



Vigilada Mineducación

EVALUACIÓN DE BACTERIAS CADMIO TOLERANTES AISLADAS A PARTIR DE
SUELOS PROVENIENTES DE UNA FINCA CACAOTERA DEL URABÁ
ANTIOQUEÑO.

VALENTINA TOVAR VÉLEZ.
CLAUDIA JARAMILLO MAZO.
JAVIER CORREA ÁLVAREZ.

Tesis de pregrado

Asesora:

Claudia Jaramillo Mazo

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE CIENCIAS
BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2021

Evaluación de bacterias cadmio tolerantes aisladas a partir de muestras de suelo provenientes de una finca cacaotera del Urabá antioqueño.

Valentina Tovar-Vélez ¹, Claudia Jaramillo-Mazo ¹, Javier Correa Álvarez ¹.

¹ Grupo de Investigación de Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP). Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Resumen.

La presencia de cadmio (Cd) en suelos de cultivos cacaoteros representa una amenaza para la salud pública al ser absorbido por la planta de cacao y llegar a la cadena alimenticia a través del consumo directo del grano o sus productos derivados. La identificación y el estudio de microorganismos cadmio-tolerantes que habitan naturalmente en los suelos contaminados proporciona un aporte para el desarrollo de estrategias biotecnológicas y competitivas para limitar la transferencia trófica del metal pesado. En este trabajo, setenta y tres morfotipos bacterianos provenientes de muestras de suelo rizosférico de una finca cacaotera ubicada en el Urabá antioqueño con presencia de Cd, fueron aislados y purificados. Posteriormente fueron criopreservadas e incluidos en el cepario del Laboratorio de Biología Animal y Vegetal de la Universidad EAFIT. Cinco de los morfotipos aislados (VT012, VT018, VT019, VT021 y VT051) fueron seleccionados e identificados molecularmente a través del gen 16s rRNA. El análisis de las secuencias genéticas coincidió con las especies *Bacillus cereus* y *Priestia aryabhatthai*, siendo el primer reporte de la especie *Priestia aryabhatthai* en suelos cacaoteros de Colombia. Adicionalmente, se realizó una evaluación de la dinámica de crecimiento de los cinco morfotipos bacterianos a 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL de Cd, el cual mostró que todos los morfotipos fueron capaces de crecer en presencia de las concentraciones de Cd evaluadas. Siendo los morfotipos VT018 y VT051 de *P. aryabhatthai* y *B. cereus* respectivamente, los que mostraron la menor afectación en su crecimiento en presencia del metal.

Palabras clave: Cadmio, cacao, bacterias cadmio-tolerantes, tasa de crecimiento.

1. Introducción.

Los recursos minerales y metales del suelo desempeñan un rol importante en la socioeconomía mundial y la agricultura (Dubiński, 2013). No obstante, aunque se encuentren de manera habitual en los suelos, derivado de procesos naturales como la erosión, meteorización de rocas, erupciones volcánicas e incendios forestales (Bradl, 2005), la extracción y el uso de estos en prácticas agrícolas e industriales causan graves contingencias ambientales, especialmente en términos de contaminación de aguas y suelos por metales pesados (Singh & Steinnes, 2020). Debido a la toxicidad y persistencia de dichos metales en el ecosistema, éstos son una amenaza potencial para la salud humana y el ambiente (Shahid et al., 2017). Metales pesados como el zinc, cromo, hierro, magnesio, cobre y níquel, son

necesarios como micronutrientes en los organismos vivos. Sin embargo, pueden generar efectos nocivos a altas concentraciones (Alloway, 2013). Otros metales pesados como el cadmio (Cd) reciben gran atención en la ciencia de suelos ya que no cumplen ninguna función biológica en los organismos vivos y pueden llegar a ser absorbidos por cultivos de interés agronómico, afectando su rendimiento y llegando a la cadena alimenticia a través del consumo directo de las plantas contaminadas o sus derivados (frutos, semillas o la mezcla de estos con otros componentes para generar un producto final) (Tran & Popova, 2013; Page & Feller, 2015). Esto puede afectar la salud humana bajo una frecuencia de consumo al acumularse en el cuerpo y ocasionar un efecto adverso en órganos como los riñones y los huesos (Eriksson & Skerfving, 2005; Food & Authority, 2012; Oskarsson et al., 2004). El cadmio no es biodegradable y puede sufrir cambios químicos al interactuar con diferentes propiedades del suelo como el pH, la materia orgánica disponible y los microorganismos, lo que determinará su acumulación, movilidad y biodisponibilidad hacia otros componentes del ecosistema (Borsari, 2011, 2014).

La presencia de cadmio en frutos y granos de alto interés agronómico, por efecto de la traslocación desde el suelo hasta las diferentes partes de la planta, despierta una gran preocupación en el sector agrícola, pues su acumulación podría afectar la venta y comercialización de derivados vegetales para el consumo humano (Santos et al., 2010). Uno de los productos mayormente afectados es el grano de cacao proveniente de la planta *Theobroma cacao L* (Gramlich et al., 2017; Ramtahal et al., 2016), del cual se deriva uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, el chocolate. Para el año 2019 el cultivo contó con una producción de 5.59 millones de toneladas de mazorcas a nivel mundial (Faostat, 2021), donde Colombia aportó a dicha producción con un total de 59708 toneladas de mazorcas y un aproximado de 175000 hectáreas sembradas a lo largo del territorio nacional (Fedecacao, 2019). En el país existe una presión creciente de aumentar el rendimiento en la producción de cacao debido a que es uno de los cultivos más representativos a nivel nacional, y por su potencial para sustituir cultivos ilícitos en zonas rurales (Abbott et al., 2018). Sin embargo, se ha detectado la presencia de cadmio en suelos cacaoteros a concentraciones que oscilan entre 1 y 10 mg/Kg (Daniel Bravo et al., 2021), lo que podría impactar negativamente la economía de los productores y la salud de los consumidores.

