

## Caracterización de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de un residual minero cubano

### Characterization of heavy metals resistant bacteria isolated from a Cuban mining waste

Alexander Govin-Sanjudo<sup>1\*</sup>, Marian de la Caridad Reyes-Palmero<sup>1</sup>, Magdia Guerra-Quintana<sup>1</sup>, María Isabel Sánchez-López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de La Habana, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [agovin@fbio.uh.cu](mailto:agovin@fbio.uh.cu)

#### Resumen

La contaminación ambiental por metales pesados constituye un problema mundial contemporáneo. El desarrollo de estrategias biotecnológicas en el campo de la remediación ha ganado gran atención en los últimos años por ser más rentables, eficientes y amigables con el medio ambiente. Las bacterias resistentes a metales pesados constituyen una herramienta potente en la biorremediación de ambientes contaminados por metales. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar bacterias resistentes a metales pesados, aisladas de un escombros laterítico, residual de la industria minera de Moa. Se aislaron dos bacterias (EL-1 y EL-2) a partir del escombros laterítico. Los aislados se caracterizaron e identificaron hasta el nivel de género. Se evaluó la resistencia a níquel, cobalto, cromo y aluminio en medio mínimo Tris sólido. Se determinó la curva dosis-respuesta a níquel, cobalto, cromo y aluminio, así como el mecanismo de resistencia bacteriana a níquel. Además, se evaluó la susceptibilidad a antibióticos. Los dos aislados fueron identificados como *Bacillus* sp. Las cepas fueron resistentes a todos los metales evaluados, mostrando una alta resistencia a níquel (25 mmol-L<sup>-1</sup>). La cepa *Bacillus* sp. EL-1 presentó un mecanismo inducido de resistencia a níquel, mientras que la cepa *Bacillus* sp. EL-2 presentó una expresión constitutiva de la resistencia a este metal. Las bacterias mostraron un predominio de la sensibilidad a los antibióticos evaluados. Todas estas características las hacen interesantes para ser aplicadas en estrategias de biorremediación para el saneamiento ambiental.

**Palabras clave:** *Bacillus*; escombro laterítico; resistencia a metales pesados; biorremediación.

### **Abstract**

Environmental pollution by heavy metals is a contemporary world problem. Developing biotechnological strategies in remediation field has gained great attention in recent years for being more profitable, efficient and friendly to the environment. Heavy metal resistant bacteria are a powerful tool in bioremediation of metal contaminated environments. The aim of this study is to characterize heavy metal resistant bacteria, isolated from lateritic rubble, residual from Moa mining industry. Two bacteria (EL-1 and EL-2) were isolated from the lateritic rubble. The isolated ones were characterized and identified down to gender level. Resistance to nickel, cobalt, chromium and aluminum was evaluated in solid Tri minimal medium. The dose-response curve for nickel, cobalt, chromium and aluminum was determined, as well as the mechanism of bacterial resistance to nickel. In addition, antibiotic susceptibility was assessed. The two isolated were identified as *Bacillus* sp. The strains were resistant to all the evaluated metals, showing a high resistance to nickel (25 mmol-L<sup>-1</sup>). The *Bacillus* sp. EL-1 showed an induced mechanism of nickel resistance, while the *Bacillus* sp. EL-2 showed a constitutive resistance to this metal. The bacteria showed a predominance of sensitivity to the antibiotics evaluated. All these characteristics make them interesting to be applied in bioremediation strategies for environmental cleanup.

**Keywords:** *Bacillus*; lateritic rubble; resistance to heavy metals; bioremediation.

---

## **1. INTRODUCCIÓN**

La industria minero-metalúrgica constituye una de las principales fuentes de contaminación ambiental por metales pesados. Estos elementos no pueden ser degradados ni biológica ni químicamente (Ali, Khan e Ilahi 2019). Una vez introducidos a los ecosistemas pueden incorporarse a las cadenas de alimentación y aumentar su toxicidad, debido al incremento de su concentración de un nivel trófico a otro, fenómeno denominado biomagnificación (Bazan y Galizia 2018).

Algunos iones metálicos, como el níquel y el cobalto, son esenciales para la célula a concentraciones trazas, sin embargo, a concentraciones elevadas pueden resultar tóxicos y afectan la viabilidad de los organismos (Argudín, Hofer y Butaye 2019). Solo los microorganismos resistentes a metales

pueden sobrevivir en presencia de elevadas concentraciones de estos compuestos, porque muestran mecanismos moleculares como la captura de iones por la célula, sistemas de expulsión de los metales y transformaciones mediadas por enzimas, que les permiten contrarrestar sus efectos tóxicos (Igiri *et al.* 2018).

El surgimiento y evolución de especies microbianas resistentes a metales ocurre como consecuencia de su adaptación a ambientes con elevadas concentraciones de estos elementos, tanto de origen antrópico como natural. Entre ellos se encuentran los suelos ultramáficos (serpentina), que poseen elevadas concentraciones de metales como níquel, cobalto, cromo y son deficientes en nutrientes esenciales (Schedlbauer 2015).

