RefFinder, que tiene en cuenta diferentes programas computacionales (geNorm, Normfinder, BestKeeper, y el método comparativo Delta-Ct) para comparar y ranquear los genes según su estabilidad.

Los resultados de los experimentos de RT-qPCR indican que la presencia de Cd(II) no juega un papel significativo en la expresión del gen *czc* en *Serratia* sp. 5b; sin embargo, la presencia de urea (en presencia de Cd(II)) sí aumenta significativamente la expresión de este gen (Figura 3-13). Chi *et al.* (2020) reportaron la expresión diferencial de los genes de resistencia a Cd *cadA*, *czcD* y *zitB* en *Bacillus megaterium* NCT-2 y *Bacillus*

paranthracis NT1, cultivados en presencia y ausencia de Cd(II). Ellos encontraron que la expresión del gen *cadA* aumenta cuando la bacteria se expone a Cd(II), lo que sucede igualmente para el gen *zitB* en *B. megaterium* NCT-2. Por el contrario, encontraron que el gen *czcD* de *B. paranthracis* NT1 disminuye su expresión en presencia del metal. En el presente estudio, la expresión del gen *czc* en *Serratia* sp. 5b pudo no ser alterada por la presencia de Cd debido a la concentración relativamente baja de éste a la cual fue expuesta la bacteria, considerando que puede crecer en concentraciones más altas que 0,15 mM (Figura 3-3). Curiosamente, la expresión del gen en cuestión sí se vio afectada por la presencia de urea, al menos al tener en cuenta los resultados con el gen más estable (*16S rRNA V4-V5*) como gen de referencia. Buscando en la literatura, no se encontraron reportes que documenten la sobreexpresión de un gen de resistencia a Cd por presencia de la urea, lo que significa que este es, aparentemente, el primer reporte de este fenómeno. Este resultado parece contraintuitivo teniendo en cuenta que la urea permite que la bacteria precipite el Cd, disminuyendo así su toxicidad y por consiguiente no tendría necesidad de sobreexpresar el gen de resistencia al metal. Todavía no se tiene una justificación clara para explicar lo encontrado, por lo tanto, se deben hacer más experimentos y análisis que conlleven a su explicación.

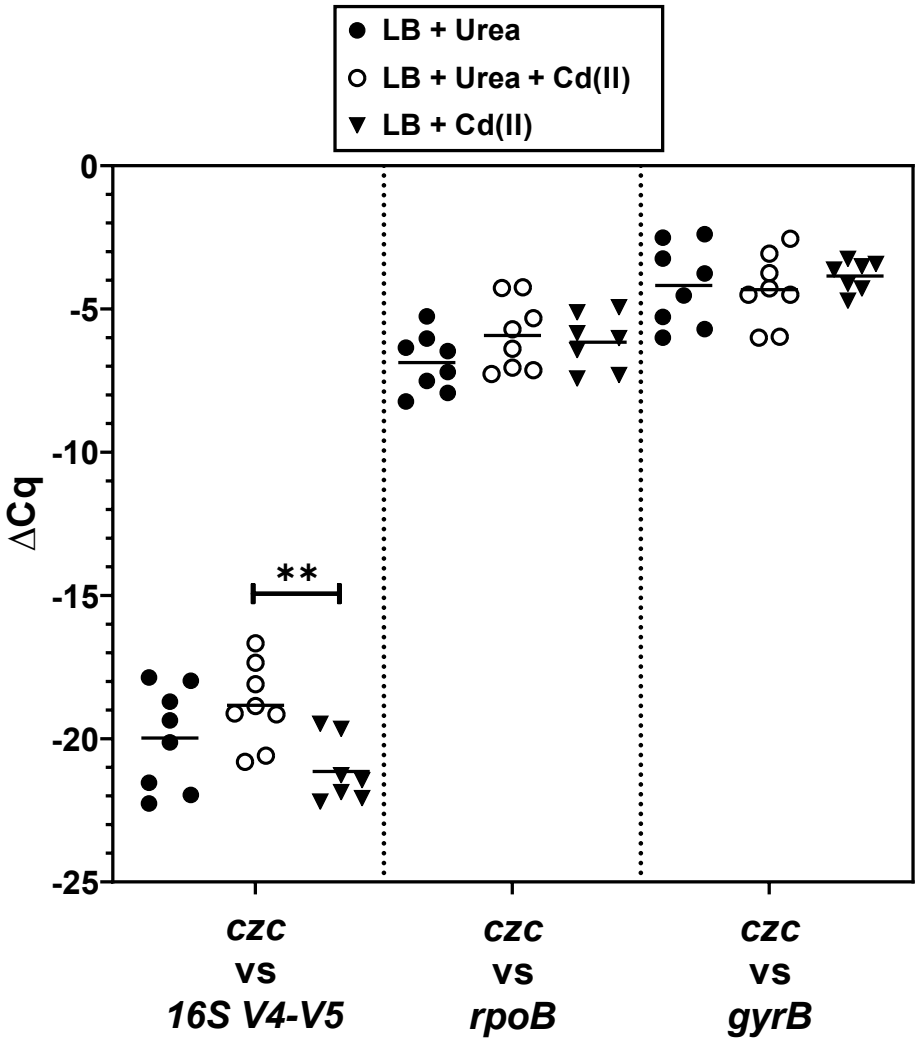


Figura 3-13: Dot plot de la expresión del gen *czc* de *Serratia* sp. 5b normalizado frente a los tres genes de referencia usados, para los tres diferentes tratamientos estudiados (LB + Urea; LB + Urea + Cd(II); LB + Cd(II)). Las líneas horizontales hacen referencia a la media de los datos. Diferencias estadísticamente significativas: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***).

3.4 Conclusiones

El presente trabajo registró la capacidad de las bacterias *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, para remover Cd en medio acuoso basado en el mecanismo de MICP. Las bacterias del género *Serratia* presentaron porcentajes de remoción de Cd cercanas al 100%; mientras que la *Acinetobacter* sp. 6a presentó un porcentaje de

remoción cercano al 90% con una concentración inicial de 0,05 mM de Cd(II), aunque mostró casi 100% de remoción en 0,15 mM de Cd(II) inicial. El análisis de los precipitados obtenidos sugiere que parte del Cd se inmovilizó en una matriz de calcita, pero también se cree que otros mecanismos están involucrados en la alta remoción del metal por parte de estas bacterias. También, se concluye que la suplementación del medio de cultivo con Ni(II) no afecta notablemente la actividad ureasa de las bacterias del género *Serratia*, pero sí tiene un efecto positivo sobre la misma actividad en el caso de *Acinetobacter* sp. 6a. Además, se determinó que estas bacterias pueden sobrevivir en concentraciones de Cd(II) mayores a las encontrados en los suelos que se pretenden tratar, dado que, por ejemplo, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a poseen el operón *czc* que les confiere resistencia frente al estrés del Cd. La expresión del gen *czc* en *Serratia* sp. 5b no se vio afectada por la presencia de Cd, pero sí por la presencia de urea, cuyo efecto fue regular positivamente su expresión.

