

Plataforma Multiagencia de Cacao (ATN/RF-17235-RG)

PRODUCTO 5. Mapas y estrategias de mitigación de cadmio en plantaciones comerciales y sistemas agroforestales de cacao

Kevin Carrillo, Francisco Arguedas, Ruth Quiroga Mateus, Santiago López, Daniel Bravo, Byron Moyano y Eduardo Chávez

2023



Plataforma Multiagencia
Cacao 2030-2050





Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Kevin Carrillo, Francisco Arguedas, Ruth Quiroga Mateus, Santiago López, Daniel Bravo, Byron Moyano y Eduardo Chávez.

Copyright © 2022 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Abstract.....	8
Resumen Ejecutivo.....	10
1. Introducción.....	12
1.1 Cadmio y sus efectos en la población	12
1.2 Presencia de cadmio en las cadenas de cacao de la región.....	13
1.3 Factores que afectan la absorción de Cd en cacao.....	13
1.4 Estrategias de mitigación de Cd en el cultivo de cacao	14
2. Metodología.....	15
2.1 Mapeo de fincas cacaoteras.....	15
2.1.1 Área de estudio y toma de muestras	15
2.1.2 Análisis geoestadístico y construcción de los mapas.....	15
2.2 Estrategias de mitigación en fincas de productores	16
2.2.1 Ubicación y características de las fincas	16
2.2.2 Tratamientos y diseño experimental	17
2.2.3 Aplicación de tratamientos	19
2.2.4 Muestreo y monitoreo de los tratamientos en finca.....	20
2.2.5 Preparación y análisis de muestras.....	21
2.2.6 Análisis estadístico	21
3. Resultados y Discusión.....	22
3.1 Cadmio y otras propiedades de suelo.....	22
3.1.1 Concentración de Cd en hojas y almendras de cacao.....	23
3.1.2 Distribución geoespacial de cadmio en los países de la región	25
3.2 Efecto de enmiendas de suelo y microorganismos en la reducción de Cd en suelo y/o plantas de cacao.....	28
3.2.1 Colombia	28
3.2.2 Costa Rica	32



3.2.3 Ecuador.....	36
4. Conclusiones.....	42
Referencias Bibliográficas.....	44
Anexo	52

INDICE TABLAS

Tabla 1. Ubicación y características generales de las fincas seleccionadas para la investigación	16
Tabla 2. Propiedades del suelo (0-20 cm) de las fincas seleccionadas para la investigación	17
Tabla 3. Detalle de enmiendas y dosis utilizadas en las fincas demostrativas por países	18
Tabla 4. Promedios (\pm desviaciones estándar) de las propiedades de suelo evaluadas en los tres países.....	22
Tabla 5. Concentraciones promedio (\pm desviaciones estándar) de cadmio en hojas y almendras de cacao en Costa Rica y Ecuador	24
Tabla 6. Matriz de correlación de elementos en hojas y Cd en almendras en plantas de cacao.....	24
Tabla 7. Propiedades químicas del suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos.....	30
Tabla 8. Media de pH de suelo y las concentraciones de elementos del suelo bajo distintas enmiendas y tiempos de aplicación	33
Tabla 9. Media de las concentraciones de Cd y factores de reducción de Cd en almendra y hoja bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación	34
Tabla 10. Cambios en las concentraciones de Manganeso (Mn), Hierro (Fe) y Zinc (Zn) en tres fincas demostrativas afectadas por la aplicación de micronutrientes (T3). Valores son los promedios de tres réplicas y DS es la desviación estándar de la media	38
Tabla 11. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca A. Modificado de Martínez Botello, 2015; Quintana Fuentes et al., 2018.....	53
Tabla 12. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca B. Modificado de Martínez Botello, 2015; Quintana Fuentes et al., 2018.....	53
Tabla 13. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca C. Modificado de Quintana Fuentes et al., 2018.....	54
Tabla 14. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca D. Modificado de Quintana Fuentes et al., 2018.....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del diseño experimental y los tratamientos utilizados en campo. El número de árboles y tratamientos varió entre los países de acuerdo al tamaño de la finca	19
Figura 2. Ilustración de la aplicación de las enmiendas en la zona de fertilización de los árboles.....	20
Figura 3. Distribución de cadmio en suelos cacaoteros de Colombia (tomado de Bravo et al., 2020)	26
Figura 4. Distribución de cadmio en almendra en plantaciones de cacao ubicadas en tres regiones de Costa Rica: Huetar Norte (a), Huetar Caribe (b) y Brunca (c).....	26
Figura 5. Distribución espacial de cadmio (mg kg^{-1}) en almendra en Ecuador (tomado de Argüello et al., 2019)	27
Figura 6. Variación (Δ) de los contenidos de Cd (mg kg^{-1}) en suelo para las 4 fincas evaluadas en el departamento de Antioquia un año después de la aplicación de los tratamientos (Quiroga-Mateus et al., 2022)	31
Figura 7. Concentración de Cd en suelo en función del tiempo con el uso de diferentes enmiendas de suelo. TA = testigo absoluto. Medias con una letra distinta representan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) según la prueba de DGC	32
Figura 8. Distribución de las concentraciones de Cd en hoja bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación. TA = testigo absoluto	35
Figura 9. Distribución de las concentraciones de Cd^{+2} en almendras bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación. TA = Testigo absoluto	35
Figura 10. Cambios en el contenido de materia orgánica (MO) de suelo en tres fincas demostrativas ubicadas en (a) Balao, (b) El Guabo y (c) Puerto Inca afectados por la aplicación de compost (T1) y biochar (T4). Las barras representan el promedio de tres réplicas.....	36
Figura 11. Cambios en la concentración de cadmio (Cd) en hojas colectadas en tres fincas demostrativas ubicadas en (a) Balao, (b) El Guabo y (c) Puerto Inca. Las barras representan el promedio de tres réplicas	39



Figura 12. Dinámica de concentraciones de cadmio (Cd) en almendras de cacao durante 24 meses de estudio en tres fincas demostrativas, los puntos representan a la media de tres réplicas y las barras al error estándar de la media..... 40



Abstract

The high cadmium (Cd) content present in cocoa beans in Latin American countries poses a threat to the commercialization of cocoa and its derivatives in regulated markets, such as the European Union (EU). The bioavailability of this metal is influenced by soil factors, and many of the high concentrations in farms are considered to be due to natural soil formation processes. The objectives outlined in this study were to identify the geospatial distribution of high concentrations of Cd in Costa Rica, Colombia, and Ecuador, determine the soil and agronomic factors influencing the absorption of Cd in cocoa tissues, and study on-farm mitigation measures to reduce the risk of elevated Cd concentrations in cocoa beans. To achieve this, surveys were conducted and/or concentrations of Cd in soil, leaves, and/or beans were mapped in the countries of the platform on 150, 100 and 600 producers' farms in Costa Rica, Colombia y Ecuador, respectively. Additionally, physicochemical and elemental analyses were performed on soil, leaves, and cocoa beans samples, and these variables were modeled to predict the Cd level in the beans. This allowed the identification of cultivation areas with high and low cadmium levels and their relationship with soil or agronomic management factors. The total concentration of Cd in soil in Costa Rica ranged from <0.1 to 1.05 (average 0.22 mg kg^{-1}), typical of uncontaminated soils. Cd concentration in beans ranged from 0.12 to 3.23 (average 0.56 mg kg^{-1}), with 22% of the samples exceeding the selected threshold of 0.80 mg kg^{-1} , mainly in the Huetar Caribe and Huetar Norte regions. In Ecuador, the average Cd concentration in beans was 0.90 mg kg^{-1} , with 40% of the samples surpassing a critical level of 0.60 mg kg^{-1} . In Colombia, the average Cd in soils was determined to be 1.65 mg kg^{-1} , suggesting that, with a high translocation factor and a positive correlation between soil and cocoa beans values, several bean samples associated with this average Cd in soils could exceed the critical level set by European regulation for chocolates. Some soil factors contribute to Cd concentration in beans. In Ecuador, 65% of the accumulated variability in beans can be explained by soil properties, indicating the need to control these properties to affect Cd concentration. The soil pH is reported as one of the most important factors; it was significant in statistical models in Ecuador but not in Costa Rica, likely due to more constant pH levels (mostly acidic soils). Additionally, soil organic carbon (SOC) levels negatively affect Cd concentration in beans; in other words, higher SOC in soil results in lower Cd in beans. This was observed in both Costa Rica and Ecuador.

This study also included the evaluation of Cd mitigation strategies on producer farms, implemented on eight farms in total across the platform countries. Trials were conducted to assess the effect of mineral, organic, and biological amendments on Cd accumulation. Bio-products were included for the first time in combination with mineral amendments to determine their effect on soils, applied only in Colombia due to advancements in this type of research. After the application of treatments, the most significant changes were observed in soils, particularly in Costa Rica and Colombia.

However, no statistically significant differences were observed between treatments for Cd variables



in leaves or beans. Cd concentrations in leaves and beans were indeed affected by the assessment time, possibly due to changes in crop phenology or climatic conditions. Considering the results from the mitigation trials, further research conducted over an extended period and with different doses is deemed necessary to determine the long-term effect of using amendments in reducing Cd in cocoa.

Keywords: cadmium, mapping, mitigation, chocolate, amendments, bioremediation, cadmium-tolerant bacteria, Cd immobilization.

Resumen Ejecutivo

El alto contenido de cadmio (Cd) presente en almendras de cacao en países de América Latina es una amenaza para la comercialización de cacao y derivados en mercados regulados, como la Unión Europea (UE). La biodisponibilidad de este metal está influenciada por factores edáficos y se considera que muchas de las altas concentraciones en fincas se deben a procesos naturales de formación de suelo. Los objetivos planteados en este trabajo fueron identificar la distribución geoespacial de altas concentraciones de Cd en Costa Rica, Colombia y Ecuador, determinar los factores del suelo y agronómicos que inciden sobre la absorción de Cd en los tejidos de cacao, y, estudiar las medidas de mitigación en finca para disminuir el riesgo de concentraciones elevadas de Cd en almendras de cacao. Para esto, en los países de la plataforma, se llevaron a cabo encuestas y/o se mapearon las concentraciones de Cd en suelo, hojas y/o almendras en 150, 100 y 600 fincas de productores de cacao en Costa Rica, Colombia y Ecuador, respectivamente. Además, se realizaron análisis fisicoquímicos y de elementos en muestras de suelo, hojas y almendras de cacao, y se modelaron estas variables para predecir el nivel de Cd en la almendra. Esto permitió identificar áreas de cultivo con niveles altos y bajos de cadmio y su relación con factores de suelo o de manejo agronómicos. La concentración total de Cd en el suelo en Costa Rica osciló entre $<0,1$ y $1,05$ (promedio $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$), lo cual es típico de suelos no contaminados. La concentración de Cd en la almendra osciló entre $0,12$ y $3,23$ (promedio $0,56 \text{ mg kg}^{-1}$), y el 22% de las muestras superó el umbral seleccionado de $0,80 \text{ mg kg}^{-1}$, y se ubicaron principalmente en las regiones Huetar Caribe y Huetar Norte. En Ecuador, la concentración promedio de Cd en almendras fue de $0,90 \text{ mg kg}^{-1}$ y el 40% de las muestras sobrepasaron un nivel crítico de $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$. En Colombia, se determinó que el promedio de Cd en suelos es $1,65 \text{ mg kg}^{-1}$ por lo que se considera que, si ocurre un alto factor de traslocación, y se da una correlación positiva entre los valores de suelos, con las de almendras de cacao, varias muestras de almendras asociadas a dicho promedio de Cd en suelos podrían sobrepasar el nivel crítico establecido dentro de la regulación europea en chocolates. Hay algunos factores de suelo que contribuyen a la concentración de Cd en almendras. En Ecuador, el 65% de la variabilidad acumulada en almendras puede explicarse por propiedades de suelo, esto indica, que es necesario controlar estas propiedades para afectar la concentración de Cd en almendras. Entre los factores más importantes se reporta el pH de suelo. Este factor fue significativo en los modelos estadísticos en Ecuador, pero no en Costa Rica, probablemente debido a niveles de pH más constantes (mayoría de suelos con pH ácidos). Adicionalmente, los niveles de carbón orgánico de suelo (COS) afectan la concentración de Cd en almendras de forma negativa, es decir, mientras más COS tiene un suelo menos Cd tiene en almendra. Esto se observó en Costa Rica y Ecuador. Este estudio también incluyó la evaluación de estrategias de mitigación de Cd en fincas de productores. Se implementaron ocho fincas en total en los países de la plataforma. En esta línea, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de enmiendas minerales, orgánicas y biológicas sobre la acumulación de Cd. Por primera vez, se incluyó bioproductos en combinación con enmiendas minerales para determinar el efecto en los suelos. Debido al avance en este tipo de investigaciones, estos bioproductos se aplicaron solo en Colombia.



Después de la aplicación de los tratamientos, los mayores cambios fueron observados en suelos, particularmente en Costa Rica y Colombia. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para las variables de Cd en hoja o almendra. Las concentraciones de Cd en hojas y almendras sí se afectaron por el tiempo de evaluación. Esto puede deberse a cambios en la fenología del cultivo o condiciones climáticas. Con los resultados observados en los ensayos de mitigación, se ve necesario que las investigaciones sean conducidas por un mayor tiempo y con distintas dosis para determinar el efecto del uso de las enmiendas en la reducción de Cd en cacao a largo plazo.

Palabras Clave: cadmio, mapeo, mitigación, chocolate, enmiendas, biorremediación, bacterias tolerantes a cadmio, inmovilización Cd.

1. Introducción

Cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo tropical establecido en regiones cálidas y una de las principales materias primas comercializadas en el mundo para la producción de alimentos, bebidas y otros productos industriales. En América Latina y el Caribe (ALC), este cultivo posee una histórica trayectoria vinculada a millones de productores familiares de la Región Andina, Centroamérica, El Caribe y el Cono Sur (Acierno, 2020; ICCO, 2023).


A nivel mundial, la producción estimada de cacao en almendra es de 4.8 millones de toneladas y se distribuye en África (77,3%), América y Caribe (17,8%) y Asia (4,8%). En América, destacan Ecuador y Brasil con una producción de 365.000 y 200.000 toneladas respectivamente (ICCO, 2023). Colombia y Costa Rica emergen como zonas estratégicas debido al potencial productivo edafoclimático, y se destacan por una producción de cacao 'fino y de aroma' que representa entre el 95% y el 100% del total de la exportación, mientras que en países como Perú, Ecuador, Honduras, Guatemala y Panamá, el cacao fino y de aroma representa entre el 50% y el 75% del total exportado (SEPSA, 2017; MADR, 2021).

El cacao es clave para la seguridad alimentaria, ya que es una de las principales fuentes de ingreso de los productores, además de ser una alternativa viable para enfrentar la adaptación al cambio climático en lugar de otros cultivos como café y banano. Este cultivo posee gran potencial para la integración con el sector privado y el desarrollo de nuevos mercados y canales de comercialización (MADR, 2021). Actualmente, el cacao enfrenta dificultades en su comercialización debido principalmente a normas establecidas por los países consumidores, entre las que se destacan regulaciones de tipo ambiental, sociales e inocuas, esta última relacionada con metales pesados como cadmio (Cd) en productos en percha (European Food Safety, 2012).

1.1 Cadmio y sus efectos en la población

Cadmio es un metal pesado de considerable toxicidad que ha sido motivo de creciente preocupación en América Latina debido a su presencia en diversas fuentes de alimento y su impacto negativo en la salud humana y el medio ambiente. Este elemento químico, se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, pero las actividades humanas, como la minería y la quema de combustibles fósiles, han aumentado su liberación en el entorno (Barraza et al., 2017; Wieczorek et al., 2018).

La exposición al Cd conlleva serias implicaciones para la salud humana, ya que este metal puede ingresar al organismo de diversas formas, como la ingesta de alimentos con alto contenido de Cd, inhalación de partículas presentes en el aire, y el consumo de agua contaminada. La acumulación crónica de Cd en los riñones puede resultar en daños renales y tener un impacto adverso en el sistema esquelético (Meter et al., 2019). Además, existe una asociación entre la exposición al Cd y un mayor riesgo de padecer ciertas enfermedades, como el cáncer, debido a su capacidad para



alterar la función celular y causar daño al ADN (Martínez Flores et al., 2013).

Debido al riesgo de exposición en la población, la Unión Europea estableció desde el 2019, límites máximos de Cd para alimentos incluido el cacao y sus productos derivados, lo que podría ocasionar un impacto negativo en pequeños productores de países latinoamericanos y la necesidad de investigación científica para mitigar estas altas concentraciones en estos países (Maddela et al., 2020; European Food Safety, 2012).