Debido a que la ingesta de Cd en pequeñas cantidades por los humanos es inevitable, ya que los productos agrícolas son la fuente principal de su consumo (Ramtahal et al., 2016), se han planteado estrategias para disminuir su absorción por parte de las plantas, siendo una de ellas el uso de bacterias que están presentes naturalmente en los suelos contaminados (Beltrán Pineda & Gómez, 2016) y que puedan tener algún potencial de bioremediación sobre los suelos cacaoteros. El uso de bacterias se justifica debido a que son los microorganismos más abundantes del suelo y cumplen un rol fundamental en la nutrición de las plantas al determinar la biodisponibilidad y la transformación de nutrientes esenciales y otros compuestos para que puedan ser asimilados por la materia vegetal (Hayat et al., 2010; Jacoby et al., 2017; Lladó et al., 2017). Entre las funciones realizadas por las bacterias habitantes del suelo están: la fijación de nitrógeno y carbono, la descomposición de la materia orgánica, y la solubilización de compuestos inorgánicos (Jacoby et al., 2017). Más allá de ser

imprescindibles para el desarrollo y crecimiento de las plantas, las bacterias poseen la habilidad de adaptarse a factores de estrés como la presencia de metales pesados en el suelo donde habitan, a través de mecanismos como la bioacumulación y la biotransformación. Dichos mecanismos se refieren a la capacidad bacteriana de unir los iones metálicos a la pared celular o de transportarlos a su interior, donde pueden ser retenidos o modificados a compuestos insolubles (Beltrán Pineda & Gómez, 2016; Gadd, 2010; Nies & Silver, 1995). Como resultado se limita la biodisponibilidad de los metales para ser absorbidos por las plantas. Por esto, el conocimiento y la caracterización de las comunidades bacterianas que habitan naturalmente en los suelos de los cultivos afectados, es fundamental para comprender su rol ecológico en la interacción con el cadmio y detectar aquellas que posean potencial cadmio tolerante, de tal manera que se genere un aporte para el desarrollo de estrategias que limiten la transferencia trófica de cadmio (Paul et al., 2005).

En Colombia, se ha reportado el aislamiento de bacterias cadmio tolerantes de los géneros *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., y *Pseudomonas* sp. a partir de suelos cacaoteros con presencia de Cd provenientes de los departamentos de Arauca, Boyacá, Cundinamarca y Santander (D. Bravo et al., 2018; Cordoba-novoa et al., 2021). Antioquia, a pesar de ser el segundo departamento en aportar a la producción de cacao nacional, por debajo de Santander, no cuenta con registros suficientes de concentración de cadmio en suelos de fincas cacaoteras comparado con departamentos como Tolima, Huila y Meta (Fedecacao, 2019; Daniel Bravo et al., 2021). Además, el conocimiento de la diversidad taxonómica de bacterias cultivables asociadas a este cultivo y sus mecanismos fisiológicos de tolerancia al Cd son escasos.

En este trabajo se aislaron bacterias cultivables provenientes de seis muestras de suelo de una finca cacaotera en el Urabá antioqueño con presencia de Cd, y se evaluó su tolerancia al metal a través del seguimiento de la tasa de crecimiento a 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L de cadmio por tres días consecutivos con el fin de determinar cuál tiene el mayor potencial cadmio tolerante dentro del rango de concentraciones evaluadas.

2. Metodología.

2.1 Procesamiento de muestras de suelo y aislamiento de bacterias cultivables.

Se procesaron un total de seis muestras de suelo rizosférico proveniente de una finca cacaotera del Urabá Antioqueño con concentraciones de Cd que oscilan entre 1 y 2.2 mg/Kg de suelo. Cada una de las muestras fue tomada a una profundidad promedio de 30 cm de la zona rizosférica de las plantas de cacao. Las muestras fueron codificadas como S01, S02, S03, S04, S05 y S06 y las respectivas concentraciones de cadmio natural para cada una (2.2 mg/kg, 1.69 mg/kg, 2.16 mg/kg, 1.63 mg/kg, 1.70 mg/kg y 1.71 mg/kg respectivamente) fueron proporcionadas por el programa de Tecnologías convergentes en Cacao como parte de sus resultados preliminares. Con respecto a los clones de cacao, las muestras S01 y S03 provienen del suelo rizosférico del clon LK40, las S02 y S06 del clon TSH565 y las muestras S04 y S05 del clon ICS39.

De cada muestra de suelo se pesaron 5 gramos, los cuales fueron macerados hasta obtener una consistencia homogénea. Posteriormente, las cantidades pesadas y maceradas de cada muestra se diluyeron por separado en 45 mL de agua destilada estéril y se agitaron a 200 rpm durante media hora para completar la dilución y desprender los microorganismos de las partículas de suelo.

Posteriormente, de cada solución madre se tomó 1 mL y se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-3} . Se sembraron 100 μ L de la dilución seleccionada por triplicado en cajas de Petri con medio Luria Broth (LB) suplementado con 0.5 mg/mL y 1 mg/mL de Cd, para un total de 6 inoculaciones por muestra de suelo. Como control de viabilidad del medio se inoculó *E. coli* en medio LB sin suplementación de cadmio y como control negativo se dejó una caja de medio para cada concentración del metal sin ningún inóculo. Las muestras se incubaron a 30°C por un máximo de 48 horas hasta observar crecimiento bacteriano.

2.2 Conteo y descripción morfológica de bacterias cultivables.

La concentración de 0.5 mg/mL escogida para el aislamiento se seleccionó con el fin de recoger una muestra amplia de la diversidad de morfotipos bacterianos cultivables del suelo. También se usó la concentración más alta de 1 mg/mL para ver si variaba la cantidad de dichos morfotipos ante condiciones ambientales más selectivas.

Una vez que se observó crecimiento bacteriano en las cajas de Petri con la dilución inoculada, se realizó un registro de la cantidad de morfotipos por caja, que se clasificaron teniendo en cuenta los siguientes criterios: bordes, color, elevación, opacidad y textura de la superficie. Esta información permitió identificar cuáles eran las morfologías que se repetían y cuál era la proporción en la que se encontraban dentro de cada muestra de suelo. La información obtenida fue debidamente registrada para análisis estadísticos.

2.3 Purificación y criopreservación de bacterias cultivables.

Luego del conteo y la descripción morfológica, cada colonia se inoculó por separado en cajas Petri con medio LB suplementado con 0.5 mg/mL de cadmio, con la finalidad de obtener colonias puras que permitieran la posterior criopreservación de las mismas. Paso seguido, se realizaron tinciones de Gram para verificar la pureza de cada uno de los morfotipos aislados y caracterizar por medio de la membrana si las células bacterianas eran Gram positivas o Gram negativas.