El presente trabajo es de los pocos que reportan una gran eficacia de bacterias de los géneros *Serratia* y *Acinetobacter* para remover Cd(II) por MICP. Además, se reporta por primera vez la expresión diferencial del gen de resistencia a Cd *czc* en presencia de urea. Este estudio proporciona información que explica el potencial uso de estas bacterias en biorremediación de suelos con presencia de Cd; además, contribuye a la generación de conocimiento alrededor de la microbiota presente en suelos colombianos y del uso de MICP en biorremediación de metales pesados.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

En el presente trabajo se analizó el potencial de bioremediación de Cd de un grupo de bacterias ureolíticas resistentes al metal, aisladas de suelos cacaoteros con presencia de Cd, provenientes del municipio de El Carmen de Chucurí, Santander. Se seleccionaron tres bacterias, *Serratia* sp. 4.1a, *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, que presentaron buenas características para ser usadas en aplicaciones de remediación. Las tres bacterias tuvieron la habilidad de crecer en presencia de Cd(II), en concentraciones superiores a las que se pueden encontrar en algunos suelos de Santander. En general, el Cd no tuvo un impacto negativo sobre la actividad ureasa de las bacterias seleccionadas, por lo que se hace viable su uso en remediación por MICP. Las bacterias del género *Serratia* removieron cerca del 100% de Cd(II) durante 144 h de tratamiento a concentraciones iniciales de 0,05 y 0,15 mM, en experimentos en medio acuoso. Por otro lado, la bacteria perteneciente al género *Acinetobacter* tuvo un porcentaje de remoción cercano a 90% en 0,05 mM de Cd(II) inicial, mientras que a 0,15 mM pudo remover casi el 100% del metal. Luego, se confirmó la bioprecipitación de $CaCO_3$ por parte de las bacterias, y en algunos casos se encontró Cd en esta matriz. Así, se comprobó la inmovilización de Cd por coprecipitación de calcita por parte de las bacterias trabajadas. Esta capacidad de remoción y bioprecipitación de Cd por parte de las bacterias se sustenta en la facultad que tienen para resistir el estrés generado por el metal. Así, se determinó la presencia de un gen, perteneciente al operón *czc*, en las bacterias *Serratia* sp. 5b y *Acinetobacter* sp. 6a, el cual les confiere resistencia frente al Cd. Asimismo, se pudo establecer que la expresión de este gen no se ve afectada por la presencia del metal, pero sí aumenta su expresión en presencia de urea.

Este trabajo muestra el potencial uso de bacterias ureolíticas en aplicaciones de remediación de Cd. Además, contribuye en la investigación y generación de conocimiento sobre la microbiota presente en los suelos colombianos y su posible uso. También, hace parte de los pocos reportes que se han hecho en Colombia sobre MICP para remediación de metales pesados. Cabe destacar que, hasta donde sabemos y hemos investigado, sólo hay un reporte de remoción de Cd por MICP usando bacterias del género *Serratia* (Bhattacharya *et al.*, 2018), por lo que el presente trabajo sería el segundo reporte, mostrando la capacidad y alta eficacia de dos bacterias de este género para remover Cd

por MICP, lo que conlleva a una gran prospección de uso en este contexto. Igualmente, se reporta por primera vez el efecto de la urea sobre la expresión de un gen de resistencia a Cd.

4.2 Recomendaciones

Para comprobar el potencial uso de las tres bacterias trabajadas en remediación de Cd en suelos, se propone hacer experimentos a nivel de laboratorio sobre suelo con presencia del metal. De esta manera, se determinaría definitivamente si estas bacterias pueden ser usadas en campo para la actividad en cuestión, que sería el siguiente paso que seguir en este proyecto. Previo a su uso en campo, hay que verificar la patogenicidad de las bacterias, ya que se sabe que muchas especies de los géneros *Serratia* y *Acinetobacter* son patógenas para humanos, lo que complicaría su uso en biorremediación. También, es importante estudiar el efecto del tratamiento con estas bacterias sobre el contenido de Cd en la planta. Se recomienda hacer experimentos donde se observe si la concentración de Cd en las plantas de cacao disminuye, después de tratar el suelo adicionando las bacterias (bioaumentación) o promoviendo el crecimiento específico de éstas (bioestimulación). Adicionalmente, se podría hacer un estudio metataxonómico, para observar cómo cambia la comunidad bacteriana en esos suelos tratados, y tratar de comprender el papel de las bacterias en el proceso de inmovilización de Cd en el suelo.

Con respecto a la bioprecipitación, se sugiere optimizar la producción de precipitados de *Acinetobacter* sp. 6a, para poder identificar estos sólidos certeramente. Asimismo, se recomienda cuantificar el Cd de los precipitados por F-AAS. Este último análisis se haría para determinar la presencia de Cd, no sólo en la superficie, sino también en el *bulk* del sólido, confirmando una vez más que el Cd se está inmovilizando en la matriz de carbonato. Por último, se recomienda realizar experimentos que permitan discriminar la remoción de Cd por los diferentes mecanismos que tiene la bacteria. De esta forma, la remoción no sólo se le atribuiría a la bioprecipitación en forma de carbonatos, sino que se tendrían en cuenta los otros mecanismos que se sabe tienen las bacterias. Para ello, se recomienda hacer los mismos experimentos de remoción de Cd que se hicieron en el presente trabajo, pero cambiando ciertas condiciones; por ejemplo, se podría hacer una variante del experimento donde se cuantifique la remoción del metal en presencia de urea, encontrando el porcentaje de remoción debido a todos los mecanismos, y en ausencia de urea,

encontrando la remoción debida a solamente los mecanismos que no sean MICP, lo que indicaría, por diferencias entre ambos, la remoción en virtud únicamente del mecanismo MICP.

Por otro lado, sería interesante hacer un estudio de transcriptómica con las tres bacterias, para comprender cómo estas responden frente al estrés del Cd a nivel molecular. Se debería analizar el cambio en expresión de genes en presencia y ausencia del metal, para observar cuáles genes se involucran en la respuesta frente a la toxicidad y cuáles se ven afectados por lo mismo. Igualmente, sería interesante hacer un análisis similar al realizado por Huang *et al.* (2022), donde se estudiaría si genes responsables de la bioprecipitación de Cd aumentan su expresión en presencia del metal, como respuesta frente a su toxicidad.

Anexos

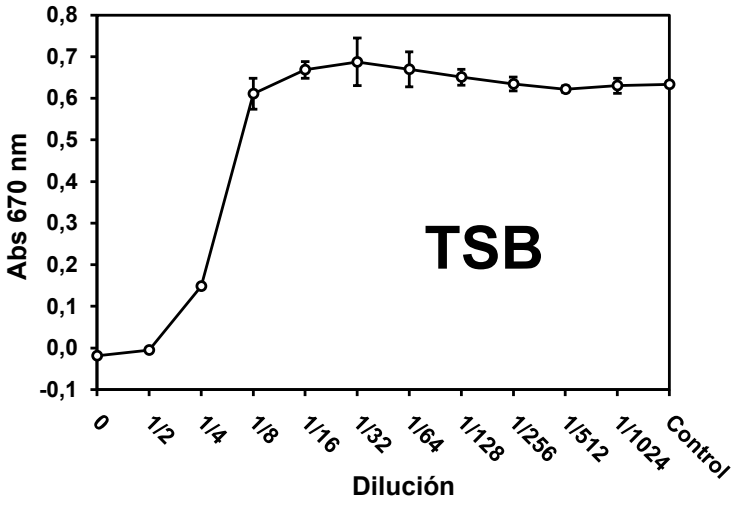
- **Anexo A-1:** Primers usados en el trabajo.