1.2 Presencia de cadmio en las cadenas de cacao de la región


Se ha reportado que el cacao proveniente de Latinoamérica tiene un mayor contenido de Cd, comparado con el que proviene de África (Vanderschueren et al., 2021). En este sentido, la georreferenciación (mapeo) de zonas con alto y bajo Cd se ha convertido en una herramienta esencial para comprender la distribución geográfica y la concentración de este metal pesado en la región. La creciente preocupación por los impactos negativos del contaminante en la salud humana y el medio ambiente ha impulsado la necesidad de llevar a cabo estudios exhaustivos que identifiquen las fuentes de emisión, las áreas de mayor riesgo y las posibles medidas de mitigación (Gramlich et al., 2018; Vanderschueren et al., 2021; Chavez et al., 2015).

A través de técnicas de cartografía y análisis geoespacial, se han generado mapas de diversas escalas que muestran la presencia y dispersión de Cd en suelos y almendras en varios países (Argüello et al., 2019; Bravo et al., 2021; Thomas et al., 2023). Estos mapas no solo permiten visualizar las áreas críticas de contaminación, sino que brindan soporte a las autoridades y a los tomadores de decisiones para identificar regiones que requieren intervenciones específicas, con el propósito de reducir la exposición a Cd y sus consecuencias adversas. Además, facilitan la identificación de otras variables relacionadas con el aumento del contaminante en el producto comercial.

1.3 Factores que afectan la absorción de Cd en cacao

En varios países de la región, se han realizado investigaciones sobre la relación suelo/planta para identificar áreas con altas concentraciones de Cd en almendras de cacao y los factores agronómicos o de suelo que agravan el problema (Arévalo-Gardini et al., 2017; Argüello et al., 2020; Chavez et al., 2015; Engbersen et al., 2019; Zug et al., 2019). Los autores han señalado que la contaminación es localizada y altamente variable dentro de las ubicaciones, por lo tanto, deben realizarse medidas de mitigación ajustadas a los sitios (Vanderschueren et al., 2021).

Varios estudios han demostrado que la disponibilidad de Cd en los suelos está influenciada por las concentraciones totales de Cd, el pH y el carbono orgánico del suelo (COS) (Smolders & Mertens, 2013). Estos factores pueden variar según las condiciones edafoclimáticas lo que afecta las concentraciones de Cd en almendras. Un reciente metaanálisis mostró que el pH del suelo es una



propiedad que afecta los niveles de Cd en la planta (Vanderschueren et al., 2021). Otro estudio reciente también concluyó que las concentraciones totales de Cd en suelo, el pH y el Cd de la hoja fueron los mejores predictores para las concentraciones de Cd en almendras. Los autores también reportaron que el COS y el pH tuvieron efectos relativamente menores (Wade et al., 2022).

1.4 Estrategias de mitigación de Cd en el cultivo de cacao

Debido a la importancia del cultivo de cacao como materia prima para numerosos procesos industriales y en consideración de los límites máximos permitidos de cadmio en las almendras, en los últimos años se han desarrollado tecnologías de mitigación para reducir la concentración de Cd en áreas previamente identificadas como problemáticas (Hussain et al., 2023). Estas estrategias abarcan diversas aristas, desde prácticas agrícolas más sostenibles hasta la regulación y el monitoreo de los niveles de Cd en los productos finales, con un énfasis en la mejora de la gestión de los suelos en las plantaciones.

Es esencial emplear técnicas y manejo del cultivo que reduzcan la absorción del contaminante por las plantas de cacao. Lo anterior, puede incluir la selección de variedades de cacao menos propensas a acumular el metal, así como la mejora de las prácticas de riego y la corrección del pH del suelo para limitar la disponibilidad de Cd para las plantas (Vanderschueren et al., 2021). Además, la implementación de buenas prácticas agrícolas, como la incorporación de materia orgánica al suelo, puede contribuir significativamente a reducir su absorción.

El mecanismo para reducir la disponibilidad de Cd en el suelo se basa en la formación de complejos con la materia orgánica, así como en la adsorción y sorción (Shaheen et al., 2015). Por otro lado, las enmiendas minerales, por ejemplo, actúan mediante la formación de precipitados, lo cual depende de la movilidad/solubilidad del metal y su concentración en la solución del suelo. Estos cambios en la disponibilidad de Cd reducen su traslocación a los tejidos de las plantas (Tajudin et al., 2016).

En este contexto, los objetivos de este trabajo fueron identificar la distribución geoespacial de altas concentraciones de Cd en Costa Rica, Colombia y Ecuador, determinar los factores del suelo y agronómicos que inciden sobre la absorción de Cd en los tejidos de cacao, y, estudiar las medidas de mitigación en finca para disminuir el riesgo de concentraciones elevadas de Cd en almendras de cacao y posterior afectación para su comercialización.

2. Metodología

2.1 Mapeo de fincas cacaoteras

2.1.1 Área de estudio y toma de muestras

En cada país, se seleccionaron fincas de cacao con un número representativo a las diferentes áreas cacaoteras. Por ejemplo, en Ecuador se seleccionaron más de 600 fincas, en Colombia más de 100 y en Costa Rica 150 fincas. En todos los casos, los criterios principales para la selección de fincas fueron, el área mínima (> 0,5 ha), la disponibilidad de mazorcas de cacao maduras (en Costa Rica y Ecuador) y la accesibilidad para el muestreo. Las fincas muestreadas se encuentran ubicadas dentro de un rango de altitud de 4 a 1000 m.s.n.m y las coordenadas para su representación espacial (Anexo 1) fueron registradas mediante un GPS (± 3 m de precisión).

Para la colecta de muestras (suelo o tejido) y preparación y determinación de Cd, se siguieron protocolos estandarizados de cada laboratorio. Estos procedimientos son estandarizados para los muestreos del proyecto y se encuentran detallados en el producto 4 (Metodología estandarizada) del proyecto (<https://www.fontagro.org/new/uploads/productos/17235 - Producto 4.pdf>). En Ecuador y Costa Rica, se incluyeron materiales de referencia de suelo y tejido durante el análisis de laboratorio.

2.1.2 Análisis geoestadístico y construcción de los mapas

De ser necesario, para cumplir los supuestos estadísticos, las variables continuas se transformaron logarítmicamente. Se realizaron análisis de regresión paso a paso (hacia atrás) para determinar los factores del suelo y de la planta que afectan la acumulación de Cd⁺² en las almendras de cacao.

Para la selección de variables en los modelos estadísticos se consideró la maximización del R² ajustado y la minimización de los Criterios de Información Bayesiana (BIC). Se utilizó un análisis de regresión múltiple mediante el Modelo de Mínimos Cuadrados (LSM) con las variables seleccionadas que se agruparon según (i) Cd⁺² y propiedades del suelo, (ii) variables de hoja, (iii) propiedades de suelo + variables de hoja, y (iv) propiedades de suelo + prácticas agronómicas.

La significancia estadística se fijó en $p \leq 0,05$. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk sobre los residuos de la regresión para probar el supuesto de normalidad. Se utilizó el Factor de Inflación de la Varianza (VIF) para probar la hipótesis de no multicolinealidad. Se excluyeron las variables con valores de VIF superiores a los permitidos. Los valores aceptables de VIF se calcularon utilizando la fórmula $VIF = 1/(1 - R^2)$ (Mason, C.Perreault, 1991; O'Brien, 2007). Todos los análisis de datos se realizaron con el software JMP Pro versión 16.1 (SAS Institute INC, 2021). Por otra parte, se calculó el factor de translocación suelo-almendra según la fórmula de (Blommaert et al. (2022) que es el cociente entre

Cd²⁺ en almendra y Cd²⁺ en suelo. Los resultados detallados para Costa Rica pueden consultarse en Carrillo, et al., (2023), para Ecuador en Arguello et al., (2019) y para Colombia en Bravo et al., (2021).

2.2 Estrategias de mitigación en fincas de productores

2.2.1 Ubicación y características de las fincas

La selección de la finca para el desarrollo de la investigación se basó en criterios como, concentraciones promedio de Cd en almendra entre 1 y 3 mg kg⁻¹, área de la finca mayor a 2 has, accesibilidad, voluntad del propietario de participar en un experimento a largo plazo y que la finca se encontrara en uno de los “hotspots” de Cd previamente identificados en la actividad de mapeo (Arguello et al., 2019; Bravo et al., 2020; Carrillo et al., 2023). Las tablas 1 y 2 muestran las características del sitio y del suelo donde se estableció el experimento.

Tabla 1. Ubicación y características generales de las fincas seleccionadas para la investigación

Descripción	FINCAS		
	Costa Rica	Colombia	Ecuador
Provincia/Departamento	Puntarenas	Antioquia	El Oro Guayas
Sector	Osa	San José de Nus Betulia La Unión San Luis	Balao El Guabo Puerto Inca
Edad de la plantación (años)	5	4 - 8	7 - 9
Material genético	CATIE R1	TCS, CCN51, FSV, FCH, FTA, BETULIA, ICS95*	Nacional CCN51

* Lista completa del material genético de las fincas de Colombia en el Anexo 2

Tabla 2. Propiedades del suelo (0-20 cm) de las fincas seleccionadas para la investigación

País	Sector	pH en Agua	COS (%)	Cu	Zn	Mn	Cd total (mg kg ⁻¹)
				mg L ⁻¹			
Costa Rica	Osa	5,3	1,8	3	1,9	9,00	1,37
Ecuador	Balao	6,1	0,9	0,43	-	21,35	0,25
	El Guabo	6,8	0,8	0,12	0,52	16,10	0,03
	Puerto Inca	6,8	2,2	0,20	0,02	23,66	0,24

2.2.2 Tratamientos y diseño experimental

En los ensayos de campo, se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado (DBCA) con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos variaron entre los países, de acuerdo a la disponibilidad de las enmiendas e investigaciones previas (Tabla 3).

Tabla 3. Detalle de enmiendas y dosis utilizadas en las fincas demostrativas por países

País	Tratamiento	Enmiendas	Dosis (t ha ⁻¹ año ⁻¹)
Costa Rica	1	Testigo/Control	-
	2	Zeolita	2
	3	Lombricompost	2
	4	Calcita (CaCO ₃)	2
	5	Biocarbón/biochar	2
	6	Zn + Mn + Cu	(mezcla)
Colombia	1	Testigo/Control	-
	2	Enmienda mineral + Biológica (cepa A)	-
	3	Enmienda mineral + Biológica (cepa B)	-
	4	Enmienda mineral	-
Ecuador	1	Compost	17,2
	2	Silicio	8 x 10 ⁻³
	3	Micronutrientes (Fe + Mn + Zn)	12 x 10 ⁻²
	4	Biocarbon/biochar	8,6
	5	Sulfato de calcio (CaSO ₄)	2,8
	6	Testigo/Control	-

En Costa Rica y Ecuador, las parcelas experimentales consistieron de un área de ~135 m² (3 hileras, 15 árboles) con una distancia entre árboles de 3m x 3m. Se utilizaron los tres o cinco árboles del centro como unidades de muestreo (Figura 1). Los árboles de cada unidad experimental se marcaron con cinta plástica de precaución de color definido, para su reconocimiento durante las labores de aplicación de tratamientos y muestreos.

Debido a los tamaños de las fincas típicas de productores en Colombia, el estudio no se pudo replicar dentro de una misma finca por lo que se tuvo que realizar las réplicas en diferentes fincas. En total, se tuvieron cuatro fincas demostrativas (Anexo 2), cada una con un tratamiento diferente (Tabla 3). En Colombia, se aplicaron dos microorganismos de la clase bacteriana α -proteobacteria, con potencial biorremediador, ambas bacterias tolerantes a cadmio – CdtB, denominadas como cepa A y cepa B, caracterizadas e identificadas previamente de manera molecular y a través de la técnica de microcalorimetría isotérmica (IMC). El uso de microorganismos para la remediación de suelos contaminados con metales pesados ha sido estudiado ampliamente, con el objetivo de identificar

los mecanismos de resistencia como la secreción de proteínas que permiten la unión con el metal o la acumulación intra o extracelular haciéndolos capaces de sobrevivir en ambientes de estrés (El-Meihy et al., 2019).

En las cuatro fincas se analizó el efecto de la aplicación de CdtB y zeolita sobre los parámetros fisicoquímicos y contenido de Cd en los suelos. Las dosis de las cepas aplicadas por árbol fueron de 1×10^7 UFC g^{-1} de suelo y 450 g de zeolita en polvo distribuidos homogéneamente alrededor del tronco en 4 huecos cardinales, de 15 cm de profundidad.

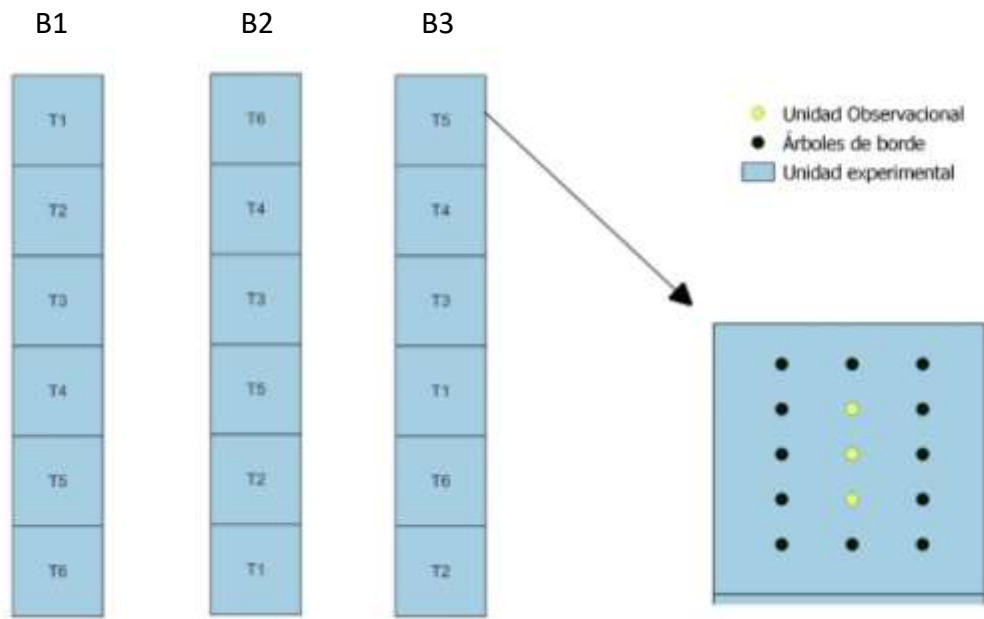


Figura 1. Esquema del diseño experimental y los tratamientos utilizados en campo. El número de árboles y tratamientos varió entre los países de acuerdo al tamaño de la finca

2.2.3 Aplicación de tratamientos

En Costa Rica y Ecuador, las enmiendas sólidas tuvieron un tamaño de partícula <2 mm. La dosis anual ($t\ ha^{-1}$) de los tratamientos se fraccionó en 2 aplicaciones divididas en dosis iguales y aplicadas cada seis meses. Las enmiendas fueron distribuidas en la zona de fertilización de las plantas (Figura 2) con el suelo descubierto para una mayor incorporación. En Colombia, los tratamientos se aplicaron al inicio del experimento una sola vez.



Figura 2. Ilustración de la aplicación de las enmiendas en la zona de fertilización de los árboles

2.2.4 Muestreo y monitoreo de los tratamientos en finca

Las muestras de cada tratamiento fueron colectadas cada 6 meses en Ecuador y Costa Rica, por un periodo > a los 18 meses, y en el caso de Colombia, las muestras fueron colectadas una vez al año. Las muestras de suelo estuvieron compuestas por submuestras de 0-20 cm de profundidad en la unidad observacional y zona de fertilización de las plantas. Las muestras se depositaron en bolsas plásticas etiquetadas para su transporte al laboratorio. Se tomaron hojas en cada punto cardinal de las plantas de la unidad observacional en etapa de desarrollo I2 (Greathouse, 1971). Las muestras compuestas se depositaron en bolsas plásticas selladas y etiquetadas. Se cosecharon mazorcas maduras (3-5) de los mismos árboles muestreados para hoja y suelo, y se depositaron en bolsas grandes de plástico etiquetadas para su traslado al laboratorio.

En Colombia, para evaluar la capacidad de CdtB para reducir el Cd de suelo se colecto muestras antes de las aplicaciones y solo un año después de las aplicaciones, esto debido a la coincidencia de la implementación de los ensayos y el confinamiento ocasionado por la pandemia de COVID 19.