Para el proceso de criopreservación, cada colonia purificada se inoculó en 10 mL de caldo BHI y se incubó a 30°C por 48 horas. Posteriormente, a cada inóculo se le adicionaron 1.3 mL de glicerol estéril al 40% y 2 mL de Skin Milk estéril al 15% (Cody et al., 2008). Luego, se dispuso de a 1 mL de la mezcla en tubos Eppendorf de 1.5 mL hasta completar cinco replicas por cada morfotipo purificado y se almacenaron en una caja de criopreservación a -80°C en el Laboratorio de Biología Animal y Vegetal de la Universidad EAFIT.

2.4 Identificación molecular de los morfotipos bacterianos seleccionados a través del gen marcador 16s rRNA.

Se seleccionaron cinco morfotipos presentes y predominantes entre las muestras de suelo procesadas y se reactivaron a partir de los tubos de criopreservación sembrando 500 μ L de cada uno en 10 mL de LB por duplicado. Adicionalmente, se hizo una siembra de cada aislado en cajas de Petri con medio LB suplementado con 0.5 mg/mL de cadmio para corroborar que las morfologías coincidieran con la descripción inicial al momento de aislarlos y no tuvieran presencia de contaminantes, paso seguido se incubaron a 30°C por 48 horas.

Los morfotipos VT012 y VT051 se seleccionaron debido a su prevalencia en las seis muestras de suelo rizosférico. El morfotipo VT018, estuvo presente en las muestras S02, S03, S04 y S06; el morfotipo VT019 fue hallado en las muestras S01, S02 y S06. Por último, el morfotipo VT022 estuvo presente en las muestras S01 y S03. La Figura 3 muestra las imágenes correspondientes a cada morfotipo bacteriano seleccionado.

Se realizó extracción de DNA genómico a cada una de las cepas seleccionadas basado en el método fenol cloroformo descrito por Michael R. Green & Joseph Sambrook en 2012 con algunas modificaciones (Green & Sambrook, 2012). El DNA obtenido se analizó en NanoDrop para determinar la concentración en ng/ μ L y observar la pureza a través de la relación 260/280. Adicionalmente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar la integridad del material genético obtenido.

Una vez se obtuvo el material genético se procedió con una PCR para amplificar el gen marcador ribosomal bacteriano 16S rRNA usando los primers universales 8F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') y 1492R (5- CGGTTACCTTGTTACGA CTT – 3') y continuar con la identificación molecular a través de la secuenciación Sanger. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos del NCBI a través de la herramienta BLAST.

2.5 Evaluación del crecimiento de los morfotipos bacterianos seleccionadas en presencia de diferentes concentraciones de cadmio.

Con la finalidad de determinar la capacidad que tenían los morfotipos bacterianos para tolerar mayores concentraciones de cadmio, se procedió a evaluar el crecimiento de cada uno de ellos por tres días consecutivos a 2, 4, 6, 8 y 10 mg/L de Cd. Se eligió este intervalo de concentraciones de Cd debido a que en Bravo et al, 2021 reportaron que estos valores correspondían a concentraciones halladas en un amplio rango de fincas cacaoteras dentro del territorio nacional.

La evaluación del crecimiento bacteriano se realizó a través de la medición de la densidad óptica a 595.0 nm en platos para cultivo celular de 96 pozos para cada uno de los morfotipos seleccionados, siendo un total de cinco platos. Para el desarrollo del experimento, se reactivó

cada morfotipo inoculando 500 μ L de un tubo de criopreservación en 10 mL de medio LB, y se incubaron a 30°C por 24 horas A 150 rpm. Posteriormente se tomaron 2.5 mL de los morfotipos previamente reactivados y se inocularon en 50 mL de medio LB. Inmediatamente después del inóculo se tomó 1mL, el cual se dispuso en una cubeta y se midió la densidad óptica a 600 nm en el espectrofotómetro (Thermo Genesys 180). Las mediciones se continuaron cada media hora hasta alcanzar una OD de 0,8 para cada morfotipo. Una vez se alcanzó la densidad óptica mencionada se utilizaron estos inóculos bacterianos para proceder con el montaje e inoculación en los platos de 96 pozos. La plantilla del diseño experimental que se utilizó en los platos de cultivo celular se ilustra en la Figura 1.

	A (LB sin Cadmio)	B (LB + 2mg/mL Cadmio)	C (LB + 4mg/mL Cadmio)	D (LB + 6mg/mL Cadmio)	E (LB+8mg/mL Cadmio)	F (LB+10mg/mL Cadmio)	G (LB + Bacteria)	H (LB + Bacteria + 2mg/mL Cadmio)	I (LB + Bacteria + 4mg/mL Cadmio)	J (LB + Bacteria + 6mg/mL Cadmio)	K (LB + Bacteria + 8mg/mL Cadmio)	L (LB + Bacteria + 10mg/mL Cadmio)
1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 1. Esquema de los tratamientos y su distribución en los platos ELISA de 96 pozos. El nombre de cada columna indica el tratamiento que se dispuso en los ocho pozos que la componen.

Las primeras seis columnas del plato no contaron con inóculo bacteriano y se dispusieron de la siguiente manera: La primera columna se llenó con 200 μ L de medio LB sin suplementación de Cd, las columnas siguientes fueron llenadas con 200 μ L de medio LB suplementado con las distintas concentraciones de Cd propuestas y funcionaron como blancos de lectura. Las seis columnas restantes se llenaron en el mismo orden mencionado para los medios sin inóculo, con un volumen de 150 μ L, el cual fue completado con la adición de 50 μ L de inóculo bacteriano, con el objetivo de que todos los morfotipos comenzaran el crecimiento con una absorbancia de 0.2 (D. Bravo et al., 2018). El volumen final de todos los pozos de plato fue de 200 μ L y cada tratamiento contó con un total de ocho replicas. Los cinco platos se incubaron a 30°C y 70 rpm. La densidad óptica se midió en el espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader desde el tiempo cero para verificar la absorbancia inicial y se continuaron las mediciones cada 90 minutos por tres días

consecutivos. La ecuación de Monod (1949) fue utilizada para calcular la tasa de crecimiento bacteriano.