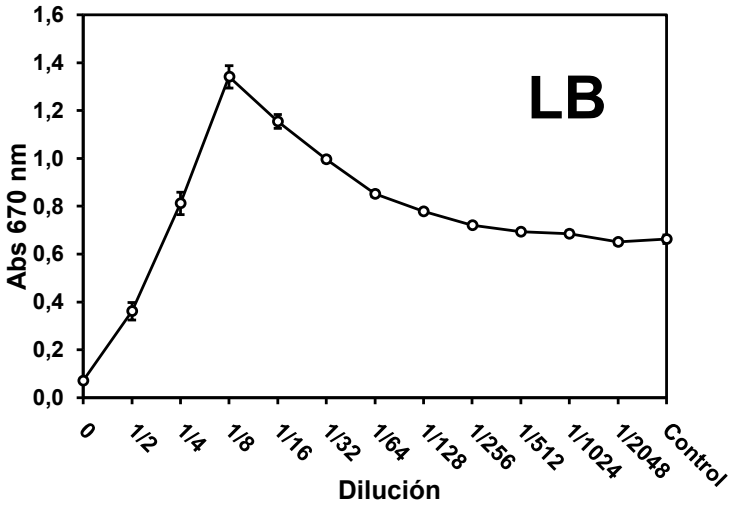
Proteína/ARN que codifica	Nombre del primer*	Secuencia (5'-3')	Temperatura de annealing (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
Unidad 16S del ARN ribosomal (*16S rRNA*)	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55	~1500	Montaño-Salazar *et al.*, 2018
	1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT			
Región V4-V5 de la unidad 16S del ARN ribosomal (*16S rRNA V4-V5*)	519F	CAGCMGCCGCGGTAATAC	55	~400	Montaño-Salazar *et al.*, 2018
	909R	CCGTCAATTCATTTGAGT			
Bomba de eflujo de Cd(II) (*cadA*)	cad1	CAAAYTGYGCRGGHAARTTYGA	55	1049	Zhang *et al.*, 2008
	cad2	AACTAATGCACAAGGACA			
Metalotioneína (*smtAB*)	smtAB-F	GATCGACGTTGCAGAGACAG	56	480	Khan *et al.*, 2016
	smtAB-R	GATCGAGGGCGTTTTGATAA			
Parte interna de una bomba de eflujo de Co/Zn/Cd (*czcA*)	czcA1	TCGACGGBGCCGTGGTSMTBGTCGAGAA	63	232	Roosa *et al.*, 2014
	czcA2	GTVAWSGCCAKCGGVBGGAACA			
Parte interna de una bomba de eflujo de Ni/Co/Cd (*nccA*)	nccA1	TTYAGCCAGGTVACSGTSATYTT	63	532	Roosa *et al.*, 2014
	nccA2	GCYGCRTCSGCRCGCACCAGRTA			
Bomba de eflujo de Co/Zn/Cd (*czc*)	cadSM-F	GCAACCGCATGAGATAGTCG	59,3	149	Este trabajo
	cadSM-R	AGAAGAAATGCAGCGCATCC			
ATPasa que transporta Pb, Cd, Zn y Hg (*zntA*)	zntA-F	AATCGAAAATGCCGTCACCG	59,6	169	Este trabajo
	zntA-R	CACGGCATCTTTGGCTGTC			
Subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*)	rpoB-F	CGGAAGGTCCAAACATCGGT	59	184	Este trabajo
	rpoB-R	TCATCCAGGTTGGAGTTCGC			

Subunidad β de la ADN girasa (*gyrB*)	gyrB-F	CGTGTCTATTCGCCTGAAGGA	59	190	Este trabajo
	gyrB-R	CTGGAAACCGTCGTTCCACT			

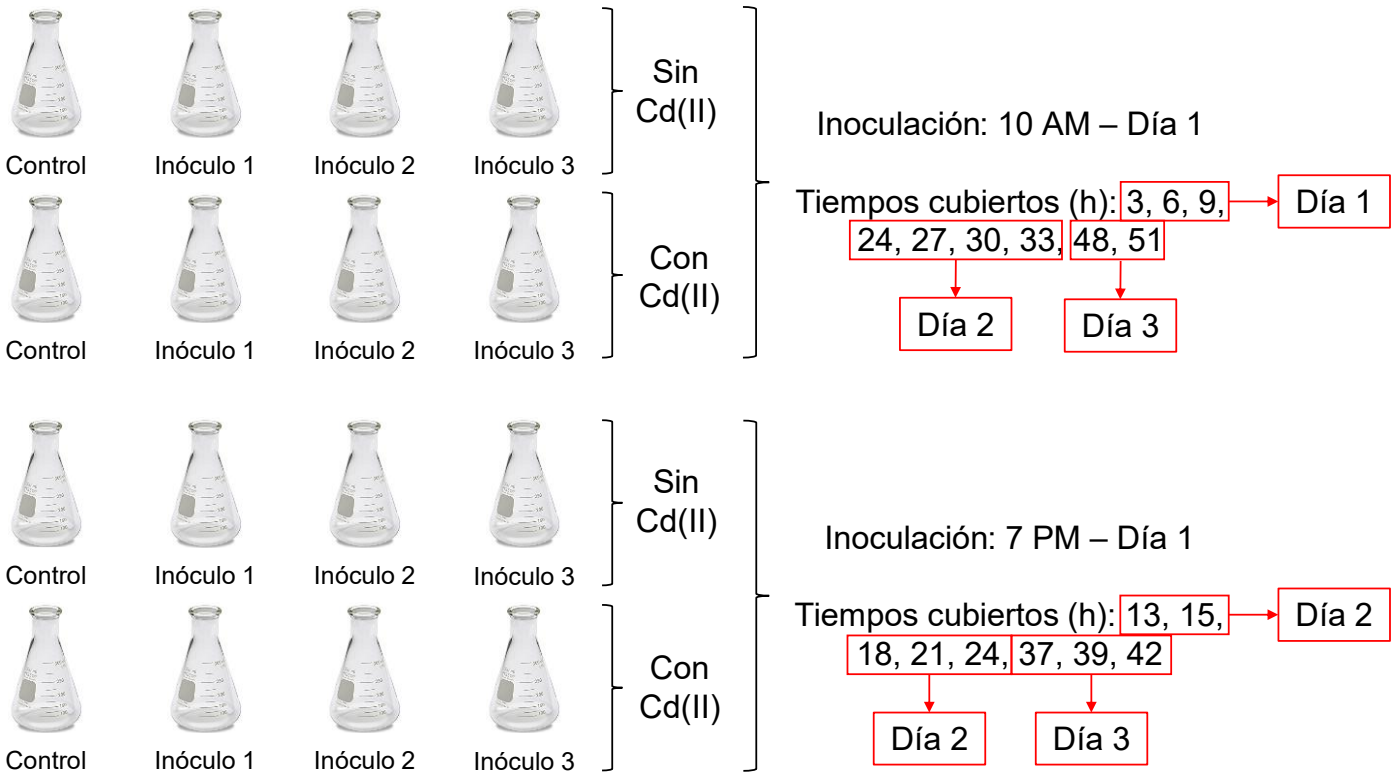
*Primers *forward* finalizan con F o 1. Primers *reverse* finalizan con R o 2.

- **Anexo A-2:** Interferencia/inhibición de los medios de cultivo sobre la cuantificación de amonio por el método de fenol-hipoclorito modificado. Se usó como control la reacción en agua desionizada y se seleccionó una dilución pequeña donde se encontraron valores cercanos al control. Para TSB se usó la dilución 1/30 y para LB se usó 1/60.





- **Anexo A-3:** Esquema del diseño experimental alternativo usado debido a las restricciones de acceso al laboratorio por el COVID-19.



- **Anexo A-4:** Código de R usado para hacer el análisis de regresión de modelo mixto con ajuste polinómico ortogonal.

```
setwd("#Aquí se pone la ruta de acceso al archivo de excel donde se tiene los datos#")
library(readxl)
library(dplyr)
library(ez)
library(statmod)
library(ggplot2)
library(lme4)
library(nlme)
library(survival)
library(KMsurv)
library(survMisc)
library(survminer)
library(car)

Data <- readxl::read_xlsx("#Nombre del archivo de excel + .xlsx#")
Data <- within(Data, {
  Muestra <- factor(Muestra)
  Intervencion <- factor(Intervencion)
})
```