En el caso de las muestras colectadas antes de las aplicaciones se desarrollaron actividades de caracterización de los microorganismos locales y su multiplicación para aplicación de campo. El detalle de los procesos antes mencionados se detalla en el Anexo 3.

2.2.5 Preparación y análisis de muestras

La preparación y el análisis de las muestras siguió la misma metodología descrita en el producto 4 de este proyecto. Para la determinación de nutrientes disponibles en el suelo, se determinaron las siguientes metodologías: acidez, Ca y Mg se usó una solución extractora de KCl 1 M y relación suelo-solución 1:10. Para los elementos P, K, Fe, Cu, Zn, Mn se utilizó la solución conocida como Olsen modificado (NaHCO_3 al 0.5 N + EDTA al 0.01 N + Superfloc, ajustada a pH 8.5 con NaOH) en Costa Rica. En Ecuador, para el análisis elemental se utilizó una extracción con una solución de acetato de amonio (NH_4OAc) a una concentración de 1M.

2.2.6 Análisis estadístico

Se determinaron las diferencias estadísticas entre los tratamientos usando un análisis de varianza (ANOVA) simple con las concentraciones de Cd en las almendras. Además, se calculó el factor de reducción de Cd^{+2} en hoja y almendra con el cociente de la concentración de Cd en el testigo y concentración de Cd en las plantas tratadas. Para estos factores de reducción y las variables Cd en el suelo, Cd en la hoja, Cd en la almendra y nutrientes en el suelo, se realizó un ANOVA con medidas repetidas en el tiempo, bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Se ejecutó la prueba de separación de medias de DGC con un nivel de significancia (α) de 0,05. Todos los análisis se realizaron con el software Navure versión profesional 1.0.7 (Navure team, 2023) y JMP v 17.01.

Para el análisis de los tratamientos aplicados con enfoque de mitigación en fincas cacaoteras de departamento de Antioquia, en Colombia, se aplicó estadística descriptiva para evaluar las diferencias en el cadmio del suelo, macroelementos y parámetros físico-químicos del suelo entre las condiciones iniciales y un año después de la aplicación de los tratamientos. Debido a la falta de réplicas de campo, el análisis estadístico del experimento de campo es descriptivo, sin contrastes complementarios entre tratamientos para robustecer las conclusiones derivadas del mismo.

3. Resultados y Discusión

3.1 Cadmio y otras propiedades de suelo

El Cd total de suelo osciló entre $<0,10$ y $27,0 \text{ mg kg}^{-1}$. El valor promedio más bajo se observó en Costa Rica y el más alto en Colombia, departamento de Cundinamarca ($0,22$ y $2,83 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente). La concentración más elevada observada hasta el momento en un suelo cacaotero ocurrió en Colombia, en el departamento de Santander, sin embargo, este es un caso muy puntual y no representa la realidad de la mayoría de los productores en los países. Es necesario realizar una investigación más profunda del origen de este Cd tan elevado. Los suelos de Costa Rica y Ecuador tienen concentraciones de Cd promedio considerados como no contaminados, mientras que Colombia presenta en promedio valores de Cd en suelos, estimados contaminados (Tabla 4) (Kabatta Pendias, 2010). En gran medida, este fenómeno está afectado por la roca parental y no por contaminación exógena (Vanderschueren et al., 2021).

El pH de suelo fue muy variable entre los países. Los valores más bajos de pH de suelo ($\text{pH} < 5,5$) fueron observados en Colombia y Costa Rica (Bravo et al., 2021; Carrillo et al., 2023) mientras que en Ecuador el promedio de pH de suelos fue más neutro ($\text{pH} = 6,02$) (Argüello et al., 2019). El COS no fue reportado en el estudio de Colombia (Bravo et al., 2021) pero la concentración media fue de $3,95$ y $2,59\%$ en Costa Rica y Ecuador, respectivamente (Tabla 4). Estos valores son comparables con valores de otros reportes de zonas afectadas con Cd en la región. Por ejemplo, en Honduras, Gramlich et al., (2018) reportaron valores de COS entre $1,86$ y $2,96\%$, que está dentro de los rangos normales para suelos en el trópico.

Tabla 4. Promedios (\pm desviaciones estándar) de las propiedades de suelo evaluadas en los tres países

País	Cd total (mg kg^{-1})	pH	COS (%)
Costa Rica	$0,22 (\pm 0,17)$	$5,53 (\pm 0,59)$	$3,69 (\pm 2,03)$
Ecuador	$0,44 (\pm 0,45)$	$6,02 (\pm 0,72)$	$2,59 (\pm 1,46)$
Colombia	$1,43 (\pm)$	NA	NA



El Cd total promedio del suelo en este estudio, para Ecuador y Costa Rica, estuvo dentro de la concentración media informada en suelos no contaminados ($< 1 \text{ mg kg}^{-1}$) en otros países (Kubier et al., 2019). Además, el valor encontrado fue cercano o menor a los promedios reportados en Perú, $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ (Zug et al., 2019) y Honduras, $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$ (Gramlich et al., 2018).

En Costa Rica, la concentración total del metal en el suelo estuvo altamente correlacionada con el Cd en la almendra ($r=0,79$). El COS y el pH estuvieron débilmente correlacionados con la concentración de Cd^{+2} de la almendra, no obstante, la acidez mostró una correlación mayor e inversa con el Cd total del suelo ($r= -0,37$); investigaciones recientes han demostrado que la acidificación es la principal causa de agravamiento de la contaminación por Cd en el suelo principalmente relacionado a una mayor solubilidad del metal (Wei et al., 2023).

La relación entre las propiedades del suelo y el Cd en la almendra ha sido reportada en varios estudios (Adams et al., 2004; Chavez et al., 2015; Gramlich et al., 2018) y un metaanálisis reciente (Vanderschueren et al., 2021). El Cd de suelo es un factor importante que afecta la acumulación de este elemento en las almendras o las hojas. Además, Argüello et al. (2019) encontraron que la concentración de este metal en almendras y hojas mostraron una correlación negativa con el pH.

Un aumento de cargas negativas en la fase sólida de suelos con alto pH promueve la sorción de Cd y reduce la disponibilidad para las plantas (Zug et al., 2019). Sin embargo, el suelo es una matriz compleja, por lo que otros factores, como la capacidad de intercambio catiónico, los óxidos e hidróxidos de Fe/Mn, la saturación de acidez y el contenido de arcilla, podrían interactuar en la sorción/desorción del Cd en el suelo y la correspondiente absorción de la planta.

3.1.1 Concentración de Cd en hojas y almendras de cacao

La concentración de Cd^{+2} en hojas y almendras de cacao solo se cuantificó en Costa Rica y Ecuador. En Colombia, este trabajo se encuentra bajo revisión interna debido a las potenciales repercusiones comerciales que se pueden derivar de exponer estos valores. La concentración en hojas varió de $<0,10$ a $55,5 \text{ mg kg}^{-1}$ con un promedio de $0,98$ y $2,62 \text{ mg kg}^{-1}$ en Costa Rica y Ecuador, respectivamente (Tabla 5).

Asimismo, la concentración del metal en almendras de cacao osciló de $<0,10$ a $10,4 \text{ mg kg}^{-1}$. El promedio de Cd en almendras fue de $0,56$ y $0,90$ en Costa Rica y Ecuador, respectivamente. En Costa Rica, el 75% de los datos tuvieron concentraciones inferiores a $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$ que puede considerarse sin problemas de exportación (Carrillo et al., 2023). En Ecuador, el 40% de las muestras tomadas tuvieron una concentración mayor a $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$, lo que puede considerarse restrictivo para las exportaciones a la Unión Europea. En promedio, Cd en la hoja fue 1,6 veces más alto que en almendras. El rango de concentración de Zn y Mn fue de 34 a 243 mg kg^{-1} y de 2 a 156 mg kg^{-1} , respectivamente. Los valores medios de Zn y Mn en las hojas se consideran óptimos y ligeramente superiores a los óptimos, respectivamente, desde el punto de vista de la nutrición (Fageria et al.,

2022). En general, las concentraciones de elementos (incluido el Cd) en hojas fueron más altas que en almendra, excepto P, que coincide con lo reportado por Gramlich et al. (2018).

Tabla 5. Concentraciones promedio (\pm desviaciones estándar) de cadmio en hojas y almendras de cacao en Costa Rica y Ecuador


País	Concentración de Cd (mg kg^{-1})	
	hojas	almendras
Costa Rica	2,62 (\pm 4,25)	0,56 (\pm 0,54)
Ecuador	0,98 (\pm 1,22)	0,90 (\pm 1,16)

Por otro lado, se obtuvieron resultados significativos en el análisis de correlación entre la concentración de Cd en almendra y elementos de hoja. Se encontró una relación fuerte y positiva ($r > 0.90$) en ambos países con el contenido del metal en las hojas, moderada y positiva con el elemento P ($p < 0.01$), mientras que los elementos menores analizados mostraron una correlación débil. Además, las relaciones entre las concentraciones de elementos y el Cd en el tejido foliar fueron moderadas ($r < 0.48$), a excepción con el P ($r = 0.52$) (Tabla 6).

Tabla 6. Matriz de correlación de elementos en hojas y Cd en almendras en plantas de cacao

Variables	Cd ⁺² - almendra	Cd ⁺² - hoja	Ca	Mg	K	Zn	Mn	Cu	Fe	P
Cd ⁺² -hoja	0,90**									
Ca	0,31**	0,41**								
Mg	0,37**	0,48**	0,70**							
K	-0,25*	-0,26*	-	-						
Zn	0,33**	0,45**	0,35**	0,44**	-0,11					
Mn	-0,32**	-0,25*	-	-0,13	-0,04	0,23*				
Cu	-0,37**	-	-	-	0,25*	-	0,07			
Fe	0,24*	0,33**	0,45**	0,59**	-	0,34**	-0,18	-		
P	0,51**	0,52**	0,36**	0,54**	0,26**	0,33**	-0,18	0,37**		
					-0,09	0,11	-	-	0,49**	
							0,55**	0,32**		

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.



Los resultados obtenidos, coinciden con investigaciones previas que informaron correlaciones débiles entre elementos dentro de la misma matriz ($r < 0.20$). En línea con estos hallazgos, se encontró una correlación positiva entre los niveles de Zn y Cd en hojas, como se reportó en el estudio de Gramlich et al. (2018). Además, Arguello et al. (2019) incluyeron variables de suelo en los modelos de predicción, ya que demostraron que las concentraciones de Cd en las almendras están más estrechamente relacionadas con el contenido del metal en las hojas y las propiedades del suelo, que con otros elementos de las hojas.

3.1.2 Distribución geoespacial de cadmio en los países de la región

La distribución geoespacial de Cd en los países de la plataforma se ha reportado en Bravo et al., (2021), Arguello et al., (2019) y Carrillo et al., (2023), para Colombia, Ecuador y Costa Rica, respectivamente. La distribución geoespacial de Cd se realizó con los datos obtenidos en muestras de suelo en Colombia, y almendras en Costa Rica y Ecuador. En Colombia, de acuerdo con Bravo et al., (2021), la mayor concentración de Cd en suelos ocurrió en el departamento de Santander, y con menos recurrencia en el departamento de Arauca (Figura 3). En Costa Rica, el 22% del total de las muestras superaron una concentración máxima de $0,80 \text{ mg kg}^{-1}$ considerada restrictiva para comercialización para la Unión Europea (Carrillo et al., 2023). Estas muestras se distribuyeron en las tres zonas de estudio de la siguiente manera: 30% en Huetar Norte, 20% en Huetar Caribe y 17% en Brunca (Figura 4). En Ecuador, las mayores concentraciones de Cd en almendras fueron observadas en algunas regiones de las provincias de Esmeraldas, Manabí y El Oro, en la costa; y, en el norte de la Amazonía y la provincia de Zamora Chinchipe (Figura 5). De estas provincias, Esmeraldas y Manabí producen alrededor de 40% de cacao del país, lo que podría verse en riesgo si no se toman medidas de mitigación (Argüello et al., 2019).

Algunas fincas que superaron el umbral en suelos o almendras podrían estar relacionadas con la pedología del suelo, afectación por la minería artesanal o una alta tasa histórica de aplicaciones de fertilizantes que pueden aumentar la entrada del metal pesado en el sistema. La fertilización con P se reporta como una de las causas exógenas de contaminación por Cd en suelos agrícolas en otros países (Kabata-Pendias, 2011; Jiao et al., 2012). Lo anterior, no es una práctica común en las fincas de cacao en la producción de cacao, por lo que el efecto de la aplicación de fertilizantes podría ser insignificante.

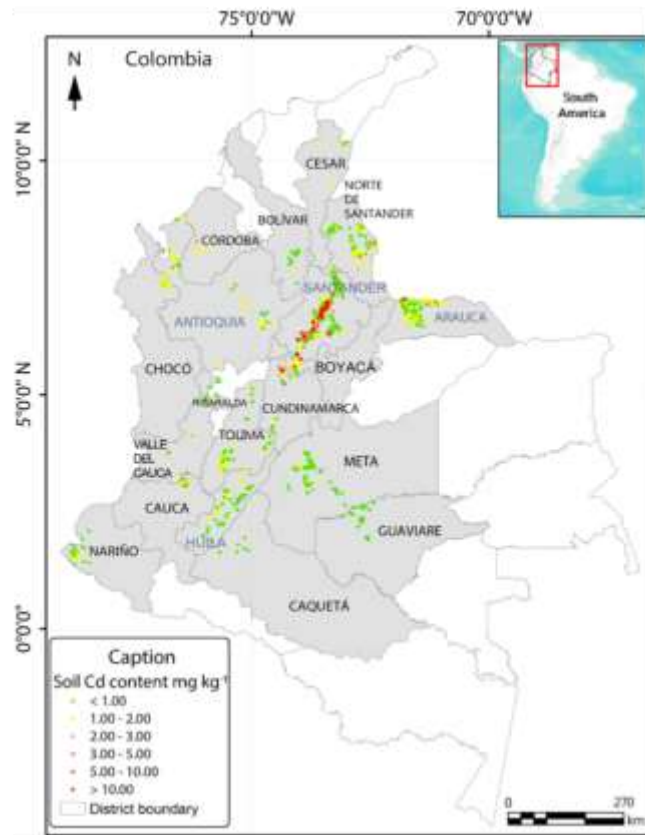


Figura 3. Distribución de cadmio en suelos cacaoteros de Colombia (tomado de Bravo et al., 2020)

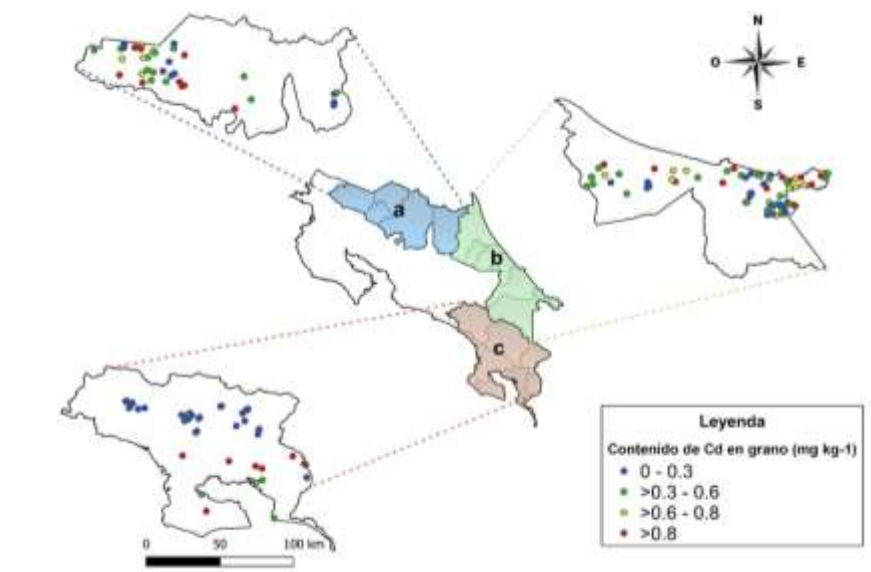


Figura 4. Distribución de cadmio en almendra en plantaciones de cacao ubicadas en tres regiones de Costa Rica: Huetar Norte (a), Huetar Caribe (b) y Brunca (c)

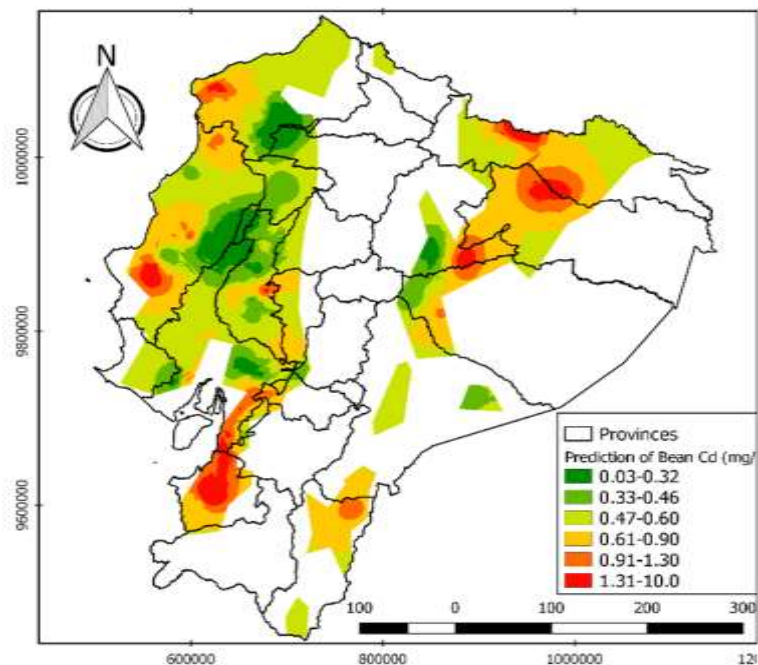


Figura 5. Distribución espacial de cadmio (mg kg^{-1}) en almendra en Ecuador (tomado de Argüello et al., 2019)

En Costa Rica, la concentración de Cd en el suelo en la región Brunca presentó la mayor variabilidad (CV = 77%), seguido de las regiones Huetar Norte (CV=68%) y Caribe (CV=60%), similar a lo reportado por Bravo et al. (2021). La concentración de este metal en almendra fue muy variable, principalmente en la región Brunca y Caribe (CV>100%) y menor en Huetar Norte (CV=68%). La variabilidad del metal en almendra fue reportada por Argüello et al. (2019) tanto a nivel de finca como a escala regional y sus resultados concuerdan con los presentados en este estudio.