2.6 Análisis estadístico de resultados

Los datos colectados a partir del registro de morfotipos aislados fueron analizados por medio de una prueba no paramétrica de Wilcoxon utilizando el programa estadístico JMP. Por su parte, los cálculos de los valores de las tasas de crecimiento se obtuvieron a partir de la ecuación de Monod, 1949. Adicionalmente se realizó la prueba de permutación CGCC (Elsó et al., 2004) para comparar los valores de absorbancia entre los morfotipos sin presencia de cadmio y los tratamientos con las diferentes concentraciones del metal.

3. Resultados y discusión.

3.1 Aislamiento de bacterias cultivables presentes en las muestras de suelo.

Se obtuvo un total de 84 morfotipos bacterianos cultivables entre las seis muestras de suelo evaluadas, de los cuales pudieron ser purificados y criopreservados 73. Los demás morfotipos no pudieron ser purificados porque no lograron crecer de forma individual, por tanto, no fue posible incluirlos en el cepario. Con respecto a la caracterización con tinción de membrana, se obtuvo que 67 aislados fueron Gram positivos y 6 Gram negativos, siendo los gram positivos los más abundantes en las muestras de suelo analizadas. La cantidad de morfotipos obtenidos por muestra de suelo se ilustra en la Figura 2. Del total de morfotipos obtenidos por muestra, lograron ser purificados y criopreservados 11 para la muestra S01, 13 para la muestra S02, 9 para la muestra S03, 15 para la muestra S04, 11 para la muestra S05 y 14 para la muestra S06.

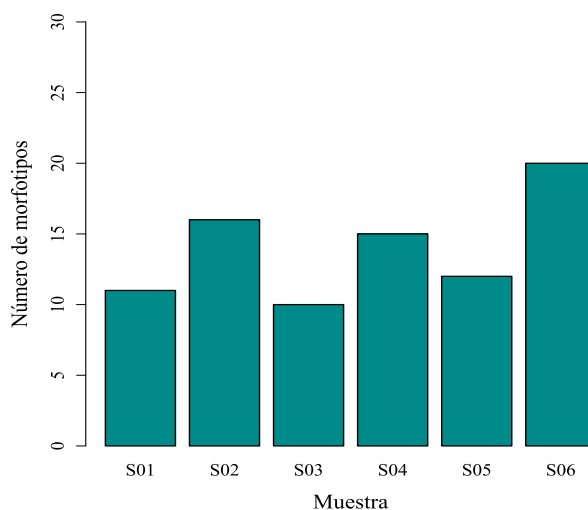


Figura 2. Cantidad de morfotipos totales presentes en cada muestra de suelo. Los morfotipos totales son la suma de los morfotipos diferentes obtenidos entre las concentraciones 0.5 y 1 mg/mL de Cd para cada muestra de suelo.

Dado que las muestras de suelo procesadas contaban con un reporte de concentración de cadmio natural, se quiso discutir si habría una mayor variabilidad de morfotipos bacterianos cultivables en aquellas muestras que de manera natural tuviesen menor concentración de cadmio, y de manera opuesta que aquellas muestras de suelo con una concentración natural de cadmio superior tendrían menor cantidad de morfotipos bacterianos cultivables. Esto debido a que se ha demostrado que el estrés generado por la presencia de metales pesados en el suelo da como resultado una disminución de la diversidad, la biomasa y la actividad bacteriana (Bååth, 1989; Roane & Pepper, 1999).

La prueba estadística Wilcoxon bajo un nivel de significancia de 0.05, permitió comparar la cantidad de morfotipos cultivables obtenidos para las réplicas de cada concentración utilizada (0.5 y 1 mg/mL), y también permitió comparar la cantidad de morfotipos cultivables entre las dos concentraciones. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre la cantidad de morfotipos cultivables creciendo a 0.5 mg/mL de Cd ($p\text{-value} = 0.2862$). Por el contrario, para las réplicas de la concentración de 1 mg/mL arrojó una diferencia significativa ($p\text{-value} = 0.0445$). Sin embargo, al comparar la cantidad de morfotipos cultivables entre ambas concentraciones, no se observó una diferencia significativa ($p\text{-value} = 0.847$), por lo que las diferencias estadísticas en la concentración de 1 mg/mL de Cd se asociaron a un error en la manipulación de las muestras en el momento de la inoculación para observar el aislamiento.

Debido a que la comparación de los morfotipos cultivables entre ambas concentraciones no arrojó una diferencia significativa, se sugiere que la concentración natural de Cd presente en las muestras de suelo no varió lo suficiente como para tener un impacto sobre la cantidad de dichos morfotipos como se ha demostrado en otros estudios (Roane & Pepper, 1999). Se debe tener en cuenta que, aunque el cadmio es el factor de selección, la capacidad microbiana para el crecimiento *in vitro* no solo se ve influenciada por la presencia del metal, sino también a factores como: 1) la cantidad de biomasa en el inóculo correspondiente a cada morfotipo bacteriano y 2) la capacidad fisiológica de las bacterias para crecer en condiciones ajenas a su ambiente natural, donde hay diferentes tipos de nutrientes, limitación de los mismos, y variación de temperatura y pH (Felske et al., 1999).

Teniendo en cuenta que las muestras de suelo usadas en este trabajo provenían de la rizosfera de clones de cacao, es importante que en futuros estudios se analice si las comunidades bacterianas cultivables asociadas a los diferentes clones varían o no. Por lo que se considera apropiado el análisis molecular de todos los morfotipos que se lograron criopreservar, para así examinar que géneros o especies bacterianas se comparten entre los clones de cacao y en qué proporción.

3.2 Identificación molecular de las morfologías bacterianas seleccionadas.

El análisis de las secuencias del gen 16s rRNA reveló que los aislados VT018, VT019 VT021 coinciden en un 100% con *Priestia aryabhatthai*. El género *Priestia* es un género nuevo que surgió luego de que se esclarecieran relaciones evolutivas entre las especies de *Bacillus*

(Gupta et al., 2020). Actualmente, el género comprende diez especies verificadas, de las cuales *Priestia aryabhatthai* y *Priestia megateriums* han sido previamente caracterizadas como tolerantes a metales pesados, entre ellos el cadmio. En un estudio realizado sobre *Priestia aryabhatthai* se evidenció una tasa de bioacumulación de cadmio del 41.1% a una concentración de 800 mg/mL de Cd²⁺ (Liu et al., 2019). Por otro lado, para *Priestia megateriums*, se observó un 43.11% del Cd²⁺ adsorbido intracelularmente y una tolerancia al metal a 14 mg/mL (Chi et al., 2020), además, otro estudio reveló que la cepa denominada como A14 de esta especie contrarrestó la acumulación de Cd en maní (Yao et al., 2021).