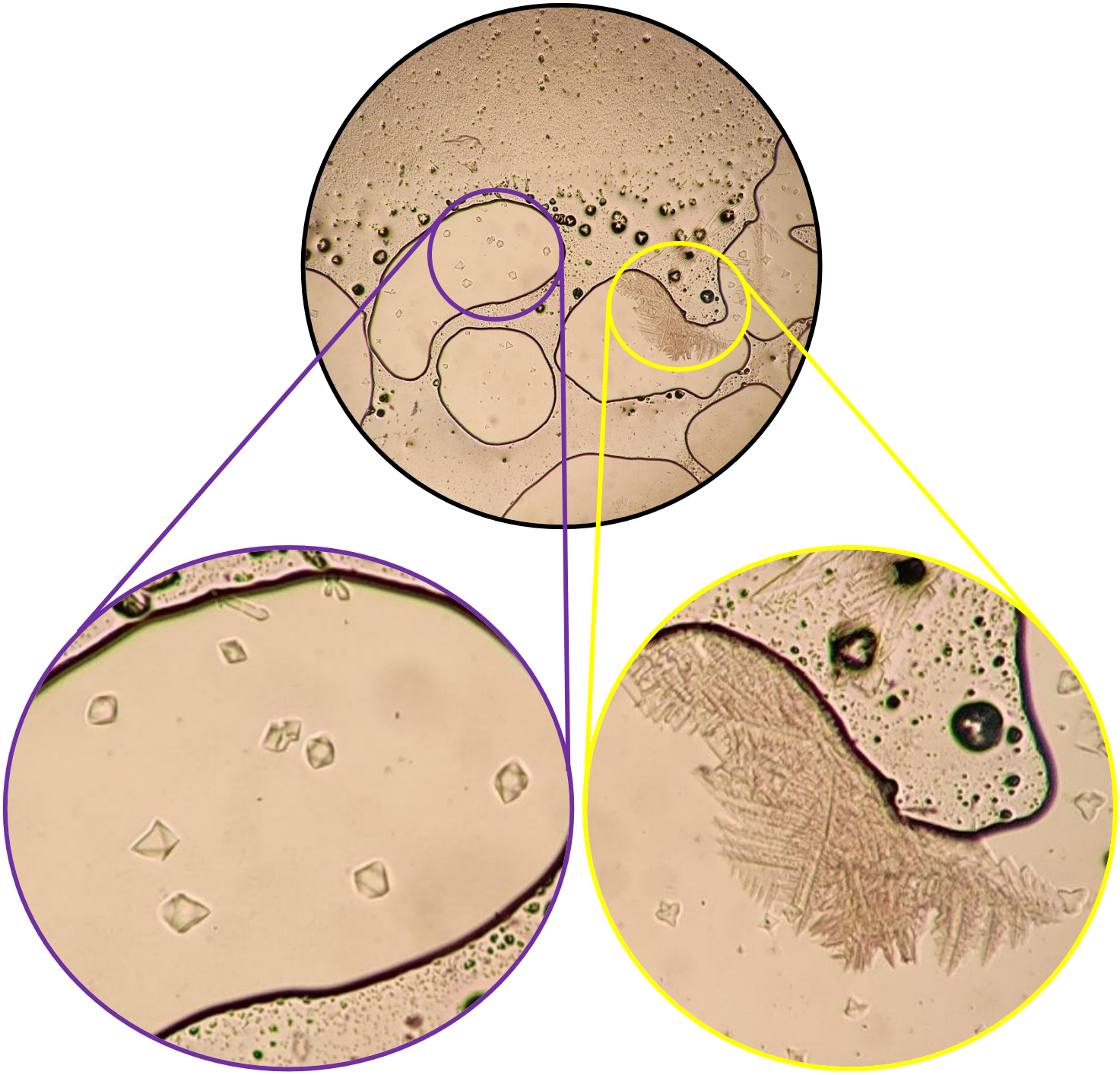
```
20.      str(Data)
21.
22.      pH  <- subset(Data, Variable=="Ph")
23.      OD <- subset(Data, Variable=="OD")
24.      NH4 <- subset(Data, Variable=="NH4")
25.      summary(Data)
26.
27.      #### Parametrico ####
28.
29.      ## pH ##
30.
31.      model <- lmer(Valor ~
   Intervencion*Tiempo + (1 + Intervencion + Tiempo| Muestra), data = pH)
32.      summary(model)
33.
34.      ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
35.        stat_summary(fun=mean, geom="point") +
36.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean,
   geom="line")
37.
38.      orthogonal_polynomials <- poly(sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))),
    4)
39.      head(orthogonal_polynomials)
40.
41.      cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)])
42.      round(cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)]),5)
43.
44.      time_codes <- data.frame(
45.        sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))),
46.        orthogonal_polynomials[, c(1:4)]
47.      )
48.      colnames(time_codes) <- c('Tiempo','ot1','ot2','ot3','ot4')
49.
50.      pH <- merge(pH, time_codes, by='Tiempo')
51.
52.      model <- lmer(Valor ~
   Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3 + ot4) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + o
   t3 +ot4 | Muestra), data = pH)
53.      summary(model)
54.
55.      ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
56.        stat_summary(fun=mean, geom="point") +
57.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean,
   geom="line")
58.
59.      model2 <- lmer(Valor ~
   Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + ot3 +ot
   4| Muestra), data = pH)
60.      summary(model2)
61.
62.      ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
63.        stat_summary(fun=mean, geom="point") +
64.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA),linetype='Orden
   4'), fun=mean, geom="line")+#, linetype='dashed') + # 3rd-order model
65.        stat_summary(aes(y=predict(model2,pH,re.form=NA),linetype='Orden
   3'), fun=mean, geom="line")+
```

```
66.         labs(linetype='Modelo',title='Ajuste del
   modelo',y='pH')+theme_minimal()
67.
68.       anova(model2, model)
69.       Anova(model, type=3)
70.
71.       residuales <- residuals(model)
72.       qqPlot(residuales,main="pH")
73.
74.       ## OD ##
75.
76.       pH <- OD
77.
78.       model <- lmer(Valor ~
   Intervencion*Tiempo + (1 + Intervencion + Tiempo| Muestra), data = pH)
79.       summary(model)
80.
81.       ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
82.         stat_summary(fun=mean, geom="point") +
83.         stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean,
   geom="line")
84.
85.       orthogonal_polynomials <- poly(sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))),
    4)
86.       head(orthogonal_polynomials)
87.
88.       cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)])
89.       round(cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)]),5)
90.
91.       time_codes <- data.frame(
92.         sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))),
93.         orthogonal_polynomials[, c(1:4)]
94.       )
95.       colnames(time_codes) <- c('Tiempo','ot1','ot2','ot3','ot4')
96.
97.       pH <- merge(pH, time_codes, by='Tiempo')
98.
99.       model <- lmer(Valor ~
   Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3 + ot4) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + o
   t3 +ot4 | Muestra), data = pH)
100.      summary(model)
101.
102.      ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
103.        stat_summary(fun=mean, geom="point") +
104.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean,
   geom="line")
105.
106.      model2 <- lmer(Valor ~
   Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + ot3 +ot
   4| Muestra), data = pH)
107.      summary(model2)
108.
109.      ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
110.        stat_summary(fun=mean, geom="point") +
111.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA),linetype='Orden
   4'), fun=mean, geom="line")+#, linetype='dashed') + # 3rd-order model
```