Otros estudios han informado que el árbol de cacao es capaz de absorber y acumular mayores concentraciones de Cd en comparación con otras plantas, es decir, la relación entre la concentración en suelo y almendras (factor de translocación) es superior a 1. Esta capacidad se puede incrementar por una mayor disponibilidad y reciclaje del metal en el suelo debido a la descomposición de la hojarasca (Gramlich et al., 2018; Kwawukume et al., 2014) y procesos de acidificación de suelos.

Algunos autores han sugerido que cacao debe considerarse como un acumulador moderado de Cd (Vanderschueren et al., 2021). Esto concuerda con los datos encontrados en este estudio donde el factor de translocación osciló entre 0,13 y 12,5 (media 4,44), similar a 0,26-7,84 obtenido en Ecuador por Barraza et al. (2017) y 0,5 - 16,3 calculado en Honduras por Gramlich et al. (2018).

3.2 Efecto de enmiendas de suelo y microorganismos en la reducción de Cd en suelo y/o plantas de cacao

En los países de la plataforma, se implementaron diferentes experimentos de campo para evaluar la eficiencia de tratamientos de suelo para reducir las concentraciones de Cd en suelos y/o plantas de cacao.

3.2.1 Colombia

Se analizó el efecto de la aplicación de CdtB y zeolita sobre los parámetros fisicoquímicos y el contenido de Cd en los suelos. Se realizó una aplicación combinada de enmiendas de suelo co-aplicados o no con consorcios microbianos locales, conocidos con bacterias tolerantes a Cd (CdtB, por sus siglas en inglés) en cuatro fincas. Se pueden encontrar mayor información relacionados con la caracterización inicial de las fincas evaluadas en un estudio precedente en la misma región (Gil, JP. et al., 2021). En la Tabla 7, se muestran las propiedades fisicoquímicas del suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos. Los resultados iniciales mostraron que las fincas C y D contenían suelos con niveles de $\text{pH} < 5.5$, mientras que la finca A tenía un suelo con valores bajos de Al^{3+} y acidez intercambiable. Estas variables mostraron un comportamiento similar para las fincas evaluadas, excepto para la finca C, que presentó un mayor contenido de Al^{3+} y acidez intercambiable. La conductividad eléctrica promedio fue de $0,26 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$. Respecto al contenido de Ca^{2+} , se encontraron valores bajos en las fincas C y D, a diferencia de las fincas A y B, que registraron valores promedio del elemento. Se encontró Mg^{2+} en valores inferiores a $1,5 \text{ cmol}_+ \text{ kg}^{-1}$ para las 4 fincas, y los valores de K^+ fueron más altos en la finca D. El contenido de P fue mayor en la finca B.

Un año después de la aplicación de los tratamientos, las propiedades químicas del suelo mostraron que las concentraciones de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y P disminuyeron en la finca A. Esto también se observó para el pH de suelo, que registró una disminución de 1,24. En la finca B disminuyeron los contenidos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y P y MOS, así como el pH en 0,69. En la finca C, los contenidos de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y P mostraron un aumento con respecto a los valores iniciales. De igual forma el pH tuvo un incremento de 1,33. En la finca D se observó una disminución de K^+ y P, pero en cambio el pH aumentó en esta finca en 0,71. Los contenidos de acidez intercambiable y Al^{3+} no fueron detectados (ND) para la finca C, a diferencia de las otras 3 fincas evaluadas, en las que estos valores aumentaron en un 45%. El contenido de P solo muestra un aumento en la finca C y una disminución en las demás fincas. Esta reducción fue mayor en la finca B, con un porcentaje del 69%. En cuanto a la CIC, sólo aumentó ligeramente en la finca C, mientras que en las demás fincas mostró una ligera disminución. Así, se destaca que la granja C tiene mayor capacidad de retener e intercambiar nutrientes. Esto muestra una fuerte diferencia en los parámetros del suelo entre las fincas y los tiempos de muestreo. Estas comparaciones no se realizaron usando modelos estadísticos debido a la falta de replicas en el segundo muestreo. Los resultados deben de ser corroborados en experimentos



futuros.

Para las 4 fincas, el contenido de Cd disponible, estimado mediante el método de CaCl_2 0,01 M, se encontró por debajo del límite de detección de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ y por lo tanto no se reporta aquí. El contenido de Cd pseudototal inicial más alto lo presentó la finca B con $1,93 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que la finca D fue la que presentó el contenido más bajo al inicio $1,31 \text{ mg kg}^{-1}$. Vale la pena resaltar que un año después de la aplicación de los tratamientos, en la finca A, el contenido de Cd en el suelo no había variado, mientras que la mayor variación en el contenido de Cd del suelo se observó en la finca B, que presentó una disminución de 16%. En la Figura 6, se presentan los valores de Cd inmovilizado y disminuido en suelos entre las fincas estudiadas en la temporalidad evaluada de un año al iniciar y finalizar la pandemia de COVID-19.

Tabla 7. Propiedades químicas del suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos

Farm	Time	pH	EC	SOM	CEC	Ca	Mg	K	AIH	Al	P	Cd
			[dS·m ⁻¹]	[%]	[cmol _c ·kg ⁻¹]			[mg·kg ⁻¹]				
A	Antes‡	5,91±0,34	0,34±0,03	3,40±0,16	7,92±1,80	6,04±1,57	1,43±0,30	0,23±0,04	0,14±0,08	0,06±0,05	3,87±0	1,68±0,03
	Después	4,67	0,22	4,07	3,49	1,34	0,39	0,13	0,83	0,46	2,66	1,68±0,04*
B	Antes‡	5,47±0,47	0,24±0,03	3,55±0,07	7,07±2,27	5,21±2,14	1,05±0,65	0,15±0,06	0,59±0,59	0,42±0,42	12,41±2,09	1,93±0,06
	Después	4,78	0,21	2,79	3,76	1,40	0,66	0,09	1,56	1,18	3,87	1,62±0,01*
C	Antes‡	4,73±0,03	0,32±0,05	3,57±0,34	6,76±0,34	2,77±0,33	0,91±0,04	0,14±0,01	2,87±0,03	2,31±0,01	3,87±0	1,49±0,04
	Después	6,06	0,34	5,52	11,41	8,64	2,57	0,15	ND	ND	6,05	1,19±0*
D	Antes‡	5,06±0,04	0,17±0,01	2,68±0,17	3,74±0,17	1,84±0,15	0,80±0,07	0,32±0,08	0,69±0,12	0,39±0,12	5,30±1,43	1,31±0,02
	Después	5,77	0,16	2,64	4,25	2,83	1,13	0,24	ND	ND	3,87	1,24±0,01*

Abreviaciones: EC conductividad eléctrica, SOM contenido de materia orgánica, CEC capacidad de intercambio catiónico, AIH Acidez intercambiable. La desviación estándar fue calculada con el n muestral en cada una de las fincas con base a las réplicas obtenidas para las muestras de suelo. Número de Muestras por finca (n): A antes: n=7 después: n=2, B antes: n=2 después: n=1, C antes: n=2 después: n=1, D antes: n=2 después: n=1.

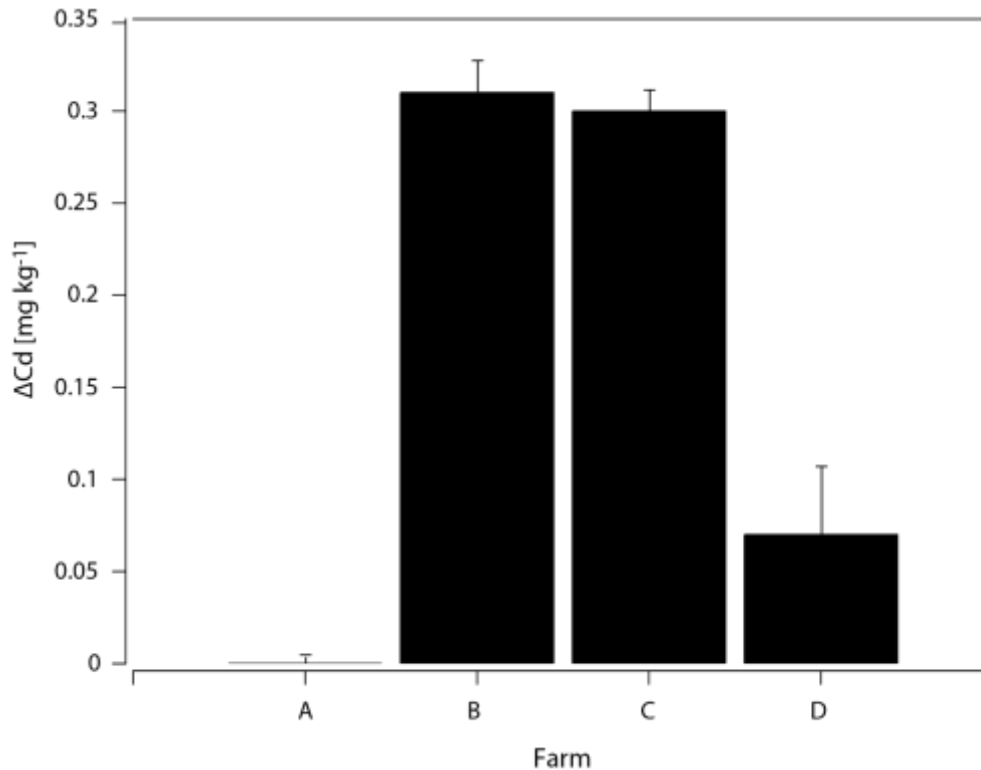


Figura 6. Variación (Δ) de los contenidos de Cd (mg kg^{-1}) en suelo para las 4 fincas evaluadas en el departamento de Antioquia un año después de la aplicación de los tratamientos (Quiroga-Mateus et al., 2022)

La variación en los contenidos de Cd (mg kg^{-1}) en suelo para las 4 fincas evaluadas en el departamento de Antioquia un año después de la aplicación de los tratamientos superiores a $0,23$ (mg kg^{-1}) se presentaron en los tratamientos que incluyeron la aplicación de zeolita en consorcio con las bacterias tolerantes a Cd (CdtB).

Los resultados preliminares de las dos cepas de CdtB aplicadas en los ensayos de campo, sugieren una aplicabilidad potencial para reducir el Cd disponible en el suelo. Si bien se ha señalado en estudios de campo previos (Chavez et al., 2016) que la capacidad de la zeolita para retener Cd es menos exitosa en comparación con otras enmiendas, la aplicación de una cepa de CdtB en combinación con zeolita parece ser más efectiva que su aplicación sola. Esto podría ser el resultado del efecto sobre parámetros del suelo como la CIC. Sin embargo, aún no está claro cómo funciona, dado que estos parámetros no cambiaron en una dirección consistente en las fincas B y C (ambos recibieron zeolita y una cepa CdtB). Además, la CdtB no se aplicó sola ni en consorcio a cada finca, por lo que la causa de estos cambios no es clara. También es importante comprender si los cambios en el contenido de Cd en el suelo son lo suficientemente significativos como para provocar una disminución del Cd en la almendra de cacao. Debido a las capacidades de solubilización de P y K de CdtB, las vías metabólicas de biometeorización y bioquelación (Bravo &

Braissant, 2022) podrían explicar la variación de estos parámetros en las fincas B y C, pero esto debe confirmarse con ensayos meta-transcriptómicos.

3.2.2 Costa Rica

La aplicación de las enmiendas mostró efectos significativos en la reducción de Cd en suelos y/o hojas. La aplicación de zeolita y carbonato de calcio (CaCO_3) a los 18 meses de la primera aplicación mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) de Cd. La zeolita y el carbonato de calcio han sido enmiendas muy utilizadas para disminuir la disponibilidad del Cd para las plantas (Arguello et al., 2023; Chávez et al., 2016; Hong et al., 2009; Carrillo et al., 2013). En el caso de carbonato, algunos autores han sugerido que el efecto puede estar relacionado a procesos de adsorción, precipitación (CdCO_3) o hidrólisis y en el caso de las zeolitas, su volumen y diámetro de los poros contribuye en los procesos de adsorción (Marques et al., 2002).

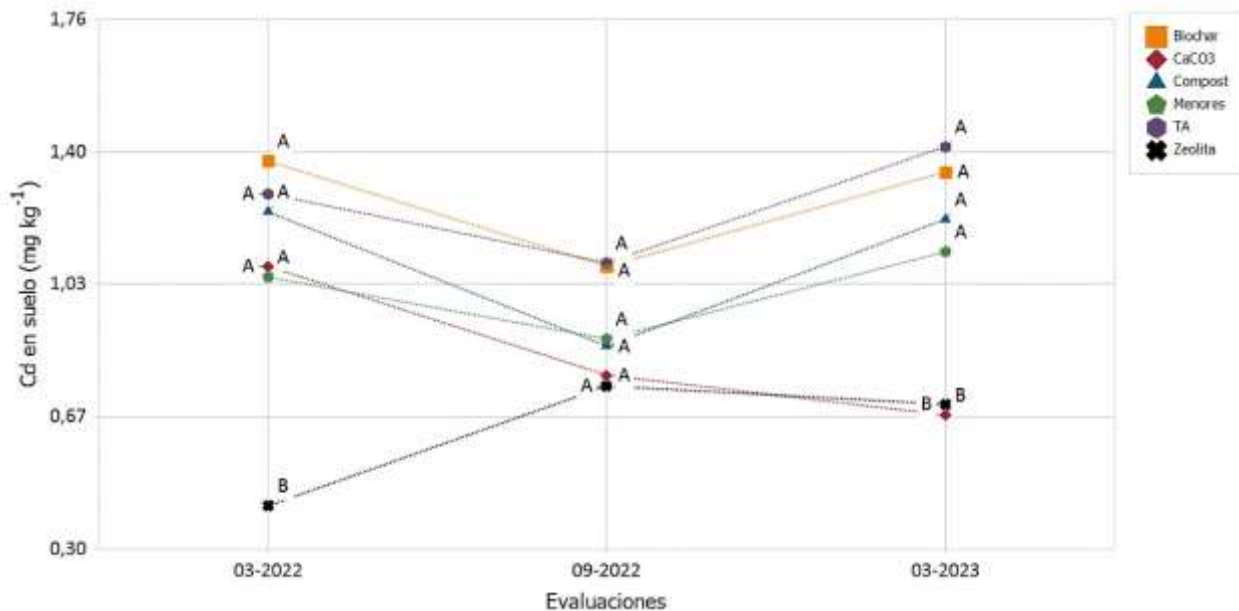


Figura 7. Concentración de Cd en suelo en función del tiempo con el uso de diferentes enmiendas de suelo. TA = testigo absoluto. Medias con una letra distinta representan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) según la prueba de DGC

La aplicación de las demás enmiendas minerales y orgánicas no afectó significativamente las concentraciones de Cd en el suelo en ninguna de las demás evaluaciones (Figura 7). Sin embargo, las investigaciones sobre los efectos de las enmiendas orgánicas como el compost, vermicompost y biochar para la reducción de Cd en el suelo y su disponibilidad para planta, han venido en

aumento en los últimos años en distintos cultivos, pero sus resultados pueden ser procesos más lentos (Saengwilai et al., 2020; Hamid et al., 2018).