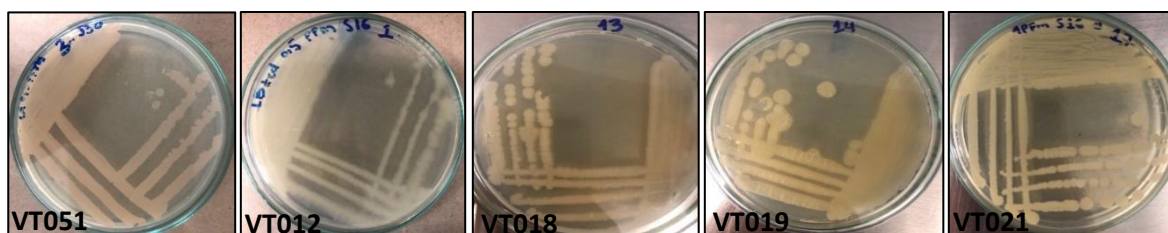


Figura 3. Imágenes de los morfotipos VT051, VT012, VT018, VT019 y VT021 aislados y purificados.

Para las cepas VT012 y VT051, los análisis de las secuencias del 16s rRNA también arrojaron un 100% de similitud de secuencias, pero con *Bacillus cereus*. Esta especie también cuenta con antecedentes cadmio tolerantes (e, g Ahmad et al., 2014; W. Huang & Liu, 2013). Un ejemplo del potencial de *B. cereus* se evidencia en el estudio de Huang et al., 2014, donde se mostró que el principal mecanismo de tolerancia en la cepa *B. cereus* evaluada fue la acumulación intracelular de cadmio a concentraciones menores a 20 mg/mL, e incluso sugirió que la bacteria implementa otros mecanismos cadmio tolerantes cuando se somete a concentraciones más altas del metal. La implementación de diferentes mecanismos cadmio tolerantes por parte de las bacterias también se ha reportado en Roane & Pepper, 1999.

Estudios previos realizados en suelos cacaoteros de Colombia, también han reportado cepas cadmio tolerantes del género *Bacillus*. En D. Bravo et al., 2018, se aisló la cepa *Bacillus* sp. CdDB70, la cual mostro una buena capacidad de inmovilizar Cd soluble. Por otro lado, en Cordoba-nova et al., 2021 se reporta la presencia de cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus flexus* en aislados de suelos cacaoteros con presencia de Cd. Sin embargo, aún no cuentan con estudios *in vitro* que muestren su capacidad cadmio tolerante. En cuanto a nuestro hallazgo de aislados del género *Priestia*, no hay antecedentes en Colombia que denoten su presencia en suelos cacaoteros, por lo tanto, este sería el primer reporte de dicho género.

La revisión de estos antecedentes en la literatura sugiere que los morfotipos aislados en este trabajo podrían tener tolerancia al metal. Adicionalmente, dado que los resultados muestran que tres de los aislados evaluados, VT018, VT019 y VT021 pertenecen a *Priestia aryabhatthai*, y dos, VT051 y VT018 a *Bacillus cereus*, exhibiendo secuencias genéticas idénticas del gen 16s rRNA con respecto a dichas especies, es pertinente aclarar que los cinco aislados presentan características morfológicas distintas (Tabla 1) y que el gen 16s rRNA, a pesar de ser ampliamente usado para la caracterización taxonómica debido a que está

altamente conservado entre las especies bacterianas, no permite la identificación de capacidades funcionales entre especies, o entre aislados dentro de la misma especie, por ende el hecho de que tengan secuencias idénticas de este gen con respecto a las especies referenciadas, no es suficiente para afirmar que los morfotipos analizados pertenecen a un mismo aislado y que exhiben funciones ecológicas o fisiológicas similares (Johnson et al., 2019; Jordan et al., 2002).

Anteriormente se han reportado casos donde los aislados bacterianos exhiben secuencias idénticas del 16s rRNA con respecto a una referencia, lo que sesga la diferenciación entre cepas dentro de la misma especie a través de dicho gen. Incluso los análisis genómicos de los aislados bacterianos que arrojaron secuencias del ARNr SSU 100% idénticas con respecto a una referencia terminaron siendo especies diferentes (Antony-Babu et al., 2017). Por esto es pertinente implementar experimentos que permitan una caracterización genómica y metabólica de los aislados para una identificación más específica que posibilite evidenciar las relaciones evolutivas entre las cepas de estudio y las diferencias fisiológicas

Morfotipo	Descripción morfológica
VTB051	Color rosa, superficie brillante y lisa, sin opacidad, textura cremosa, borde entero, presencia de halo, elevación convexa. Bacilo gram positivo-endospora.
VTB012	Color blanco, superficie matizada, con opacidad, textura seca, bordes irregulares filamentosos, sin elevación. Bacilo-gram positivo-endospora.
VTB018	Color blanco, superficie brillante, sin opacidad, textura cremosa y lisa, borde entero, presencia de halo, elevación convexa. Bacilo gram-positivo-endospora.
VTB019	Color blanco, superficie matizada, con opacidad, borde entero, sin halo, presencia de hebras en relieve, sin elevación. Bacilo gram positivo-endospora.
VTB021	Color beige, superficie brillante, sin opacidad, textura cremosa y lisa, borde entero, sin halo, sin elevación. Bacilo gram positivo-endospora.

Tabla 1. Descripción morfológica de los cinco morfotipos seleccionados.

3.3 Evaluación del crecimiento de las morfologías bacterianas seleccionadas entre las muestras de suelo evaluadas a diferentes concentraciones de cadmio.

Las curvas de crecimiento de los cinco morfotipos seleccionados a diferentes concentraciones de Cd se muestran en la Figura 4. Todos los morfotipos evaluados en este trabajo fueron capaces de crecer a las diferentes concentraciones de cadmio. Incluso, luego del tercer día las cepas continuaban en crecimiento exponencial.