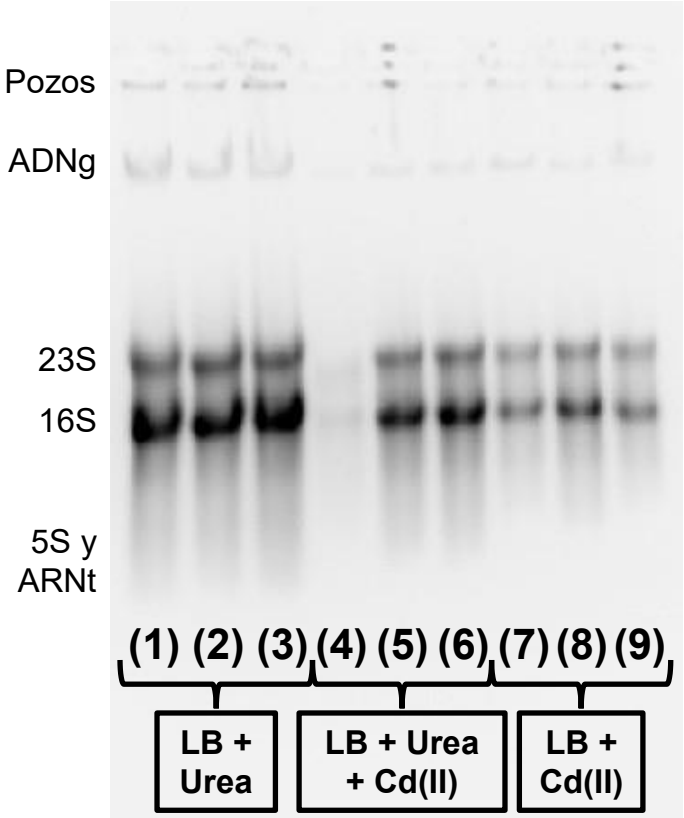
```
      stat_summary(aes(y=predict(model2,pH,re.form=NA),linetype='Orden 3'), fun=mean, geom="line")+
      labs(linetype='Modelo',title='Ajuste del modelo',y='OD')+theme_minimal()

    anova(model2, model)
    Anova(model2, type=3)

    residuales <- residuals(model2)
    qqPlot(residuales,main='OD')

    ## NH4 ##

    pH <- NH4

    model <- lmer(Valor ~ Intervencion*Tiempo + (1 + Intervencion + Tiempo| Muestra), data = pH)
    summary(model)

    ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
      stat_summary(fun=mean, geom="point") +
      stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean, geom="line")

    orthogonal_polynomials <- poly(sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))), 4)
    head(orthogonal_polynomials)

    cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)])
    round(cor(orthogonal_polynomials[, c(1:4)]),5)

    time_codes <- data.frame(
      sort(as.vector(unique(pH$Tiempo))),
      orthogonal_polynomials[, c(1:4)]
    )
    colnames(time_codes) <- c('Tiempo','ot1','ot2','ot3','ot4')

    pH <- merge(pH, time_codes, by='Tiempo')

    model <- lmer(Valor ~ Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3 + ot4) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + ot3 +ot4 | Muestra), data = pH)
    summary(model)

    ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
      stat_summary(fun=mean, geom="point") +
      stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA)), fun=mean, geom="line")

    model2 <- lmer(Valor ~ Intervencion*(ot1 + ot2 + ot3) + (1 + Intervencion + ot1 + ot2 + ot3 +ot4| Muestra), data = pH)
    summary(model2)

    ggplot(pH, aes(x=Tiempo, y=Valor, color=Intervencion)) +
      stat_summary(fun=mean, geom="point") +
```

```
158.        stat_summary(aes(y=predict(model,pH,re.form=NA),linetype='Orden
   4'), fun=mean, geom="line")+#, linetype='dashed') + # 3rd-order model
159.        stat_summary(aes(y=predict(model2,pH,re.form=NA),linetype='Orden
   3'), fun=mean, geom="line")+
160.        labs(linetype='Modelo',title='Ajuste del
   modelo',y='NH4')+theme_minimal()
161.
162.      anova(model2, model)
163.      Anova(model2, type=3)
164.
165.      ?isSingular
166.      residuales <- residuals(model)
167.      qqPlot(residuales,main='NH4')
```

- **Anexo A-5:** Precipitados mostrando diferentes morfologías. Estas imágenes se obtuvieron con microscopio óptico (Olympus CX31; 100X de aumento) desde una muestra de medio de cultivo de *Serratia* sp. 4.1a crecida en LB + urea (30 g L^{-1}) + $CaCl_2.2H_2O$ (20,4 mM) + Cd(II) (0,15 mM). Incubación a 30 °C, 90 rpm, durante 1 semana.

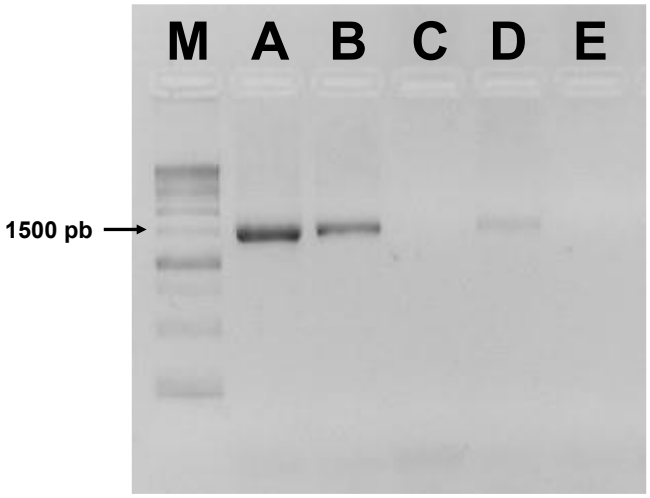


- **Anexo A-6:** Análisis de integridad, pureza y cuantificación del ARN extraído. La integridad se analizó por electroforesis del ARN obtenido de cada muestra (figura en la parte superior). Condiciones de corrida: Gel de agarosa 1,5%, buffer TBE, 100 V, 60 min de corrida. Las medidas de cuantificación y la pureza se realizaron por espectrofotometría (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific) (tabla en la parte inferior).

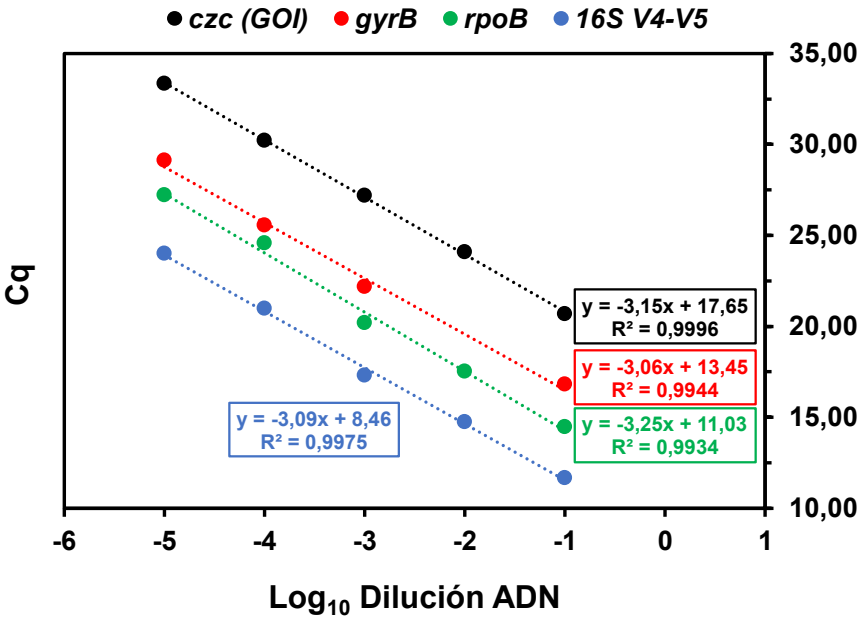


Condición	Muestra	Cuantificación (ng μL^{-1})	Relación 260/280	Relación 260/230
LB + Urea	(1)	766,8	2,14	2,44
	(2)	1755,5	2,15	2,38
	(3)	2547,0	2,16	2,37
LB + Urea + Cd(II)	(4)	227,2	2,04	2,43
	(5)	1322,6	2,09	2,08
	(6)	1658,6	2,16	2,46
LB + Cd(II)	(7)	451,9	2,13	2,52
	(8)	573,7	2,06	2,53
	(9)	460,4	2,13	2,51

- **Anexo A-7:** Prueba de la eficacia de la ADNasa I usada para remover el ADNg remanente en el ARN extraído. Electroforesis de los productos de PCR del gen *16S rRNA* usando ADNg como control positivo (A), una muestra de ARN extraída en ausencia de Cd(II) sin tratar con ADNasa (B), la misma muestra anterior tratada con ADNasa (C), una muestra de ARN extraída en presencia de Cd(II) sin tratar con ADNasa (D), y la misma muestra anterior tratada con ADNasa (E). Condiciones de corrida: Gel de agarosa 1,5%, buffer TBE, 100 V, 50 min de corrida. M, marcador molecular ExcelBand™ 1KB (0.25-10 kb) DNA Ladder (SMOBIO).