Por otra parte, las enmiendas sí afectaron la disponibilidad del Cu con efectos de los factores por separado, y una reducción de 1,8 veces con respecto a la primera evaluación; además el tratamiento de elementos menores obtuvo una mayor concentración de estos elementos ($p < 0,05$) (Tabla 8).

Para el Mn y Zn solo hubo efecto del factor tiempo, pero los resultados fueron más variables. En este sentido, la planta de cacao puede compensar una menor o mayor disponibilidad de algunos elementos en el suelo en distintas etapas fenológicas por efecto del encalado u otras enmiendas al tomar estos nutrientes de capas subsuperficiales (Arguello et al., 2020).

Tabla 8. Media de pH de suelo y las concentraciones de elementos del suelo bajo distintas enmiendas y tiempos de aplicación

Factores	pH	K	Mg	Cu	Mn	Zn
<i>Enmiendas</i>						
Biochar	6,10	0,40	2,23	6,00 ^B	36,7	8,79
Compost	6,04	0,21	2,13	5,11 ^B	39,3	7,68
Menores	5,88	0,23	2,55	10,6 ^A	44,0	9,10
TA	6,18	0,20	2,18	5,22 ^B	30,4	7,14
CaCO ₃	5,98	0,21	2,50	6,44 ^B	30,3	6,84
Zeolita	5,68	0,19	2,68	4,67 ^B	33,4	4,30
<i>p-valor</i>	0,34	0,20	0,41	0,01	0,42	0,22
<i>Tiempo</i>						
6 meses	6,08	0,17 ^B	2,66 ^A	8,33 ^A	37,33 ^A	9,96 ^A
12 meses	5,94	0,19 ^B	2,01 ^B	6,06 ^B	26,78 ^B	6,34 ^B
18 meses	5,91	0,36 ^A	2,47 ^A	4,61 ^C	43,00 ^A	5,63 ^B
<i>p-valor</i>	0,20	0,04	0,03	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Enmienda*Tiempo</i>						
<i>p-valor</i>	0,69	0,44	0,49	0,14	0,77	0,05

Medias con una letra distinta representan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) según la prueba de DGC.

Las concentraciones de Cd, así como los factores de reducción en almendras y hojas, fueron significativamente afectadas por el tiempo (Tabla 9). Los RF y las concentraciones fueron variables, sin embargo, los tratamientos pudieron haber sido afectados por la genética en la absorción y acumulación de Cd en plantas atribuida a diversos factores, incluido el tamaño y la morfología de las raíces, la actividad de los transportadores de absorción de iones metálicos y la capacidad de las raíces para producir exudados, además de la interacción con los microorganismos del suelo (Lewis et al., 2018; Grant et al., 2008).

Tabla 9. Media de las concentraciones de Cd y factores de reducción de Cd en almendra y hoja bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación

Factores	Almendra		Hoja	
	Cd	RF	Cd	RF
<i>Enmiendas</i>				
Biochar	2,58	1,85	3,59	1,37
Lombricompost	2,17	1,58	3,75	1,43
Menores	2,07	1,37	3,66	1,34
TA	1,91	1,39	3,40	1,29
CaCO ₃	1,65	1,17	2,79	1,07
Zeolita	1,41	1,01	2,90	1,07
<i>p-valor</i>	0,38	0,51	0,30	0,56
<i>Tiempo</i>				
6 meses	2,25 ^A	1,27 ^B	3,02 ^B	1,25 ^A
12 meses	1,58 ^B	0,82 ^C	4,12 ^A	1,53 ^A
18 meses	2,07 ^A	2,10 ^A	2,91 ^B	1,00 ^B
<i>p-valor</i>	<0,01	<0,01	<0,01	0,01
<i>Enmienda*Tiempo</i>				
<i>p-valor</i>	0,44	0,97	0,90	0,99

Medias con una letra distinta representan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) según la prueba de DGC.

No se observó ningún efecto significativo ($p > 0,05$) de las enmiendas sobre las concentraciones de Cd en hoja después de 18 meses (Figura 8 y 9), pero la aplicación de carbonato y la zeolita podrían reducir significativamente las concentraciones de Cd en el tejido. Investigaciones recientes reportan que para tener un impacto en el tejido de la planta se requerirá al menos 24 meses de evaluación (Argüello et al., 2023). Esta tendencia podría estar en línea con los hallazgos de Ramtahal et al. (2019), quienes informaron una reducción similar en el Cd de la hoja de cacao

luego de 3 meses de aplicación. Esto autores reportaron que el efecto del encalado desapareció en evaluaciones subsiguientes.

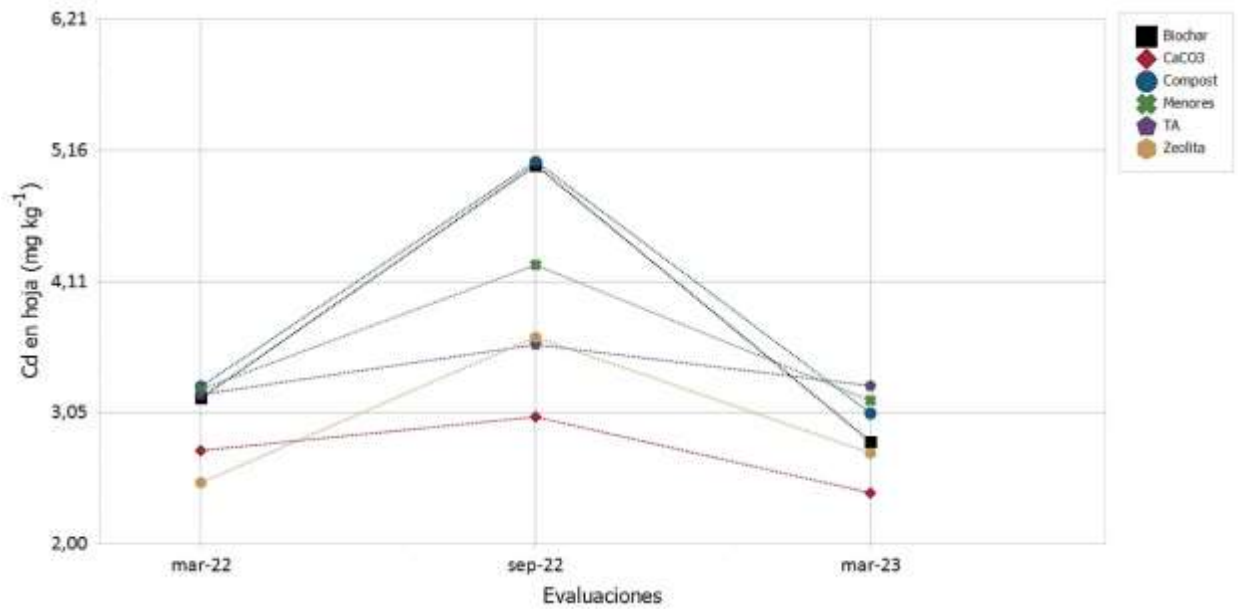


Figura 8. Distribución de las concentraciones de Cd en hoja bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación. TA = testigo absoluto

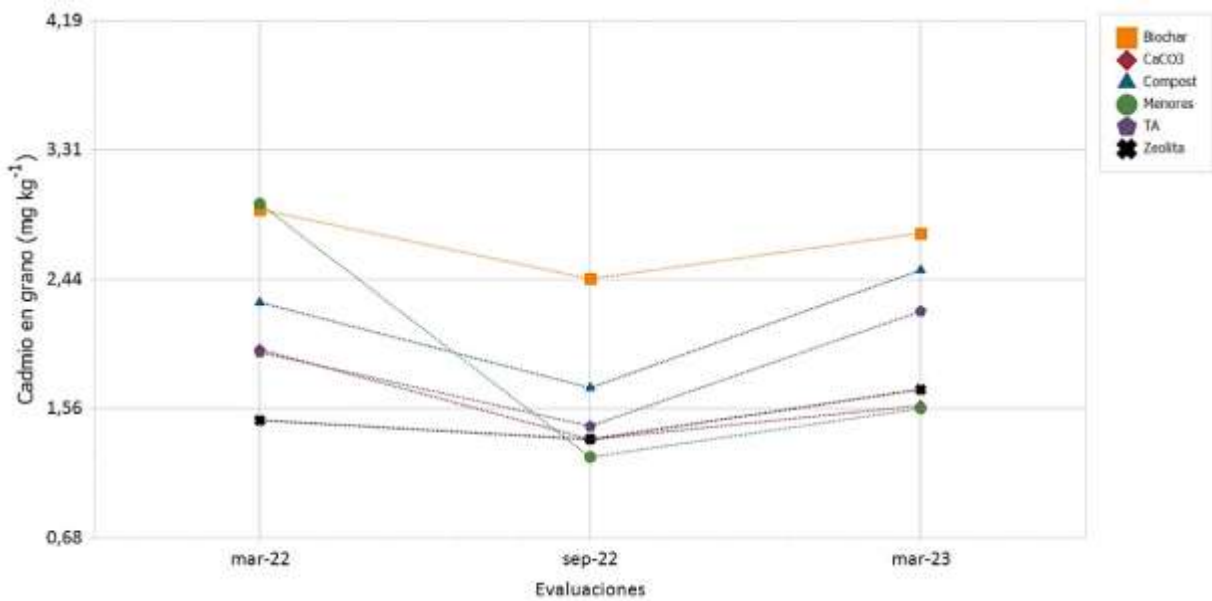


Figura 9. Distribución de las concentraciones de Cd²⁺ en almendras bajo distintas enmiendas y tiempo de aplicación. TA = Testigo absoluto

3.2.3 Ecuador

Como se describe en la Tabla 3, los tratamientos 1, 4 y 5 estuvieron orientados a modificar las propiedades de suelo que afectan la disponibilidad de Cd y su transferencia a la planta. Los tratamientos 1 y 4 (T1 y T4) buscan incrementar la materia orgánica de los suelos mientras que el tratamiento 5 busca el incremento de Ca. Para evaluar el efecto de los tratamientos en estas propiedades, se colectaron muestras de suelo a los 6, 12 y 18 meses, en esta sección se presentarán los resultados obtenidos en la última colecta (18 meses) ya que se esperaba que para esta fecha se podría evidenciar un efecto acumulado de los tratamientos.

Con respecto al contenido de materia orgánica (MO), se observaron cambios significativos ($p < 0,05$) entre el T2 y el control en dos de las tres fincas (Figura 10). En la finca ubicada en El Guabo, la concentración de MO en el T1 fue 3,40% mientras que en el control fue de 2,19%. Esto equivale a un factor de incremento de 1,55. En la finca ubicada en el sector de Puerto Inca, la MO tuvo una concentración de 5,11 vs 4,35 entre el T1 y el control, respectivamente. Esto significaría un factor de incremento de 1,17. Por otro lado, se pudo evidenciar que el contenido de MO no se incrementó de forma significativa en el T4 (biochar) en ninguno de las dos fincas. El factor de incremento fue de apenas el 1,07 y 1,02 en la finca de El Guabo y Puerto Inca, respectivamente.

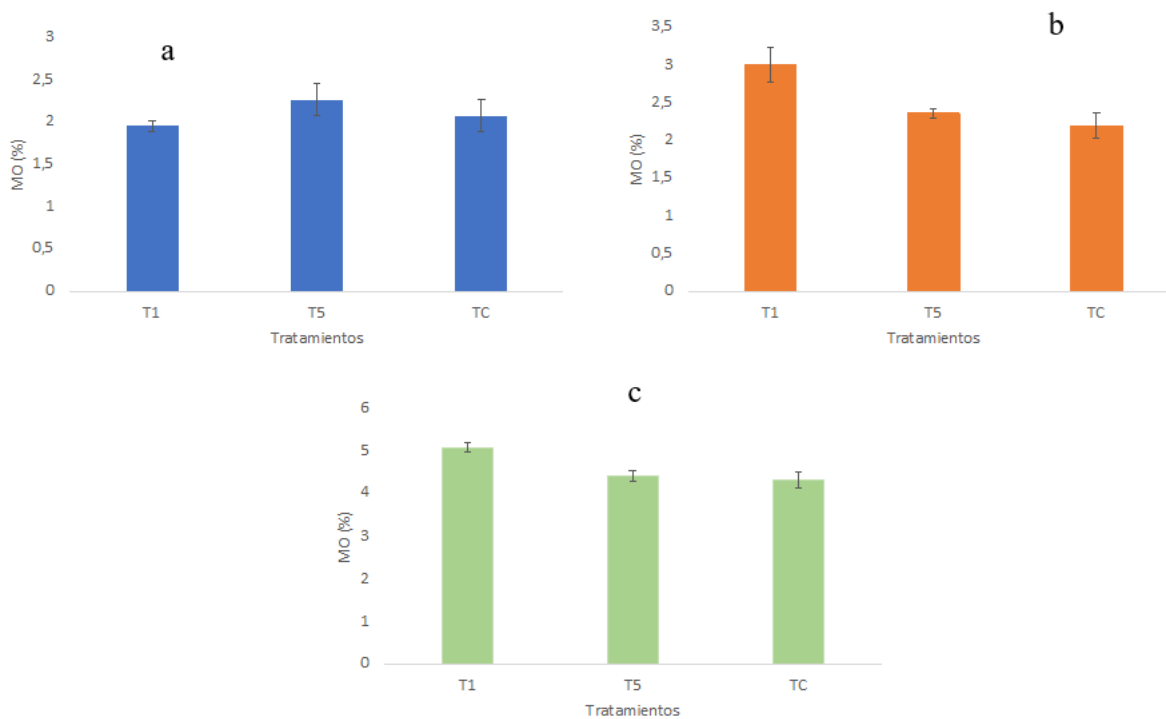


Figura 10. Cambios en el contenido de materia orgánica (MO) de suelo en tres fincas demostrativas ubicadas en (a) Balao, (b) El Guabo y (c) Puerto Inca afectados por la aplicación de compost (T1) y biochar (T4). Las barras representan el promedio de tres réplicas

Con respecto a la concentración de Ca, extraída por 1 M de acetato de amonio, que es un procedimiento estándar para extraer el Ca intercambiable en suelo, no se presentaron diferencias significativas entre el T5 y el control, en ninguna de las fincas. Tampoco se detectaron diferencias en el pH de suelo entre ninguno de los tratamientos y el control. Esto último era un resultado esperado ya que no se aplicaron entre los tratamientos ningún encalante.

El cadmio biodisponible se lo evaluó mediante extracción con 1M de acetato de amonio y lectura a través de Espectómetro de Emisión Óptico con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES). La concentración de Cd en suelo fue muy variable y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las fincas. La variabilidad de la concentración de Cd en suelos, a los 18 meses de evaluación, fue de hasta 57, 45 y 19% en las fincas de Balao, El Guabo y Puerto Inca, respectivamente. Con esta variabilidad, será muy complicado determinar diferencias entre los tratamientos o alguna tendencia que indique la efectividad de los tratamientos para reducir la concentración biodisponible del metal.

En Ecuador, los resultados del tratamiento 3 (Fe, Mn y Zn) fueron muy variables en las tres fincas. Por ejemplo, la concentración de Mn en Balao y Puerto Inca fueron casi 3 veces inferiores a los observados en la finca de El Guabo. Así mismo, la concentración de Zn en las tres fincas varió significativamente entre ellas, por ejemplo, la finca de Balao mostró una concentración por debajo de niveles óptimos de Zn mientras que la mayor concentración se observó en El Guabo (Tabla 10).