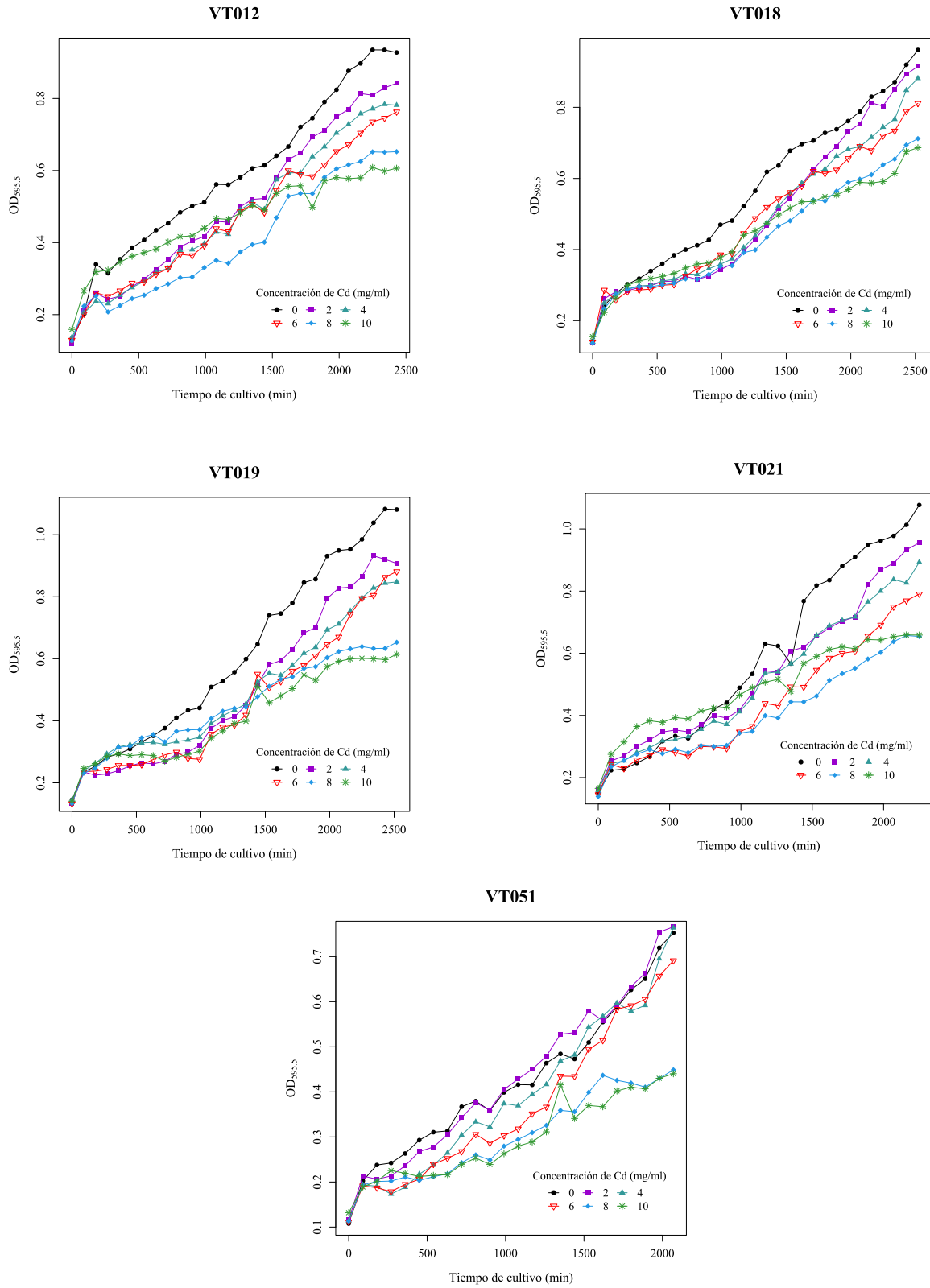


Figura 4. Curvas de crecimiento bacteriano para los morfotipos seleccionados.

De forma general, se logra percibir en los gráficos que a medida que incrementa la concentración de cadmio hay una disminución del crecimiento bacteriano. Este comportamiento se evidenció a través de los valores de las tasas de crecimiento para cada tratamiento (Figura 5), lo que confirma que el crecimiento es reducido a concentraciones de Cd más altas. Particularmente, para el morfotipo VT051 de *B. cereus* las tasas de crecimiento del control y los tratamientos a 2, 4 y 6 mg/mL de Cd son muy similares y, además, superan el valor de la tasa de crecimiento de los otros morfotipos en estas mismas concentraciones (Figura 5). Este comportamiento también se puede apreciar visualmente en la curva de crecimiento, donde las líneas correspondientes al control y los tratamientos 2, 4 y 6 mg/mL de Cd se solapan entre sí. Esta conducta sugiere que el crecimiento del morfotipo VT051 está presentando un menor efecto sobre el crecimiento a dichas concentraciones.

La prueba de permutación CGCC (Elsó et al., 2004), permitió la comparación de los valores de absorbancia obtenidos con respecto al control y los tratamientos con Cd para cada morfotipo. Este análisis evidenció que, de manera general, el valor del *p-value* asociado a diferencias entre los valores de absorbancia disminuye a medida que aumenta la concentración de Cd en el tratamiento; es decir, se presentan diferencias con mayor nivel de significancia entre el tratamiento y el control a medida que incrementa dicha concentración, mismo comportamiento que se evidencia con los valores de las tasas de crecimiento y que se aprecia visualmente en los gráficos. Lo que se observa en el gráfico del morfotipo VT051 es consistente con lo descrito anteriormente, pues los valores de *p-value* para los primeros 3 tratamientos con Cd cuando se comparan con el control no presentan diferencias significativas (0.74825, 0.59975 y 0.25200 respectivamente), indicando que la bacteria se comporta de manera muy similar a como crecería sin presencia de Cd cuando se somete a 2, 4 y 6 mg/mL del metal.

Sin embargo, el morfotipo con mayor tolerancia a las concentraciones de Cd evaluadas es aquel cuyas tasas de crecimiento para los tratamientos con Cd tuvieran la menor pérdida porcentual con respecto a la tasa de crecimiento de su control. El morfotipo cuyas tasas de crecimiento para los tratamientos 2, 8 y 10 mg/mL de Cd arrojaron el menor porcentaje de pérdida (0.957%, 13.968% y 21.943% respectivamente) con respecto a la tasa de crecimiento de su control fue el VT018. Por otro lado, para los tratamientos 4 y 6 mg/mL de Cd, el morfotipo VT051 fue quien arrojó el menor porcentaje de pérdida con respecto a su control de crecimiento comparado con los demás morfotipos (6.855% y 6.948% respectivamente). Este análisis también fue soportado por la prueba de permutación CGCC (Elsó et al., 2004) donde se evidenció que no había diferencias significativas entre dichos tratamientos para ambos morfotipos con respecto a sus controles.