- **Anexo A-8:** Curvas de eficiencia de los primers usados en los experimentos de RT-qPCR. Se ajustaron los datos a una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta.



Referencias

Abadi, S., Azouri, D., Pupko, T. & Mayrose, I. (2019). Model selection may not be a mandatory step for phylogeny reconstruction. *Nature Communications*, 10(934). DOI: 10.1038/s41467-019-08822-w

Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H. A. & Abdul Khalil, H. P. S. (2017). A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15, 243-262. DOI: 10.1007/s13762-017-1400-5

Achal, V. & Pan, X. (2014). Influence of Calcium Sources on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(1), 307–317. DOI:10.1007/s12010-014-0842-1

Adriano, D. (2001). *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals* (2da ed). New York: Springer-Verlag.

Alhindi, T. & Albdaiwi, R. (2022). Draft Genome Sequence of *Oceanobacillus jordanicus* Strain GSFE11, a Halotolerant Plant Growth-Promoting Bacterial Endophyte Isolated From the Jordan Valley. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 18, 11769343211071114. DOI: 10.1177/11769343211071114

Alonso, M. J. C., Ortiz, C. E. L., Perez, S. O. G., Narayanasamy, R., Fajardo San Miguel, G. del J., Hernández, H. H. & Balagurusamy, N. (2017). Improved strength and durability of concrete through metabolic activity of ureolytic bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21451–21458. DOI:10.1007/s11356-017-9347-0

Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J. & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, 5(250). DOI: 10.1186/s40064-016-1869-2

Ashraf, R. & Ali, T. A. (2007). Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination. *Pakistan Journal of Botany*, 39(2), 629-636.

Benoit, S. L. & Maier, R. J. (2011). Mua (HP0868) Is a Nickel-Binding Protein That Modulates Urease Activity in *Helicobacter pylori*. mBio, 2(2), e00039-11. DOI:10.1128/mbio.00039-11

Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F. & Férard, C. (2011). Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Comptes Rendus Geoscience*, 343(2-3), 160–167. DOI:10.1016/j.crte.2010.09.002

Bhattacharya, A., Naik, S. N. & Khare, S. K. (2018). Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II). *Journal of Environmental Management*, 215, 145-152. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.03.055

Brandão, P. F. B., Torimura, M., Kurane, R. & Bull, A. T. (2002). Dereplication for biotechnology screening: PyMS analysis and PCR-RFLP-SSCP (PRS) profiling of *16S rRNA* genes of marine and terrestrial actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(1), 77-83. DOI: 10.1007/s00253-001-0855-x

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance, and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320–330. DOI:10.1038/nrmicro.2016.34

Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A. & Gutiérrez-Rodríguez, E. A. (2021). The First National Survey of Cadmium in Cacao Farm Soil in Colombia. *Agronomy*, 11(761). DOI: 10.3390/agronomy11040761

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, N., Shipley, G., Vandesompele, J. & Wittwer, C. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797

Cartwright, J. H. E., Checa, A. G., Gale, J. D., Gebauer, D. & Sainz-Díaz, C. I. (2012). Calcium Carbonate Polyamorphism and Its Role in Biomineralization: How Many Amorphous Calcium Carbonates Are There? *Angewandte Chemie International Edition*, 51(48), 11960–11970. DOI:10.1002/anie.201203125

Chellaiah, E. R. (2018). Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Applied Water Science*, 8(6). DOI:10.1007/s13201-018-0796-5

Chen, J., Huang, P. T., Zhang, K. Y. & Ding, F. R. (2012). Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, 112(4), 660–671. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05242.x

Chen, Y. P., Liu, Q., Liu, Y. J., Jia, F. A. & He, X. H. (2014). Responses of soil microbial activity to cadmium pollution and elevated CO_2. *Scientific Reports*, 4(4287). DOI: 10.1038/srep04287

Cheng, H., Zhang, X. & Song, H. (2014). Morphological Investigation of Calcium Carbonate during Ammonification-Carbonization Process of Low Concentration Calcium Solution. *Journal of Nanomaterials*, 503696. DOI: 10.1155/2014/503696

Chi, Y., Huang, Y., Wang, J., Chen, X., Chu, S., Hayat, K., Xu, Z., Xu, H., Zhou, P. & Zhang, D. (2020). Two plant growth promoting bacterial *Bacillus* strains possess different mechanisms in adsorption and resistance to cadmium. *Science of the Total Environment*, 741, 140422. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140422

Choudhary, S., Islam, E., Kazy, S. & Sar, P. (2012). Uranium and other heavy metal resistance and accumulation in bacteria isolated from uranium mine wastes. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(4), 622-637. DOI: 10.1080/10934529.2012.650584

Chuo, S. C., Mohamed, S. F., Mohd, S. H., Ahmad, A., Jawaid, M., Wani, W. A., Yaqoob, A. A. & Ibrahim, M. N. (2020). Insights into the Current Trends in the Utilization of Bacteria for Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation. *Materials*, 13(4993), 2020. DOI: 10.3390/ma13214993

Coombs, J. M. & Barkay, T. (2004). Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface. *Applied Environmental Microbiology*, 70(3), 1698-1707. DOI: 10.1128/AEM.70.3.1698-1707.2004

Coto, B., Martos, C., Peña, J. L., Rodríguez, R., & Pastor, G. (2012). Effects in the solubility of $CaCO_3$: Experimental study and model description. *Fluid Phase Equilibria*, 324, 1–7. DOI: 10.1016/j.fluid.2012.03.020

Das, S. & Dash, H. R. (2017). *Handbook of metal-microbe interactions and bioremediation*. Boca Raton: Taylor & Francis.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE]. (2020). *Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA).* Recuperada el 7 de junio de 2022 de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2019/boletin_ena_2019-I.pdf

Diez-Marulanda, J. C. (2020). *Aislamiento y discriminación molecular de microorganismos que inducen la precipitación de carbonato de cadmio de una región cacaotera de Colombia* (Tesis de pregrado). Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Dong, Y. & Zhu, H. (2005). Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods in Molecular Medicine*, 108, 149-157. DOI: 10.1385/1-59259-850-1:149

Dosanjh, N. S. & Michel, S. L. (2006). Microbial nickel metalloregulation: NikRs for nickel ions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 123–130. DOI:10.1016/j.cbpa.2006.02.011

European Commission. (2019). *CADMIUM IN CHOCOLATE*. Recuperado el 7 de junio de 2020 de https://ec.europa.eu/food/system/files/2019-03/cs_contaminants_catalogue_cadmium_chocolate_en.pdf

Federación Nacional de Cacaoteros [FEDECACAO]. (2021). *Economía Nacional*. Recuperado el 7 de junio de 2022 de https://www.fedecacao.com.co/economianacional

Frankel, R. B. & Bazylinski, D. A. (2003). Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95–114. DOI:10.2113/0540095

Garvie, L., Németh, P. & Trif, L. (2022). An exceptionally stable and widespread hydrated amorphous calcium carbonate precipitated by the dog vomit slime mold *Fuligo septica* (Myxogastria). *Scientific Reports*, 12(3642). DOI: 10.1038/s41598-022-07648-9

González, S. & Ghneim-Herrera, T. (2021). Heavy Metals in Soils and the Remediation Potential of Bacteria Associated With the Plant Microbiome. *Frontiers in Environmental Science*, 9(604216). DOI: 10.3389/fenvs.2021.604216

Guo, H., Hong, C., Xiao, M., Chen, X., Chen, H., Zheng, B., & Jiang, D. (2016). Real-time kinetics of cadmium transport and transcriptomic analysis in low cadmium accumulator *Miscanthus sacchariflorus*. *Planta,* 244(6), 1289–1302. DOI: 10.1007/s00425-016-2578-3