En las fincas de Balao y Puerto Inca, la aplicación de Mn incrementó la concentración en las plantas en 35 y 31%, respectivamente. En las fincas de Balao y El Guabo, la aplicación de Zn en el tratamiento 3 incrementó la concentración promedio del elemento en las plantas. La concentración de Zn en T3 fue 92 y 16% más altas en las fincas de Balao y El Guabo, respectivamente. Estos resultados muestran dos factores que ocurren en fincas cacaoteras: 1) los micronutrientes en suelo tienen una alta variabilidad y por consiguiente las concentraciones entre fincas son muy diferentes, esto implicaría que las dosis a aplicarse tienen que ser ajustadas a las realidades de cada finca lo que complicaría tener una estrategia “universal”, y 2) las plantas de cacao tienen preferencia de absorción de ciertos elementos, en principio Zn es el elemento preferencial en fincas donde los niveles no son óptimos (como Balao). En estas fincas, el efecto de la aplicación de fuentes exógenas del elemento tendrá mejores resultados. Al contrario, el Fe es el elemento con menor absorción y translocación en la planta. Probablemente, este elemento es retenido e inmovilizado por los coloides del suelo.

Tabla 10. Cambios en las concentraciones de Manganeso (Mn), Hierro (Fe) y Zinc (Zn) en tres fincas demostrativas afectadas por la aplicación de micronutrientes (T3). Valores son los promedios de tres réplicas y DS es la desviación estándar de la media

Finca	Tratamiento	Mn (mg/kg)		Fe (mg/kg)		Zn (mg/kg)	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
Balao	T1	82	13,5	179	80,3	27,9	10,1
	T2	87,3	4,8	151	9,7	32	6,8
	T3	88,9	7,7	181	42,3	50	21,7
	T4	74,5	13,7	135	8,9	26	6,95
	T5	67,8	19,1	127	18,3	38	11
	TC	65,9	11,4	134	52,7	26	5,12
El Guabo	T1	296	95,6	143	21,5	86,5	19,5
	T2	242	82,5	210	83,9	84,5	9,9
	T3	233	61,7	187	15	108	32,8
	T4	241	113,2	144	31,2	79,4	42,2
	T5	208	82,8	118	23,1	84,9	15,8
	TC	312	74,4	174	38,3	93,1	7,1
Puerto Inca	T1	84,1	43,3	136	40,2	66,5	33,4
	T2	68	18,2	219	17,4	37,6	5,5
	T3	102	25,1	222	105	50,03	21,7
	T4	80,9	14,5	238	44,5	60,6	14,9
	T5	86,5	11	302	33,1	53	15,4
	TC	77,5	34,1	162	25,3	52,1	4,3

El fin de la aplicación de estos micronutrientes es limitar la absorción de Cd en las plantas. Estos elementos se comportarían como antagonistas reduciendo la concentración de Cd en almendras. Sin embargo, para lograr este efecto, es necesario incrementar la concentración de los micronutrientes a niveles superiores a lo considerado óptimos para cacao. Esto ha sido reportado por otros investigadores en otros cultivos (Paul & Chaney, 2017). No se conoce con certeza los niveles de Fe, Mn o Zn necesarios para contrarrestar la absorción de Cd, tampoco se conoce la magnitud de este antagonismo (% de Cd que se reduce por la presencia del micronutriente) en cacao. Sin embargo, se puede inferir, basado en niveles óptimos de los elementos que la concentración de Zn en hojas debería de ser entre 120-150 y la de Mn y Fe de 600-800 mg kg⁻¹. Claramente, para ningún elemento y en ninguna de las fincas se detectaron estas concentraciones. Los factores que han interferido en estos resultados fueron expuestos en líneas anteriores por lo que es necesario revisar las dosis que se aplican en las fincas, el producto

comercial que se utiliza (actualmente Na-EDTA-Zn/Mn/Fe) y la forma de aplicación.

Es importante indicar que la concentración de Cd en hojas de cacao no sufrió una reducción a consecuencia de la aplicación de los tratamientos ($P > 0,05$), en ninguna de las tres fincas. De hecho, en todas las fincas, las plantas en el control tuvieron una menor concentración de Cd en las hojas, comparadas con los demás tratamientos. Esto no responde la aplicación de los tratamientos, sino, a la concentración inicial de Cd aleatoria en las fincas.

A pesar de no existir diferencias significativas, desde el cálculo estadístico, se pueden identificar tendencias importantes en las fincas de Balao y El Guabo, especialmente. En la finca de Balao, existe una menor concentración de Cd (promedio) en los tratamientos 2, 3 y 4, en comparación con el control (Tabla 3). En esta finca, la mayor diferencia se dio entre el control y T3 con un factor de 1,26. En la finca de El Guabo, la tendencia fue menos clara. Los tratamientos 2 y 3 mostraron una concentración menor que el control, con un factor de diferencia (entre el control y el tratamiento) de 1,16 y 1,14, respectivamente. No se observaron tendencia de decrecimiento en la concentración de Cd en la finca de Puerto Inca. En esta finca, el control tuvo menor Cd que los tratamientos (Figura 11).

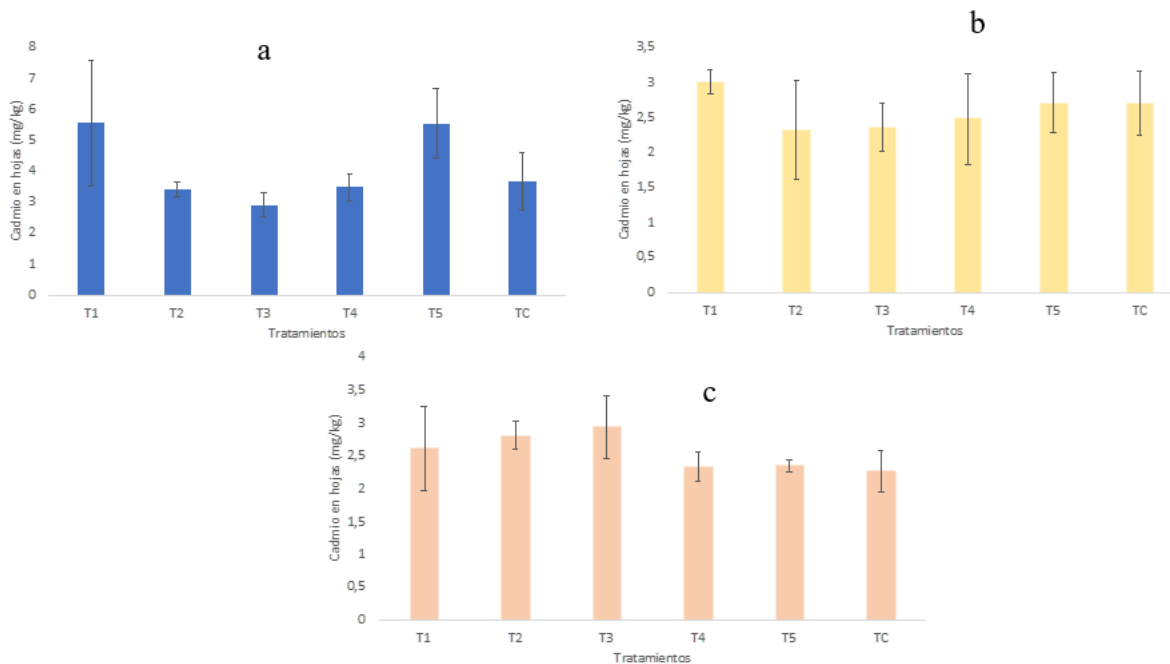


Figura 11. Cambios en la concentración de cadmio (Cd) en hojas colectadas en tres fincas demostrativas ubicadas en (a) Balao, (b) El Guabo y (c) Puerto Inca. Las barras representan el promedio de tres réplicas

Al igual que en Costa Rica, ninguno de los tratamientos tuvo un efecto claro en la concentración de Cd en almendras de cacao ($p > 0,05$). Este es un resultado que se podía anticipar debido al corto tiempo de monitoreo de los tratamientos y al poco efecto que han tenido los tratamientos en la concentración de Cd en hojas. Las concentraciones más elevadas de Cd en almendras se observaron en la finca de Balao, con un promedio de $\sim 3 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que, en las fincas de El Guabo y Puerto Inca, las concentraciones promedio no sobrepasan los 2 mg kg^{-1} . En la finca de El Guabo, la concentración de Cd incrementó significativamente en todos los tratamientos, incluido el control, con respecto al tiempo. Algo similar ocurrió en la finca de Puerto Inca, pero esto se observó a partir del mes 12 de evaluación. En ninguna de las fincas se observa una tendencia clara de disminución de Cd, al contrario, los datos son extremadamente variables, especialmente en la finca de Balao (Figura 12). Algo similar reportaron Arguello et al., (2023) en fincas cercanas. Estos autores reportaron que la concentración de Cd decreció con el tiempo en una de las fincas evaluadas. El tiempo mínimo para observar un efecto positivo de las enmiendas sobre Cd en los tejidos es de 22 meses.

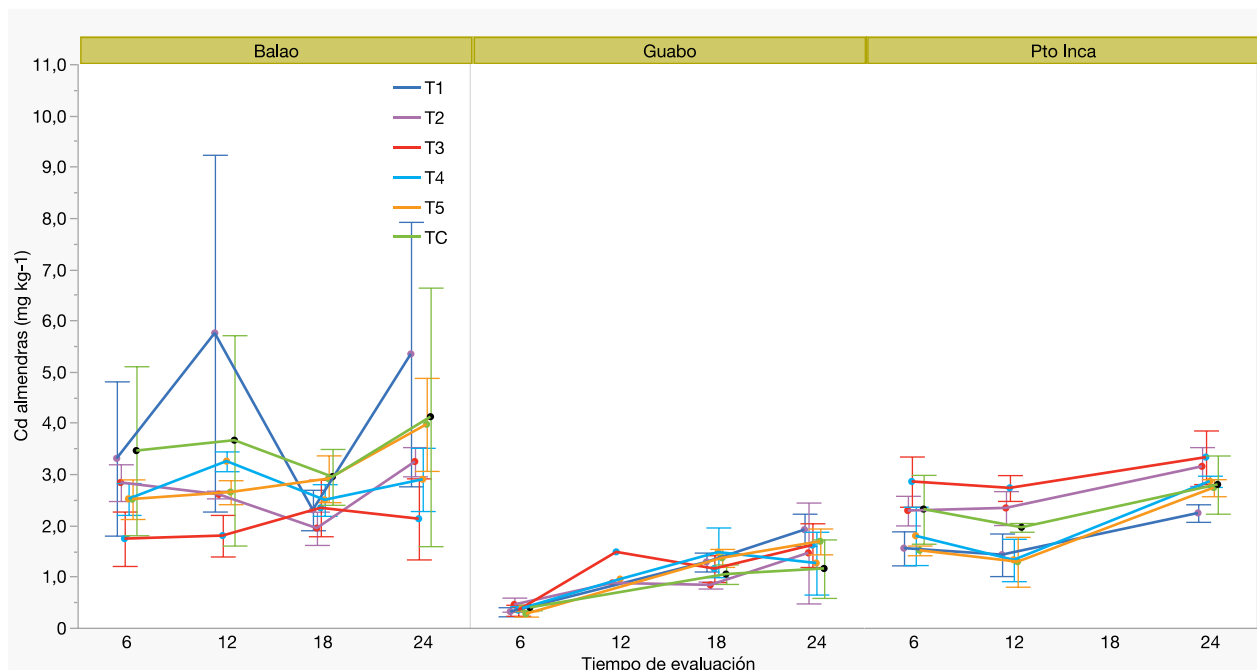


Figura 12. Dinámica de concentraciones de cadmio (Cd) en almendras de cacao durante 24 meses de estudio en tres fincas demostrativas, los puntos representan a la media de tres réplicas y las barras al error estándar de la media

La falta del efecto de las enmiendas sobre el Cd en la hoja (Figuras 8) y Cd en almendras (Figura 9 y 12) puede deberse a varios factores. La fluctuación de las evaluaciones a través del tiempo se ha atribuido a cambios en las condiciones ambientales, como el aumento de la disponibilidad de Cd en los diferentes tratamientos durante la temporada de lluvias (Ramtahal et al., 2019) o la

fenología del cultivo.

Las evaluaciones en el tiempo han manifestado un comportamiento inverso en la concentración de Cd en hojas y almendras. Arguello et al. (2023) sugieren que, durante la etapa de llenado de la mazorca, el Cd transportado en el xilema se transloca preferentemente almendras, limitando su disponibilidad para las hojas, fundamentado en el fraccionamiento isotópico similar de Cd en raíces y almendras de cacao por un flujo de Cd a través del xilema lo que podría explicar el comportamiento encontrado en este estudio (Moore et al., 2020).

4. Conclusiones

La concentración elevada de Cd en almendras de cacao amenaza la sostenibilidad de la producción en países latinoamericanos debido a las distintas regulaciones. Esto ha promovido la investigación para estudiar el alcance de la contaminación y comprender las propiedades del suelo y factores agronómicos relacionadas con la absorción de este metal por la planta. En Costa Rica, el 22% de las almendras de las explotaciones muestreadas superaron un umbral seleccionado de $0,80 \text{ mg Cd kg}^{-1}$, que puede restringir su venta a mercados como la Unión Europea. En Ecuador, el 40% de las muestras de almendras estudiadas mostraron una concentración de Cd superior a los $0,60 \text{ mg kg}^{-1}$, considerado como el límite máximo permitido para comercializar. En Colombia, los niveles de Cd en suelos pueden ser problemáticos en ciertas áreas, no se conoce aún a detalle los factores de transferencia a almendras u hojas de cacao. Estas altas concentraciones pueden estar relacionadas con factores de formación de suelo, específicamente la roca parental. Esto afecta directamente la concentración de Cd en suelo, el pH y COS. Es importante destacar que la realización de análisis de laboratorio sigue siendo crucial para evitar la siembra de nuevas plantaciones en áreas con altas concentraciones de Cd. Los modelos estadísticos presentados pueden ser útiles para evitar que predios contaminados con Cd sean destinados a la producción de cacao o que al menos se establezcan estrategias de mitigación al momento de la siembra.

En la mitigación, los resultados de este estudio no pudieron ser concluyentes, pero sugieren que el encalado del suelo y la zeolita podrían tener el potencial de reducir la absorción de Cd en el cacao a largo plazo en suelos ligeramente ácidos. Sin embargo, algunos autores han reportado que aumentar las dosis de las enmiendas orgánicas y combinar tratamientos como compost y carbonato de calcio, es una buena práctica para mitigar los efectos del Cd a brevedad, pero esto debe ser llevado a fincas con experimentos en distintas condiciones de suelo y clima, y con aumentos en las dosis de aplicación. Estas otras estrategias de mitigación deben ser estudiadas en ensayos de campo multianuales más completos.

La biorremediación combinada con enmiendas minerales (como la zeolita) mostró potencial para inmovilizar el Cd en el suelo, reduciendo las concentraciones iniciales entre un 16% y un 20%. Este estudio aborda por primera vez alternativas de bioremediación y propone que el uso de bacterias tolerantes a Cd en co-aplicación con enmiendas minerales puede ser una alternativa novedosa para la mitigación de Cd. A pesar de que estos resultados son preliminares y el cambio en la acumulación de Cd en las almendras de cacao aún no se ha validado, los resultados analizados con los tratamientos aplicados en fincas cacaoteras son prometedores con respecto a la reducción de Cd disponible en suelos y, por tanto, es importante su difusión para poder ser replicados en futuras investigaciones, en un espacio mayor de tiempo.

La aplicación de micronutrientes no es muy alentadora a corto o mediano plazo. Tanto en Costa Rica, como en Ecuador, la aplicación de elementos como Zn, Mn y Fe, no afectó la concentración

de Cd en la planta. Esto puede deberse a múltiples factores que se desconocen. Es muy probable que, para alcanzar una reducción significativa, los niveles de micronutrientes deban de estar en niveles cuasi tóxicos para las plantas. Estos niveles han sido estudiados en lechuga, arroz y otros cultivos, pero no en cacao. La identificación de estos niveles adecuados de micronutrientes tomará mucho tiempo y deberá ser sitio específico ya que las dosis se deben de ajustar a los niveles de micronutrientes disponibles en suelo.

Es posible mitigar los niveles elevados de Cd en almendras, pero para esto es necesario una selección correcta de las estrategias a aplicar y, quizá, más de dos años desde el momento de implementación de la estrategia.