Las diferencias en el crecimiento de los cinco morfotipos evaluados sugiere que podría tratarse de aislados diferentes dentro de las especies *B. cereus* y *P. aryabhatthai*. Sin embargo, como se mencionó en la sección de la identificación molecular, es pertinente realizar más estudios que corroboren esta sugerencia. Si bien en este estudio no se evidencia el mecanismo de tolerancia que podrían estar implementando los morfotipos, es importante resaltar que los cinco corresponden a bacterias Gram positivas, las cuales se caracterizan por tener una membrana celular formada de una capa gruesa de peptidoglicano (Ghuysen &

Hakenbeck, 1994). Se ha demostrado que esta capa puede restringir el ingreso de metales pesados al interior de la célula (Morozzi et al., 1986), lo que sugiere que los mecanismos de tolerancia que predominan este tipo de células son mecanismos pasivos como la unión del Cd^{+2} a la pared celular bacteriana (Abbas et al., 2018).

Debido a que este trabajo se enfocó en la caracterización preliminar de cinco de los morfotipos aislados a partir de las muestras de suelos cacaoteros, y se evidenció que todos toleran las concentraciones de cadmio evaluadas, especialmente los morfotipos VT018 y VT051, será importante que en futuros trabajos se evalúe la respuesta de dichas bacterias al metal pesado durante más tiempo y se investiguen los mecanismos que les permiten subsistir bajo la presencia del elemento químico. Esto permitiría establecer qué fase del crecimiento bacteriano es más óptima para la remoción de Cd en cada morfotipo; pues se ha demostrado que dicha fase de crecimiento puede variar dependiendo de la concentración inicial del metal a la que se somete el crecimiento bacteriano (F. Huang et al., 2014). Igualmente, es importante establecer qué morfotipo exhibe los mecanismos más eficientes en términos de remoción de cadmio.

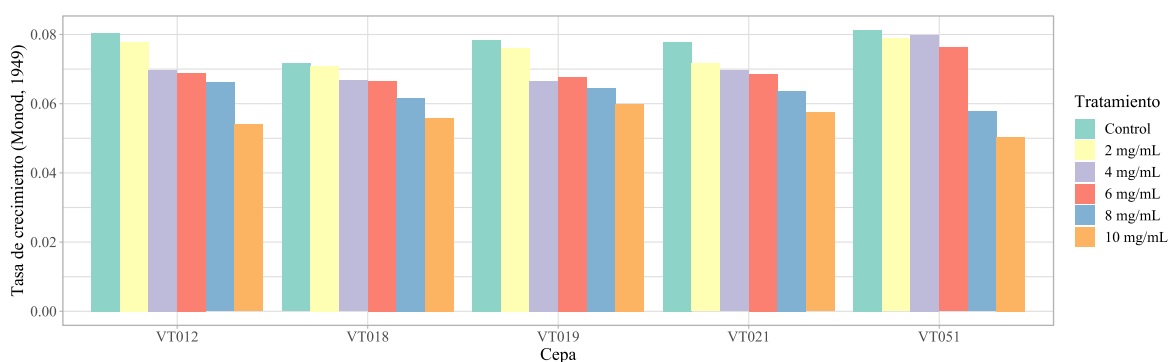


Figura 5. Ilustración de los valores de las tasas de crecimiento para los morfotipos seleccionados.

4. Conclusiones.

Un total de 73 morfotipos bacterianos fueron aislados y purificados a partir de suelos cacaoteros en presencia de cadmio, los cuales hacen parte del Laboratorio de Biología Animal y Vegetal de la Universidad EAFIT. La importancia de tener estos aislados a partir de dichos suelos radica en la posibilidad de realizar una mejor caracterización de sus propiedades fisiológicas, permitiendo tener claridad de sus roles en el ecosistema y de su interacción con cadmio. El crecimiento de los cinco de los morfotipos bacterianos evidenció que todos toleraron las concentraciones del metal evaluadas. No obstante, el análisis de las tasas de crecimiento y el análisis de la comparación de las curvas mostró que los morfotipos VT018 y VT051 de *Priestia aryabhatthai* y *Bacillus cereus* respectivamente tuvieron el comportamiento más similar a sus controles, mostrando la menor afectación por la presencia del Cd.

Agradecimientos.

Los autores agradecen a la Universidad EAFIT por la financiación del proyecto “Tecnologías convergentes en cacao” liderado por el profesor Investigador Javier Correa del departamento de ciencias biológicas. El proyecto mencionado se encuentra actualmente en curso y proporcionó los recursos para el desarrollo de este trabajo.

Referencias.

- Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Hossain, K., Ismail, N., Tajarudin, H. A., & Abdul Khalil, H. P. S. (2018). A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(1), 243–262. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1400-5>
- Abbott, P.C.; Benjamin, T.J.; Burniske, G.R.; Croft, M.M.; Fenton, M.; Kelly, C.R.; Lundy, M.; Rodriguez Camayo, F.; Wilcox Jr., M. . (2018). *Análisis de la cadena productiva de cacao en Colombia*. 221.
- Ahmad, I., Akhtar, M. J., Zahir, Z. A., Naveed, M., Mitter, B., & Sessitsch, A. (2014). Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18), 11054–11065. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3010-9>
- Alloway, B. J. (2013). Heavy metals and metalloids as micronutrients for plants and animals. *Heavy Metals in Soils*, 195–209. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>
- Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., & Suzuki, M. T. (2017). Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>
- Bååth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3–4), 335–379. <https://doi.org/10.1007/BF00279331>
- Beltrán Pineda, M., & Gómez, J. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Borsari, M. (2011). Cadmium: Inorganic & Coordination Chemistry. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0029>
- Borsari, M. (2014). Cadmium: Inorganic Chemistry. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0029.pub2>
- Bravo, D., Pardo-Díaz, S., Benavides-Erazo, J., Rengifo-Estrada, G., Braissant, O., &