Haddix, P. & Shanks, R. M. (2018). Prodigiosin pigment of *Serratia marcescens* is associated with increased biomass production. *Archives of Microbiology*, 200(7), 989-999. DOI: 10.1007/s00203-018-1508-0

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. DOI: 10.3390/toxins8080236

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Haroun, A. A., Kamaluddeen, K. K., Alhaji, I., Magaji, Y. & Oaikhena, E. E. (2017). Evaluation of Heavy Metal Tolerance Level (MIC) and Bioremediation Potentials of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Makera-Kakuri Industrial Drain in Kaduna. Nigeria. *European Journal of Experimental* Biology, 7(5). DOI: 10.21767/2248-9215.100028

Huang, S., Liu, R., Sun, M., Li, X., Guan, Y. & Lian, B. (2022). Transcriptome expression analysis of the gene regulation mechanism of bacterial mineralization tolerance to high concentrations of Cd^{2+}. *Science of the Total Environment*, 806(4), 150911. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150911

Jain, S. & Bhatt, A. (2014). Molecular and in situ characterization of cadmium-resistant diversified extremophilic strains of *Pseudomonas* for their bioremediation potential. *3 Biotech*, 4(3), 297-304. DOI: 10.1007/s13205-013-0155-z

Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). *16S rRNA* Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761-2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07

Jebril, N., Boden, R. & Braungardt, C. (2022). Cadmium resistant bacteria mediated cadmium removal: a systematic review on resistance, mechanism and bioremediation approaches. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 1002, 012006. DOI: 10.1088/1755-1315/1002/1/012006

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E. & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of *16S rRNA* gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(5029). DOI: 10.1038/s41467-019-13036-1

Kamika, I. & Momba, M. (2013). Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *BMC Microbiology*, 13(28). DOI: 10.1186/1471-2180-13-28

Karelová, E., Harichová, J., Stojnev, T., Pangallo, D. & Ferianc, P. (2011). The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal-contaminated site. *Biologia*, 1, 18-26. DOI: 10.2478/s11756-010-0145-0

Khadim, H. J., Ammar, S. H. & Ebrahim, S. E. (2019). Biomineralization based remediation of cadmium and nickel contaminated wastewater by ureolytic bacteria isolated from barn horses soil. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100315. DOI: 10.1016/j.eti.2019.100315

Khalid, S., Shahid, M., Khan, N., Murtaza, B., Bibi, I. & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182(part B), 247-268. DOI: 10.1016/j.gexplo.2016.11.021

Khan, A. R., Park, G. S., Asaf, S., Hong, S. J., Jung, B. & Shin, J. H. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLoS One*, 12(2), e0171534. DOI: 10.1371/journal.pone.0171534

Khan, Z., Hussain, S., Rehman, A., Zulfiqar, S. & Shakoori, A. R. (2015). Evaluation of Cadmium Resistant Bacterium, *Klebsiella pneumoniae*, Isolated from Industrial Wastewater for its Potential Use to Bioremediate Environmental Cadmium. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(6), 1533-1543.

Khan, Z., Rehman, A., Hussain, S., Nisar, M. A., Zulfiqar, S. & Shakoori, A. R. (2016). Cadmium resistance and uptake by bacterium, *Salmonella enterica* 43C, isolated from industrial effluent. *AMB Express*, 6(54). DOI: 10.1186/s13568-016-0225-9

Kinuthia, G. K., Ngure, V., Beti, D., Lugalia, R., Wangila, A. & Kamau, L. (2020). Levels of heavy metals in wastewater and soil samples from open drainage channels in Nairobi, Kenya: community health implication. *Scientific Reports*, 10(8434). DOI: 10.1038/s41598-020-65359-5

Konstantinou, C., Wang, Y., Biscontin, G. & Soga, K. (2021). The role of bacterial urease activity on the uniformity of carbonate precipitation profiles of bio-treated coarse sand specimens. *Scientific Reports*, 11(6161). DOI: 10.1038/s41598-021-85712-6

Kumar, P., Gupta, S. B., Anurag. & Soni, R. (2019). Bioremediation of Cadmium by Mixed Indigenous Isolates *Serratia liquefaciens* BSWC3 and *Klebsiella Pneumoniae* RpSWC3 Isolated from Industrial and Mining Affected Water Samples. *Pollution*, 5(2), 351-360. DOI: 10.22059/poll.2018.268603.533

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096

Kumari, D., Pan, X., Lee, D. & Achal, V. (2014). Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium undae* at low temperature. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 98-102. DOI: 10.1016/j.ibiod.2014.07.007

Li, W., Liu, L., Chen, W., Yu, L., Li, W. & Yu, H. (2010). Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. *Process Biochemistry*, 45(6), 1017-1021. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.03.004

Lin, X., Mou, R., Cao, Z., Xu, P., Wu, X., Zhu, Z. & Chen, M. (2016). Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. *Science of the Total Environment*, 569-570, 97-104. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.121

Liu, Y., Xiao, T., Perkins, R. B., Zhu, J., Zhu, Z., Xiong, Y. & Ning, Z. (2017a). Geogenic cadmium pollution and potential health risks, with emphasis on black shale. *Journal of Geochemical Exploration*, 176, 42-49. DOI: 10.1016/j.gexplo.2016.04.004

Liu, X., Zhang, Q., Zhou, N. & Tian, Y. (2017b). Expression of an Acid Urease with Urethanase Activity in *E. coli* and Analysis of Urease Gene. *Molecular Biotechnology*, 59(2-3), 84–97. DOI:10.1007/s12033-017-9994-x

Lu, M., Jiao, S., Gao, E., Song, X., Li, Z., Hao, X., Rensing, C. & Wei, G. (2017). Transcriptome response to heavy metals in *Sinorhizobium melitoli* CCNWSX0020 reveals new metal resistance determinants that also promote bioremediation by *Medicago lupulina* in metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(20), e01244-17. DOI: 10.1128/AEM.01244-17.

Maynaud, G., Brunel, B., Mornico, D., Durot, M., Severac, D., Dubois, E., Navarro, E., Cleyet-Marel, J. C. & Le Quéré, A. (2013). Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to Zinc and Cadmium exposure", *BMC Genomics*, 14(292). DOI: 10.1186/1471-2164-14-292

Méndez, V., Fuentes, S., Morgante, V., Hernández, M., González, M., Moore, E. & Seeger, M. (2017). Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4). DOI: 10.4067/S0718-95162017000400017

Meter, A., Atkinson, R. J. & Laliberte, B. (2019). *Cadmium in cacao from Latin America and the Caribbean: A review of research and potential mitigation solutions*. Rome (Italy): Bioversity International.

Mondal, S. & Ghosh, A. (2019). Review on microbial induced calcite precipitation mechanisms leading to bacterial selection for microbial concrete. *Construction and Building Materials,* 225, 67–75. DOI:10.1016/j.conbuildmat.2019.07.122

Montaño-Salazar, S. M., Lizarazo-Marriaga, J. & Brandão, P. F. B. (2018). Isolation and Potential Biocementation of Calcite Precipitation Inducing Bacteria from Colombian Buildings. *Current Microbiology*, 75, 256-265. DOI: 10.1007/s00284-017-1373-0

Montoya, C., Márquez, M. A., López, J. M. & Cuervo, C. (2005). Caracterización de cristales de calcita bioprecipitada por un aislamiento nativo de *Bacillus subtilis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 19-25.