Referencias Bibliográficas

- Acierno, V. (2020). Following cocoa beans to chocolate: The search for intrinsic characteristics [PhD Thesis, Wageningen, University]. <https://doi.org/https://doi.org/10.18174/518409>
- Adams, M., Zhao, F., McGrath, S., Nicholson, F., Chambers, B., 2004. Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 532–541. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.5320>
- Allison, L.; Richards, L. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils; Soil and Water Conservative Research Branch, Agricultural Research Service: Riverdale, MD, USA, 1954
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, 605-606, 792-800. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>
- Argüello, D; E. Chavez, E; Gutierrez, E; Pittomvils, M; Dekeyrel, J; Blommaert, H; Smolders, E. (2023). Soil amendments to reduce cadmium in cacao (*Theobroma cacao* L.): A comprehensive field study in Ecuador., *Chemosphere*, Volume 324, 138318, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138318>
- Argüello, D., Montalvo, D., Blommaert, H., Chavez, E., & Smolders, E. (2020). Surface soil liming reduces cadmium uptake in cacao seedlings but subsurface uptake is enhanced. *Journal of environmental quality*, 49(5), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20123>
- Argüello, D., Chavez, E., Laurysen, F., Vanderschueren, R., Smolders, E., & Montalvo, D. (2019). Soil properties and agronomic factors affecting cadmium concentrations in cacao beans: A nationwide survey in Ecuador. *Science of the Total Environment*, 649, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.292>
- Avendaño-Arrazate, C. H. (2018). “Lacandón”: nuevo clon de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) mexicano. *Agro Productividad*, 11(9).
- Barragán, P., Macedo, M. G., & Olgún, M. T. (2017). Cadmium sorption by sodium and thiourea-modified zeolite-rich tuffs. *Journal of environmental sciences (China)*, 52, 39-48.
- Barraza, F., Moore, R. E. T., Rehkämper, M., Schreck, E., Lefeuvre, G., Kreissig, K., Coles, B. J., & Maurice, L. (2019). Cadmium isotope fractionation in the soil-cacao systems of Ecuador: A pilot field study. *RSC Advances*, 9(58), 34011–34022. <https://doi.org/10.1039/c9ra05516a>
- Barraza, F., Schreck, E., Lévêque, T., Uzu, G., López, F., Ruales, J., Prunier, J., Marquet, A., & Maurice, L. (2017). Cadmium bioaccumulation and gastric bioaccessibility in cacao: A field study in areas impacted by oil activities in Ecuador. *Environmental Pollution*, 229, 950-963. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.080>

- Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., & Larcher, R. (2016). Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>
- Blommaert, H., Aucour, A. M., Wiggerhauser, M., Moens, C., Telouk, P., Campillo, S., Beauchêne, J., Landrot, G., Testemale, D., Pin, S., Lewis, C., Umaharan, P., Smolders, E., & Sarret, G. (2022). From soil to cacao bean: Unravelling the pathways of cadmium translocation in a high Cd accumulating cultivar of *Theobroma cacao* L. *Frontiers in Plant Science*, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1055912>
- Bouyoucos, G.J. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils 1. *Agron. J.* 1962, 54, 464–465.
- Bray, R.H.; Kurtz, L.T. Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 1945, 59, 39–46.
- Bravo, I., Arboleda, Camilo., Martín, F. (2014). Efecto de la calidad de la materia orgánica asociada con el uso y manejo de suelos en la retención de cadmio, en sistemas altoandinos de Colombia. *Acta Agronómica*, 63(2), 164-174. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n2.39569>
- Bravo, D., Braissant, O., Cailleau, G., Verrecchia, E., & Junier, P. (2015). Isolation and characterization of oxalotrophic bacteria from tropical soils. *Archives of microbiology*, 197, 65-77.
- Bravo, D., Leon-Moreno, C., Martínez, C. A., Varón-Ramírez, V. M., Araujo-Carrillo, G. A., Vargas, R., Quiroga-Mateus, R., Zamora, A., & Rodríguez, E. A. G. (2021). The first national survey of cadmium in cacao farm soil in Colombia. *Agronomy*, 11(4), 761. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>
- Bravo, D.; Braissant, O. Cadmium tolerant bacteria: current trends and applications in agriculture. *Lett. Appl. Microbiol.* 2022.
- Bravo, D. Bacterial cadmium-immobilization activity measured by isothermal microcalorimetry in cacao-growing soils from Colombia. *Front. Environ. Sci.* 2022, 10, 1–12.
- Braissant, O.; Wirz, D.; Göpfert, B.; Daniels, A.U. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, 303, 1–8.
- Carrillo, K., Martínez, M., Ramírez, L., Argüello, D., & Chavez, E. (2023). Cadmium (Cd) distribution and soil-plant relationship in cacao farms in Costa Rica. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(10), 1209. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11817-2>
- Carrillo-Zenteno, M.D., de Freitas, R.C.A., Fernandes, R.B.A., Fontes, M.P.F., Jordao, C.P. (2013). Sorption of Cadmium in Some Soil Amendments for *In Situ* recovery of Contaminated Soils. *Water Air Soil Pollut.* 224:1484. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1418-8>
- Chavez, E., He, Z.L., Stoffella, P.J. Mylavarapu, R; Li, Y; Baligar, V.C. (2016). Evaluation of soil

- amendments as a remediation alternative for cadmium-contaminated soils under cacao plantations. *Environ Science and Pollution Research* Res 23, 17571–17580 <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6931-7>
- Chavez, E., He, Z. L., Stoffella, P. J., Mylavarapu, R. S., Li, Y. C., Moyano, B., & Baligar, V. C. (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- Coleman, M.V.; Thomas, D.J.D. The Structure of silicon oxide films. *Phys. Status Solidi B* 1967, 22, 593–602.
- Decreto ejecutivo N° 37757-S .2014. (Ministerio de Salud). Reglamento sobre valores guía en suelos para descontaminación de sitios afectados por emergencias ambientales y derrames. Diario oficial La Gaceta, San José, Costa Rica, 11 julio. http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?p_aram1=NRTC&nValor1=1&nValor2=75223&nValor3=93682&strTipM=TC
- El-Meihy, R. M., Abou-Aly, H. E., Tewfike, T. A., El-Alkshar, E. A., & Youssef, A. M. (2019). Characterization and identification of cadmium-tolerant bacteria isolated from contaminated regions in Egypt. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101299
- European Food Safety Authority. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal* 10(1). <https://doi:10.2903/j.efsa.2012.2551>
- FAO., 2019. Food and agriculture data, Statistic Division. <http://faostat3.fao.org/home/S>
- Fageria, N.K., Baligar, V.C., Clark, R.B. 2002. Micronutrients in crop production. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Advances in Agronomy* (77, pp.185–268). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)77015-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)77015-6)
- Furcal-Beriguete, P., & Torres-Morales, J. L. (2020). Determinación de concentraciones de cadmio en plantaciones de *Theobroma cacao* L. en Costa Rica. *Tecnología en Marcha*, 33(1), 122-137. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v33i1.5027>
- Gil, J.P.; López-Zuleta, S.; Quiroga-Mateus, R.Y.; Benavides-Erazo, J.; Chaali, N.; Bravo, D. Cadmium distribution in soils, soil litter and cacao beans: A case study from Colombia. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021, 19, 2455–2476.
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla, D., Gonzalez, V., & Schulin, R. (2018). Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>
- Grant, C.A.; Clarke, J.M.; Duguid, S.; Chaney, R.L. Selection and Breeding of Plant Cultivars to Minimize Cadmium Accumulation. (2008). *Science of the Total Environment*, 390, 301–310.
- Greathouse, D.C., Laetsch, W.M., Phinney, B.O. (1971). The shoot-growth rhythm of a tropical

- tree, *Theobroma cacao*. *American Journal of Botany*, 58(4), 281–286. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1971.tb09974.x>
- Goswami, D.; Thakker, J.N.; Dhandhukia, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent. Food Agric.* 2016, 2, 1127500.
- Hamid, Y., Tang, L., Yaseen, M., Hussain, B., Zehra, A., Aziz, M. Z., He, Z.L., Yang, X. (2018). Comparative efficacy of organic and inorganic amendments for cadmium and lead immobilization in contaminated soil under rice-wheat cropping system. *Chemosphere*. 214, 259-268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.113>
- Heaton, L., Fullen, M., Bhattacharyya, Ranjan. 2016. Critical Analysis of the van Bemmelen Conversion Factor used to Convert Soil Organic Matter Data to Soil Organic Carbon Data: Comparative Analyses in a UK Loamy Sand Soil. *Espaço Aberto*, 6(1):35-44. <https://doi.org/10.36403/espacoaberto.2016.5244>
- Hong, C.O., Gutierrez, J., Yun, S. W., Lee, Y. B., Yu, C., & Kim, P. J. (2009). Heavy metal contamination of arable soil and corn plant in the vicinity of a zinc smelting factory and stabilization by liming. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 56(2), 190–200. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9195-5>
- Hussain, B., Liu, S., & Rahman, S. (2023). Cadmium Prevalence in Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Potential Remediation Strategies. *J Soil Sci Plant Nutr*, 23, 2938–2954. <https://doi.org/J Soil Sci Plant Nutr>
- ICCO, 2023. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLIX, No.3, Cocoa year 2022/23. https://www.icco.org/wp-content/uploads/Production_QBCS-XLIX-No.-3.pdf
- Jiao, W., Chen, W., Chang, A.C and Page, A.L. 2012. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. *Environmental Pollution*, 168, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.052>
- Kabatia-Pendias, A. (2010). Trace Elements in Soils and Plants (4th ed.). *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/b10158>
- Khan, M., Ding, X., Khan, S., Brusseau, M., Khan, A., Nawab, J. (2018). The influence of various organic amendments on the bioavailability and plant uptake of cadmium present in mine-degraded soil. *Science of the Total Environment*, 636, 810-817. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.299>
- Kopittke, P., DeJonge, M., Wang, P., Mckenna, B., Lombi, E., Paterson, D. (2013). Laterally resolved speciation of arsenic in roots of wheat and rice using fluorescence-XANES imaging. *New Phytologist*, 201(4),1251–1262. <https://doi.org/10.1111/nph.12595>
- Kubier, A., Wilkin, RT., Pichler, T. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, 108, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>

- Kwawukume, P.S., Essuman, A., Jnr, P.S.K. (2014). A re-designed kiln for ashing cocoa pod husk (CPH) in cocoa growing areas of Ghana. *J. Front. Constr. Eng.* 3, 30–36.
- Lewis, C.; Lennon, A.M.; Eudoxie, G.; Umaharan, P.; Campus, A. (2018). Genetic Variation in Bioaccumulation and Partitioning of Cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 640–641, 696–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>
- Li, X., Geng, T., Shen, W., Zhang, J., Zhou, Y. (2021). Quantifying the influencing factors and multi-factor interactions affecting cadmium accumulation in limestone-derived agricultural soil using random forest (RF) approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111773. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111773>
- Liu, C., Chao, Y., Kao, C. (2013). Effect of potassium deficiency on antioxidant status and cadmium toxicity in rice seedlings. *Botanical Studies*, 54(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-2>
- López-Hernández, J. A., Ortiz-Mejía, F. N., Parada-Berríos, F. Á., Lara-Ascencio, F., & Vásquez-Osegueda, E. A. (2019). Caracterización morfoagronómica de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) y su incidencia en la selección de germoplasma promisorio en áreas de presencia natural en El Salvador. *Revista Minerva*, 31-50.
- Maddela, N. R., Kakarla, D., García, L. C., Chakraborty, S., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2020). Cocoa-laden cadmium threatens human health and cacao economy: A critical view. *Science of the Total Environment*, 720. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137645>
- MADR. (2021). Cadena de Cacao. In Dirección de cadenas agrícolas y forestales. [https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31 Cifras Sectoriales.pdf](https://sioc.minagricultura.gov.co/Cacao/Documentos/2020-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf)
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2018. Plan Nacional de Cacao 2018-2028: Hacia la consolidación de una agrocadena competitiva y sostenible. Comisión Interinstitucional del Cacao, Costa Rica.
- Marques, M., Cardoso, N.A., Guarín, A. (2002). Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. *Química Nova*. 25:1145- 1154. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000700015>
- Martínez Botello, D. H. (2015). Caracterización de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L) por su respuesta de defensa a *Moniliophthora roreri* y su polimorfismo de SSRs (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Martínez Flores, K., Arroyo, Souza, V., Ortiz, Bucio, L., Gómez Quiróz, L., & Gutiérrez Ruiz, M. (2013). Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicológica Argentina*, 21, 33–49.
- Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A., Nagy, R. (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annual review of plant biology*, 63,183–213. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105608>

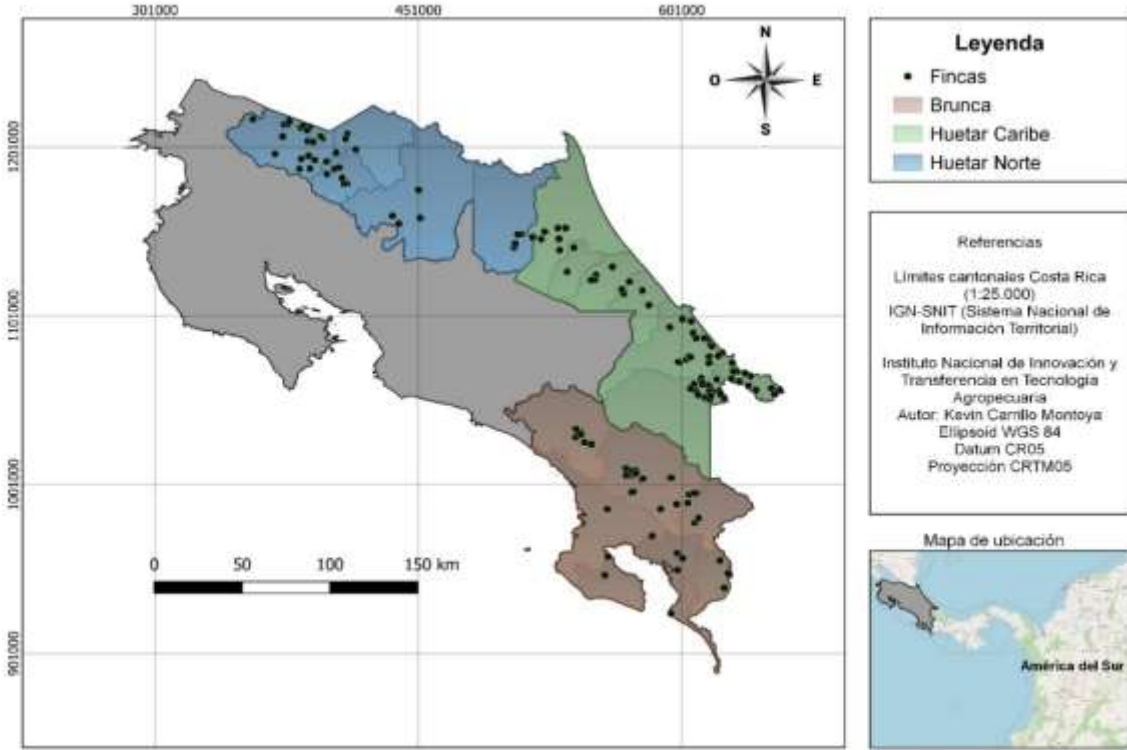
- Mason, C. H., & Perreault, W. D. (1991). Collinearity, Power, and Interpretation of Multiple Regression Analysis. *Journal of Marketing Research*, 28(3), 268-280. <https://doi.org/10.2307/3172863>
- McBride, M.B. A comparison of reliability of soil cadmium determination by standard spectrometric methods. *J. Environ. Qual.* 2011, 40, 1863–1869.
- Meter, A., Atkinson, R., & Labiberte, B. (2019). Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe: Análisis de la Investigación y Soluciones Potenciales para la Mitigación. In Bioersity International. <https://bit.ly/3wfTpY1>
- Moore, R. E., Ullah, I., de Oliveira, V.H., Hammond, S., Strekopytov, S., Tibbett, M., Dunwell, J.M., Rehkamper, M. (2020). Cadmium isotope fractionation reveals genetic variation in Cd uptake and translocation by *Theobroma cacao* and role of natural resistance-associated macrophage protein 5 and heavy metal ATPase-family transporters. *Horticulture Research*, 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0292-6>
- O'brien, R. M. (2007). A Caution Regarding Rules of Thumb for Variance Inflation Factors. *Quality & Quantity*, 41(5), 673-690. <https://doi.org/10.1007/s11135-006-9018-6>
- Oliva, M., Rubio, K., Epquin, M., Marlo, G and Leiva, S. (2020). Cadmium Uptake in Native Cacao Trees in Agricultural Lands of Bagua, Peru. *Agronomy*, 10(10),1551. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101551>
- Peech, M. Hydrogen-ion activity. *Methods Soil Anal. Part 2 Chem. Microbiol. Prop.* 1965, 9, 914–926.
- Pratt, P.; Bair, F. A comparison of three reagents for the extraction of aluminum from soils. *Soil Sci.* 1961, 91, 357–359.
- PROECUADOR. (2013). Análisis del sector Cacao y elaborados. Quito: Instituto de promoción de exportaciones e inversiones.
- Quintana-Fuentes, L. F., García-Jerez, Alberto., & Moreno-Martínez, E. D. I. T. H. Perfil sensorial de cuatro modelos de siembra de cacao en Colombia. *Entramado*, v. 14, n. 2, 2018.
- Quintero R, María Liliana, & Díaz Morales, Katty Marisabel. (2004). El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*, 9(18), 47-59.
- Quiroga-Mateus, R., López-Zuleta, S., Chávez, E., & Bravo, D. (2022). Cadmium-tolerant bacteria in cacao farms from Antioquia, Colombia: Isolation, characterization and potential use to mitigate cadmium contamination. *Processes*, 10(8), 1457.
- Ramtahal, G., Umaharan, P., Hanuman, A., Davis, C., & Ali, L. (2019). The effectiveness of soil amendments, biochar and lime, in mitigating cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* L. *Science of the Total Environment*, 693, 133563. <https://doi.org/10.1016/.scitotenv.2019.07.369>