- Leon-Moreno, C. (2018). Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(5), 1175–1194. <https://doi.org/10.1111/jam.13698>
- Bravo, Daniel, 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), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040761>
- Chi, Y., Huang, Y., Wang, J., Chen, X., Chu, S., Hayat, K., Xu, Z., Xu, H., Zhou, P., & Zhang, D. (2020). Two plant growth promoting bacterial *Bacillus* strains possess different mechanisms in adsorption and resistance to cadmium. *Science of the Total Environment*, *741*, 140422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140422>
- Cody, W. L., Wilson, J. W., Hendrixson, D. R., McIver, K. S., Hagman, K. E., Ott, C. M., Nickerson, C. A., & Schurr, M. J. (2008). Skim milk enhances the preservation of thawed - 80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*, *75*(1), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.006>
- Cordoba-novoa, H. A., Torres-rojas, E., & Sciences, A. (2021). *Assessment of native cadmium-resistant bacteria in cacao (. Cd*, 1–25.
- Dubiński, J. (2013). Sustainable Development of Mining Mineral Resources. *Journal of Sustainable Mining*, *12*(1), 1–6. <https://doi.org/10.7424/jsm130102>
- Elso, C. M., Roberts, L. J., Smyth, G. K., Thomson, R. J., Baldwin, T. M., Foote, S. J., & Handman, E. (2004). Leishmaniasis host response loci (*lmr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity*, *5*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364042>
- Eriksson, J., & Skerfving, S. (2005). A Health Risk Food for Production Systems : Population Sensitive. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, *34*(4), 344–351.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. L. (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiology Ecology*, *30*(2), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00047-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00047-1)
- Food, E., & Authority, S. (2012). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, *10*(1), 1–37. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2551>
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, *156*(3), 609–643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Gramlich, A., Tandy, S., Andres, C., Chincheros Paniagua, J., Armengot, L., Schneider, M., & Schulin, R. (2017). Cadmium uptake by cocoa trees in agroforestry and monoculture systems under conventional and organic management. *Science of the Total Environment*, *580*, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.014>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Dong wu xue yan jiu = Zoological research / “Dong wu xue yan jiu” bian ji wei yuan hui bian ji* (Fourth Edi, Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.3724/sp.j.1141.2012.01075>

- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct bacillus species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(11), 5753–5798.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, *60*(4), 579–598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Huang, F., Guo, C. L., Lu, G. N., Yi, X. Y., Zhu, L. D., & Dang, Z. (2014). Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere*, *109*, 134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.066>
- Huang, W., & Liu, Z. M. (2013). Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *105*, 113–119.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.040>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, *8*(September), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jordan, I. K., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2002). Microevolutionary Genomics of Bacteria. *Theoretical Population Biology*, *61*(4), 435–447.
<https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1588>
- Liu, J., Xie, X., Luo, Y., Deng, B., Bai, Q., Yan, M., & Bai, X. (2019). Isolation, Identification, and Biological Characteristics of a Cadmium-Resistant Endophytic Bacteria *Bacillus aryabhattai*. *Biotechnology Bulletin*, *35*(2), 0–4.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017). Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *81*(2). <https://doi.org/10.1128/mubr.00063-16>
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology*, *3*(1), 371-394.
- Nies, D. H., & Silver, S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, *14*(2), 186–199.
<https://doi.org/10.1007/BF01569902>

- Oskarsson, A., Widell, A., Olsson, I. M., & Grawé, K. P. (2004). Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *BioMetals*, 17(5), 531–534. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000045733.38583.8e>
- Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: Transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, 5(3), 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., & Jain, R. K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology*, 23(3), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.01.001>
- Ramtahal, G., Yen, I. C., Bekele, I., Bekele, F., Wilson, L., Maharaj, K., & Harrynanan, L. (2016). Relationships between Cadmium in Tissues of Cacao Trees and Soils in Plantations of Trinidad and Tobago. *Food and Nutrition Sciences*, 07(01), 37–43. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.71005>
- Roane, T. M., & Pepper, I. L. (1999). Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial Ecology*, 38(4), 358–364. <https://doi.org/10.1007/s002489901001>
- Santos, C., Monteiro, M., & Dias, M. C. (2010). Mechanisms of cadmium toxicity in crops: A review. *Horticulture in the 21st Century, November 2018*, 1–40.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., & Niazi, N. K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of Hazardous Materials*, 325, 36–58. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.063>
- Tran, T. A., & Popova, L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: Recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.3906/bot-1112-16>
- Yao, X., Chen, P., Cheng, T., Sun, K., Megharaj, M., & He, W. (2021). Inoculation of *Bacillus megaterium* strain A14 alleviates cadmium accumulation in peanut: effects and underlying mechanisms. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2), 819–832. <https://doi.org/10.1111/jam.14983>

Información Complementaria.

Morfotipo	Control (0 mg/mL Cd)	2 mg/mL Cd	4 mg/mL Cd	6 mg/mL Cd	8 mg/mL Cd	10 mg/mL Cd
VT012	0,0805053	0,0777708	0,0697791	0,0689050	0,0660974	0,0539690
VT018	0,0716176	0,0709320	0,0667076	0,0666411	0,0616136	0,0559024
VT019	0,0784281	0,0761438	0,0666251	0,0677098	0,0645207	0,0599601
VT021	0,0777752	0,0715958	0,0695409	0,0685286	0,0636551	0,0574558
VT051	0,0812894	0,0788439	0,0797817	0,0762009	0,0577272	0,0503706

Valores de las tasas de crecimiento de cada tratamiento para cada morfotipo (Monod,1949).

CGGC: Compare groups of Growth Curves					
Morfotipos	Control + 2 mg/mL Cd	Control + 4 mg/mL Cd	Control + 6 mg/mL Cd	Control + 8 mg/mL Cd	Control + 10 mg/mL Cd
VT012	0.1202	0.0442	0.0220	0.0010	0.0090
VT018	0.1403	0.1300	0.1020	0.0170	0.0015
VT019	0.00050	0.01075	0.00000	0.00075	0.00000
VT021	0.39500	0.24650	0.02100	0.00325	0.01000
VT051	0.74825	0.59975	0.25200	0.00400	0.00175

Valores de p-value arrojados por la prueba de permutación CGGC para la comparación de las curvas de crecimiento de los controles de cada morfotipo (0 mg/mL de Cd) y con respecto a los diferentes tratamientos con Cd. Se realizó bajo un nivel de significancia de 0.05.