Nascimento, F. F., dos Reis, M. & Yang, Z. (2017). A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nature Ecology & Evolution*, 1(10), 1446-1454. DOI: 10.1038/s41559-017-0280-x

Naz, N., Young, H., Ahmed, N. & Gadd, G. (2005). Cadmium Accumulation and DNA Homology with Metal Resistance Genes in Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4610-4618. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4610–4618.2005

Nguyen, C., Hugie, C., Kile, M. & Navab-Daneshmand, T. (2019). Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: A review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 13(46). DOI: 10.1007/s11783-019-1129-0

Nies, D. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 313-339. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00048-2

Nongkhlaw, M. & Joshi, S. R. (2019). Molecular insight into the expression of metal transporter genes in *Chryseobacterium* sp. PMSZPI isolated from uranium deposit. *PLoS ONE*, 14(5), e0216995. DOI: 10.1371/journal.pone.0216995

Oger, C., Mahillon, J. & Petit, F. (2003). Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in Staphylococcal bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2), 173-183. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01056.x

Omoregie, A., Palombo, E. A. & Nissom, P. M. (2020). Bioprecipitation of calcium carbonate mediated by ureolysis: A review. *Environmental Engineering Research*, 26(6). DOI: 10.4491/eer.2020.379

Peker, N., Garcia-Croes, S., Dijkhuizen, B., Wiersma, H. H., van Zanten, E., Wisselink, G., Friedrich, A. W., Kooistra-Smid, M., Sinha, B., Rossen, J. W. A. & Couto, N. (2019). A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S–23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. *Frontiers in* Microbiology, 10(620). DOI: 10.1128/JCM.01228-07

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Rahman, M., Hora, R. N., Ahenkorah, I., Beecham, S., Karim, R. & Iqbal, A. (2020). State-of-the-Art Review of Microbial-Induced Calcite Precipitation and Its Sustainability in Engineering Applications. *Sustainability*, 12(15). DOI: 10.3390/su12156281

Rajasekar, A., Wilkinson, S. & Moy, C. (2021). MICP as a potential sustainable technique to treat or entrap contaminants in the natural environment: A review. *Environmental Science and Ecotechnology*, 6(100096). DOI: 10.1016/j.ese.2021.100096

RStudio Team (2022). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. http://www.rstudio.com/.

Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G. & Gillan, D. (2014). Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental Pollution*, 189, 143-151. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.02.031

Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F. L., Castberg, T. & Hahn, D. (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 237-251. DOI:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00652.x

Sanders, E. & Miller, K. (2010). *I, Microbiologist: A discovery-based course in microbial ecology and molecular evolution*. Washington D. C.: ASM Press.

Schmittgen, T. & Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. DOI: 10.1038/nprot.2008.73

Sharma, S., Tiwari, S., Hasan, A., Saxena, V. & Pandey, L. M. (2018). Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *3 Biotech*, 8(16), 1-18. DOI: 10.1007/s13205-018-1237-8

Simmons, M. P., Pickett, K. M. & Miya, M. (2004). How Meaningful Are Bayesian Support Values?. Molecular Biology and Evolution, 21(1), 188-199. DOI: 10.1093/molbev/msh014

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of analytical chemistry* (9na ed). Belmont: Brooks/Cole.

Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Radziute, S., Stunzenas, V. & Buda, V. (2012). *Erwinia typographi* sp. nov., isolated from bark beetle (*Ips typographus*) gut". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 942-948. DOI: 10.1099/ijs.0.030304-0

Sreedevi, P. R., Suresh, K. & Jiang, G. (2022). Bacterial bioremediation of heavy metals in wastewater: A review of processes and applications. *Journal of Water Process Engineering*, 48, 102884. DOI: 10.1016/j.jwpe.2022.102884

Stewart, F. J., Young, C. R. & Cavanaugh, C. M. (2008). Lateral Symbiont Acquisition in a Maternally Transmitted Chemosynthetic Clam Endosymbiosis. Molecular Biology and Evolution, 25(4), 673-687. DOI: 10.1093/molbev/msn010

Su, J., Gao, Y., Huang, T., Bai, X., Lu, J. & He, L. (2019). Simultaneous removal of Cd^{2+}, NO_3-N and hardness by the bacterium *Acinetobacter* sp. CN86 in aerobic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(69), 1333-1342. DOI: 10.1007/s00449-019-02132-7

Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), vey016. DOI: 10.1093/ve/vey016

Tamayo-Figueroa, D. P., Castillo, E. & Brandão, P. F. B. (2019). Metal and metalloid immobilization by microbiologically induced carbonates precipitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(58). DOI: 10.1007/s11274-019-2626-9

Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequence. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17, 57-86.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673

Vidhyaparkavi, A., Osborne, J. & Babu, S. (2017). Analysis of *zntA* gene in environmental *Escherichia coli* and additional implications on its role in zinc translocation. *3 Biotech*, 7(9). DOI: 10.1007/s13205-017-0613-0

Wang, Y. Y., Yao, Q. Z., Zhou, G. T. & Fu, S. Q. (2015). Transformation of amorphous calcium carbonate into monohydrocalcite in aqueous solution: a biomimetic mineralization study. *European Journal of Mineralogy*, 27, 717-729. DOI: 10.1127/ejm/2015/0027-2486

Winz, M. L., Cahová, H., Nübel, G., Frindert, J., Höfer, K. & Jäschke, A. (2017). Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq. *Nature Protocols*, 12, 122-149. DOI: 10.1038/nprot.2016.163

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75-84. DOI: 10.1007/s11103-012-9885-2

Yang, Z. (1996). Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(9), 367-372. DOI: 10.1016/0169-5347(96)10041-0

Yao, Z., Li, J., Xie, H., & Yu, C. (2012). Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 722–729. DOI: 10.1016/j.proenv.2012.10.099

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(134). DOI: 10.1186/1471-2105-13-134

Yu, H., Zhang, G., Cai, Y. & Dong, F. (2021). Altering the substituents of salicylic acid to improve Berthelot reaction for ultrasensitive colorimetric detection of ammonium and atmospheric ammonia. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 413, 5695-5702. DOI: 10.1007/s00216-021-03485-3

Yun, J., Heisler, L., Hwang, I., Wilkins, O., Lau, S., Hyrcza, M., Jayabalasingham, B., Jin, J., McLaurin, J., Tsao, M. & Der, S. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 34(12), e85. DOI: 10.1093/nar/gkl400

Zaghloul, A. & Saber, M. (2019). Modern Technologies in Remediation of Heavy Metals in Soils. *International Journal of Environmental Pollution & Environmental Modelling*, 2(1), 10-19.

Zagorac, D., Müller, H., Ruehl, S., Zagorac, J. & Rehme, S. (2019). Recent developments in the Inorganic Crystal Structure Database: theoretical crystal structure data and related features. *Journal of Applied Crystallography*, 52, 918-925. DOI: 10.1107/S160057671900997X

Zhang, Y., Zhang, H., Li, X., Su, Z. & Zhang, C. (2008). The *cadA* Gene in Cadmium-Resistant Bacteria from Cadmium-Polluted Soil in the Zhangshi Area of Northeast China. *Current Microbiology*, 56(3), 236-239. DOI: 10.1007/s00284-007-9064-x

Zhao, Y., Yao, J., Yuan, Z., Wang, T., Zhang, Y. & Wang, F. (2016). Bioremediation of Cd by strain GZ-22 isolated from mine soil based on biosorption and microbially induced carbonate precipitation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 372-380. DOI: 10.1007/s11356-016-7810-y

Zhao, X., Wang, M., Wang, H., Tang, D., Huang, J. & Sun, Yu. (2019). Study on the Remediation of Cd Pollution by the Biomineralization of Urease-Producing Bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(268). DOI: 10.3390/ijerph16020268

Zheng, X., Chen, L., Chen, M., Chen, J., & Li, X. (2019). Functional Metagenomics to Mine Soil Microbiome for Novel Cadmium Resistance Genetic Determinants. *Pedosphere*, 29(3), 298–310. DOI:10.1016/s1002-0160(19)60804-0

Zheng, Y., Xiao, C. & Chi, R. (2021). Remediation of soil cadmium pollution by biomineralization using microbial-induced precipitation: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(208), 1-15. DOI: 10.1007/s11274-021-03176-2