- Samet H., Çikili, Y., Atikmen, N. (2017). Role of Potassium in Alleviation of Cadmium Toxicity in Sunflower *Helianthus annuus* L. Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University, 34(1), 179-188. <https://doi.org/10.13002/jafag4197>
- Santana, J. O., Gramacho, K. P., de Souza Eduvirgens Ferreira, K. T., Rezende, R. P., Mangabeira, P. A. O., Dias, R. P. M., ... & Pirovani, C. P. (2018). Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo. BMC microbiology, 18(1), 1-10.
- SAS Institute INC. (2021). JMP Pro, versión 16.2.0. https://www.jmp.com/de_de/software/predictive-analytics-software.html
- SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2017. Análisis de la actividad cacaotera costarricense y perspectivas de su reactivación, San José, Costa Rica.
- Shaheen, S. M., Rinklebe, J., & Selim, M. H. (2015). Impact of various amendments on immobilization and phytoavailability of nickel and zinc in a contaminated floodplain soil. International Journal of Environmental Science and Technology, 12(9), 2765–2776. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0713-x>
- Shuman, L.; Duncan, R. Soil exchangeable cations and aluminum measured by ammonium chloride, potassium chloride, and ammonium acetate. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 1990, 21, 1217–1228.
- Smolders, E., & Mertens, J. (2013). Cadmium. In B. J. Alloway (Ed.), Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability (pp. 283-311). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7_10
- Tajudin, S. A. A., Azmi, M. A. M., & Nabila, A. T. A. (2016). Stabilization/Solidification Remediation Method for Contaminated Soil: A Review. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 136(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/136/1/012043>
- Tang, L., Qiu, R., Tang, Y., Wang, S., 2014. Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: a mini review. Metallomics, 6(8),1313-1323. <http://dx.doi.org/10.1039/c4mt00080c>
- Thomas, E., Atkinson, R., Zavaleta, D., Rodriguez, C., Lastra, S., Yovera, F., Arango, K., Pezo, A., Aguilar, J., Tames, M., Ramos, A., Cruz, W., Cosme, R., Espinoza, E., Rosa Chavez, C., Ladd, B. (2023). The distribution of cadmium in soil and cacao beans in Peru. Science of The Total Environment, 881,163372. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163372>
- Tkalec, M., Štefanić, P., Cvjetko, P., Šikić, S., Pavlica, M., Balen, B. (2014). The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. PloS ONE, 9(1), e87582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087582>
- Ur Rahman S, Xuebin Q, Riaz L, Yasin G, Noor Shah A, et al. (2021). The interactive effect of pH variation and cadmium stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth, physiological and

- biochemical parameters. *PLoS ONE*, 16(7): e0253798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253798>
- Vanderschueren, R., Argüello, D., Blommaert, H., Montalvo, D., Barraza, F., Maurice, L., Schreck, E., Schulin, R., Lewis, C., Vazquez, J. L., Umaharan, P., Chavez, E., Sarret, G., & Smolders, E. (2021). Mitigating the level of cadmium in cacao products: Reviewing the transfer of cadmium from soil to chocolate bar. *Science of the Total Environment*, 781, 146779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146779>
- Vanderschueren, R., Montalvo, D., De Ketelaere, B., Delcour, J. A., & Smolders, E. (2019). The elemental composition of chocolates is related to cacao content and origin: A multi-element fingerprinting analysis of single origin chocolates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 83, 103277. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103277>
- Villamizar Jaimes, Y. L., Rodríguez Guerrero, J. S., & León Castrillo, L. C. (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. *Revista Activa Tecnológico De Antioquia*, 9(9 (2017)), 65-75.
- Wade, J., Ac-Pangan, M., Favoretto, V. R., Taylor, A. J., Engeseth, N., & Margenot, A. J. (2022). Drivers of cadmium accumulation in *Theobroma cacao* L. beans: A quantitative synthesis of soil-plant relationships across the Cacao Belt. *Plos ONE*, 17(2), e0261989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261989>
- Wen, Y., Li, W., Yang, Z., Zhang, Q., Ji, J. (2020). Enrichment and source identification of Cd and other heavy metals in soils with high geochemical background in the karst region, Southwestern China. *Chemosphere*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125620>
- Wieczorek, J., Baran, A., Urbański, K., Mazurek, R., & Klimowicz-Pawlas, A. (2018). Assessment of the pollution and ecological risk of lead and cadmium in soils. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(6), 2325–2342. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0100-5>
- Yao, J.; Xu, C.; Wang, F.; Tian, L.; Wang, Y.; Chen, H.; Yong, Z.; Choi, M.M.F.; Bramanti, E.; Maskow, T. An in vitro microcalorimetric method for studying the toxic effect of cadmium on microbial activity of an agricultural soil. *Ecotoxicology* 2007, 16, 503–509.
- Zug, K. L. M., Huamaní Yupanqui, H. A., Meyberg, F., Cierjacks, J. S., & Cierjacks, A. (2019). Cadmium Accumulation in Peruvian Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Opportunities for Mitigation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(3), 72. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4109-x>

Anexo

Anexo 1. Distribución de las fincas muestreadas en las tres principales regiones productoras de cacao



Anexo 2. Material genético de las fincas de investigación para la mitigación del cadmio en Colombia

Tabla 11. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca A. Modificado de Martínez Botello, 2015; Quintana Fuentes et al., 2018

Clon	País origen	Pedigrí	Rendimiento [kg·ha⁻¹·año⁻¹]	Índice mazorca	Compatibilidad
TCS01	Colombia	Híbrido trinitario	3300*	14	Autocompatible
TCS06	Colombia	Híbrido	2000*	12	Auto-incompatible
TCS13	Colombia	Híbrido	1500*	14	Autocompatible
TCS19	Colombia	Híbrido	1800*	16	Autocompatible
CCN51	Ecuador	ICS 95×IMC 67	1441*	15	Autocompatible

* Valores de referencia para el departamento de Santander

Tabla 12. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca B. Modificado de Martínez Botello, 2015; Quintana Fuentes et al., 2018

Clon	País origen	Pedigrí	Rendimiento [kg·ha⁻¹·año⁻¹]	Índice mazorca	Compatibilidad
FSV41	Colombia	Híbrido trinitario	1474*	13	Autocompatible
FSV155	Colombia	Criollo × desconocido	450*	25	Autocompatible
FCH8	Colombia	Criollo	1400**	16	Autocompatible
FTA2	Colombia	Híbrido trinitario	1837*	15	Autocompatible
CCN51	Ecuador	ICS 95 × IMC 67	1441*	15	Autocompatible

* Valores de referencia para el departamento de Santander

** Valor de referencia para el departamento de Antioquia

Tabla 13. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca C. Modificado de Quintana Fuentes et al., 2018

Clon	País de origen	Pedigrí	Rendimiento [kg·ha ⁻¹ ·año ⁻¹]	Índice de mazorca	Compatibilidad
FSV41	Colombia	Híbrido trinitario	1474*	13	Autocompatible
BETULIA 8	Colombia	Criollo	3264***	18	Autocompatible
BETULIA 18	Desconocido**	Desconocido**	Desconocido**	24	Autocompatible
BETULIA 19	Desconocido**	Desconocido**	Desconocido**	22	Autocompatible

* Valores de referencia para el departamento de Santander

*** Los materiales se encuentran en estudio actualmente por parte del productor por tanto al momento de realizar esta publicación no se cuenta con dicha información

*** Valor estimado en base al rendimiento suministrado por el productor de 4kg/Árbol, se proyectó para una densidad de siembra de 3,5m x 3,5m

Tabla 14. Principales atributos agronómicos de materiales evaluados en la Finca D. Modificado de Quintana Fuentes et al., 2018

Clon	País de origen	Pedigrí	Rendimiento [kg·ha ⁻¹ ·año ⁻¹]	Índice de mazorca	Compatibilidad
ICS95	Trinidad	Híbrido trinitario × criollo	902*	20	Autocompatible
CCN51	Ecuador	ICS 95 × IMC 67	1441*	15	Autocompatible

* Valores de referencia para el departamento de Santander

Anexo 3. Proceso de caracterización y multiplicación de microorganismos locales para aplicaciones en campo

- i. la primera consistió en la identificación de poblaciones de bacterias tolerantes a cadmio - CdtB potencialmente viables. Los aislamientos de bacterias tolerantes a cadmio – CdtB, fueron obtenidos a partir de muestras de suelo tomadas entre 20 - 41 cm de profundidad, en fincas cacaoteras del departamento de Antioquia, aplicando las metodologías descritas en un estudio previo (Bravo et al., 2018). El proceso de aislamiento de CdtB estuvo dividido en dos partes, la primera consistió en una fermentación, donde una porción del suelo colectado se dispuso en medio Mergeay (Tris HCl 50mM 6 mL L⁻¹, NaCl 80mM 5 mL L⁻¹, KCl 20mM 2 mL L⁻¹, NH₄Cl 20mM 1 mL L⁻¹, NaSO₄ 3mM 0,43 mL L⁻¹, MgCl₂ 1 mM 1 mL L⁻¹, CaCl₂ 0,03 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 2 g.L⁻¹, Glucosa 2%) suplementado hasta 12 mg L⁻¹ de cloruro de cadmio (CdCl₂). Por 12 días el suelo en caldo Mergeay fue dejado a una temperatura de 28°C y 120 rpm. En la segunda parte, se prepararon cajas de Petri con medio sólido Mergeay suplementado con la concentración de Cd adicionada en el paso 1. Se realizó siembra de una dilución 10⁻² de cada suelo diluido en la solución con Mergeay. Las siembras se incubaron a 28°C por 5 días. Las cajas que presentaron crecimiento uniforme con morfologías asociadas a bacterias se replicaron hasta 6 veces en medio fresco Mergeay, hasta obtener cultivos puros para posterior caracterización.

Los aislamientos de bacterias tipo CdtB, se caracterizaron a través de microcalorimetría isotérmica (IMC) y capacidad de inmovilización de Cdo. Para el caso de IMC se utilizó un equipo TAM Air de 8 canales (TA Instruments, Delaware, US), disponible en el laboratorio de Microbiología Agrícola de C.I. Tibaitatá, de Agrosavia, ubicado en Mosquera, Cundinamarca. Para la evaluación en el microcalorímetro, todas las cepas aisladas se pre-incubaron en ampollitas de vidrio de 20 mL de capacidad volumétrica, suplidos con 7 mL de medio sólido Mergeay suplementado con una solución de CdCl₂ ajustada a una concentración final de 6 mg L⁻¹. Una vez con crecimiento de 24 h, a partir de los cultivos en caja de Petri, se administró una concentración de 100 µL de cada cepa diluida en buffer EDTA, ajustados a una OD de 0.5, y transferidas con pipeta electrónica de 1 mL para evitar errores de concentración y volumen al momento de inocular las ampollitas de vidrio alistadas previamente con caldo Mergeay (Bravo et al., 2018). Las muestras se instalaron en el calorímetro usando los dispositivos administradores de ampollitas Admix Ampoules (TA Instruments, con motor de 115/320 V, Delaware US). Este acople se realizó con el fin de homogeneizar la mezcla entre los medios de Mergeay y el inóculo bacteriano durante todo el tiempo de experimentación.

La capacidad de inmovilizar Cd por bacterias aisladas se midió en sobrenadantes de medio de cultivo mediante fermentación en Erlenmeyer. El proceso se dividió en tres

partes. Primero, las bacterias aisladas y el control negativo y positivo (*E. coli* K12 DSM498 y *Cupriavidus taiwanensis* DSM 17343) se cultivaron en medio LB a 28 °C y 120 rpm hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se tomó una alícuota de cada cultivo y se centrifugó. El sedimento se resuspendió en agua destilada estéril para obtener una suspensión celular de 1×10^8 UFC mL⁻¹ ajustada por densidad óptica (OD) a 600 nm en el espectrofotómetro UV/Vis. El segundo paso consistió en inocular los matraces Erlenmeyer previamente preparados con 20 mL de medio Mergeay. El volumen de inóculo agregado por matraz Erlenmeyer se llevó a una concentración final de 1×10^7 UFC mL⁻¹. Esto se realizó por triplicado para cada cepa bacteriana evaluada en el medio de cultivo con y sin Cd. El medio se ajustó a una concentración final de 6 mg L⁻¹ de CdCl₂ y se evaluó durante 12 días a 28 °C en 120 rpm de agitación constante. El paso final consistió en la cuantificación de la concentración de Cd, donde 12 mL de medio se centrifugaron durante 20 min a 4600 rpm y 10 mL del sobrenadante se digirieron según el protocolo estandarizado en el laboratorio de química analítica (CI Tibaitatá, en Mosquera, Colombia). La cuantificación se realizó mediante el ICP-OES. Las muestras se analizaron en tres intervalos de tiempo: 0, 6 y 12 d. La eficiencia de la digestión se controló en términos del porcentaje de recuperación de un material de referencia. El material de referencia fue IPE 907 *Spinacia oleracea* (Wepal, Wageningen, Países Bajos). El límite de detección de las muestras fue de 0,5 µL L⁻¹ y el límite de cuantificación fue de 6 µg kg⁻¹.

ii. *Caracterización de parámetros fisicoquímicos y cuantificación de cadmio en muestras de suelo:*

Para cuantificar el cadmio pseudototal en el suelo, las muestras se secaron a 40 °C en una estufa y luego se pulverizaron y tamizaron a través de un tamiz de 0.5 mm. Se mineralizó un gramo de suelo seco y molido utilizando una solución de ácido nítrico (HNO₃) -ácido clorhídrico (HCl) (7:1 V/V) en un digestor de microondas (Milestone UltraWAVE, Sorisole, Bérgamo, Italia) siguiendo el método EPA 3051 (Element, C. A. S. 2007). La concentración de cadmio se midió utilizando un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (McBride, M. B. (2011) (Thermo Scientific ICAP 6500, Waltham, MA, EE. UU.). El pH del suelo se determinó por el método potenciométrico, siguiendo una metodología previa (Peech, M., 1965) en una solución suelo-agua (1:2,5 W/V). La conductividad eléctrica (CE) se determinó mediante el método propuesto en otro lugar (Allison & Richards, 1954) en una solución de suelo y agua desionizada (relación 1:5,0 W/V). El contenido de materia orgánica (MOS) se cuantificó utilizando dicromato de potasio y ácido sulfúrico para la mineralización, donde el contenido de carbono (C) se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25, Waltham, MA, EE. UU.). Así, la MOS se obtuvo multiplicando la C por 1,72 (factor de Van Bemmelen).

Además, Ca^{2+} , K^{+} y Mg^{2+} se extrajeron utilizando una solución de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1 M a pH 7,0 (Shuman & Duncan, 1990). Los elementos extraídos se cuantificaron mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) (Agilent 280FS AA, Santa Clara, CA, EE. UU.). La capacidad efectiva de intercambio catiónico (CIC) se calculó como el producto de la suma de los cationes. La acidez (Al+H) se determinó mediante un método estándar (Coleman & Thomas, 1967) utilizando un valorador automático T90 (Mettler Toledo, Columbus, OH, EE. UU.) en un extracto de suelo obtenido después de la titulación del suelo en una solución de cloruro de potasio (KCl) con 0,01 M hidróxido de sodio (NaOH). El contenido de Al fue determinado por AAS (Pratt & Bair, 1961). El contenido de fósforo (P) se determinó mediante la reducción del ácido ascórbico utilizando el método Bray II (Bray & Kurtz, 1945). La cuantificación de P se realizó mediante espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 887 nm. La determinación de la textura se realizó utilizando el método estandarizado de Bouyoucos (Bouyoucos, GJ., 1962).

Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org