Estos suelos son fuente potencial de microorganismos resistentes a metales y productores de metabolitos con actividad biológica, con potencialidades para ser aplicados en el diseño de tecnologías para el saneamiento ambiental (Govin, Coto y Marrero 2015). Además, constituyen ecosistemas ideales para el estudio de la genética de adaptación al hábitat y evolución de nuevas ecovariedades microbianas (Díaz 2013).

Los microorganismos resistentes a metales o sus determinantes genéticos pueden ser utilizados en la bioextracción de metales, en la restauración de ambientes contaminados con metales y como bioindicadores de la contaminación por metales pesados (Marzan *et al.* 2017). Esta temática es de importancia para Cuba debido a que la industria niquelífera constituye uno de los principales renglones de la economía cubana.

La región minera de Moa (Holguín) contiene los mayores y más antiguos depósitos de serpentina de la isla (Reeves *et al.* 1999), los cuales se encuentran entre las principales reservas de níquel y cobalto del mundo (Valcarce y Rojas 2017). La industria minero-metalúrgica que se desarrolla en esta zona genera residuos contaminantes, que se acumulan diariamente ocasionando un severo impacto ambiental. Los escombros lateríticos son residuales mineros con valores de níquel inferiores al 0,9 % y desde el punto de vista industrial constituyen las lateritas fuera de balance; por lo que no pueden ser procesados por tecnologías convencionales (Marrero, Coto y Schippers 2016).

Se estima que existe más de noventa millones de toneladas de escombros almacenados en Moa (Palacios y García 2014), estos ecosistemas con altas concentraciones de metales pesados constituyen un ambiente ideal para el aislamiento de bacterias resistentes. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar bacterias resistentes a metales pesados aisladas de escombros lateríticos de Moa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Escombro laterítico

Se empleó el escombro laterítico de Camarioca Norte Zona 12 (E- Zona 12). La composición química de este material se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de escombro laterítico zona 12 (E-Zona 12). La composición se expresa en % (p/p)

Elementos	CoO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe total	NiO	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
Concentración	0,070	14,07	2,701	39,26	0,412	0,106	39,16

### 2.2. Aislamiento de bacterias resistentes a níquel de escombros lateríticos

Para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel se pesó 1 g (2,5 mm de tamaño de partícula) del escombro laterítico y se adicionó a erlenmeyers que contenían 100 mL de caldo Luria Bertani (LB), suplementados con 5,0 mmol.L<sup>-1</sup> de Ni (II). Los erlenmeyers se incubaron durante 48 h a 150 r.min<sup>-1</sup> a 28°C. A partir de estos cultivos, se inocularon 100 µL en placas Petri con medio LB sólido suplementadas con 5,0 mmol.L<sup>-1</sup> de Ni (II). Las placas se incubaron durante 24 h a 30 °C. Una vez que se observó el crecimiento se realizó la depuración de los cultivos.

### 2.3. Identificación de los aislados bacterianos

Para la identificación de los dos aislados se consideraron los criterios del Manual de Bergey (Logan y De Vos 2007). Se tuvieron en cuenta las características micromorfológicas, tintoriales y culturales. Esta información se complementó con las pruebas bioquímicas: citocromo oxidasa, catalasa, reducción de nitrato, hidrólisis del almidón y gelatina; dichas pruebas se realizaron siguiendo las indicaciones de Harrigan y McCance (1968). Igualmente, se determinaron los patrones de asimilación de diferentes azúcares a través del empleo de la galería de identificación API 50CHB.

### 2.4. Resistencia a metales pesados

#### 2.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a metales pesados en medio mínimo Tris sólido

La concentración mínima inhibitoria a Ni (II), Co (II), Cr (VI) y Al (III) se determinó en el medio mínimo Tris (MMT), siguiendo la metodología aplicada por Mergeay y otros colaboradores (1985). Las placas se incubaron a 28 °C y el crecimiento se siguió diariamente durante siete días.

#### **2.4.2. Curva dosis-respuesta a metales pesados en medio mínimo**

A partir de un inóculo estandarizado (ajustando al tubo 0,5 de la escala de McFarland) de cada aislado se inocularon tubos que contenían MMT estéril y concentraciones crecientes de los metales pesados: Ni(II), Co (II), Cr (VI) y Al (III). Los cultivos se incubaron a 30 °C, 150 r.min<sup>-1</sup>, durante 18 h y se determinó el crecimiento mediante la absorbancia a una  $\lambda=600$  nm. La experiencia se realizó por triplicado.

#### **2.4.3. Determinación del mecanismo de resistencia a níquel (inducido/constitutivo)**

El mecanismo de resistencia a níquel se determinó siguiendo la metodología aplicada por Marrero y demás investigadores (2007). Se prepararon dos precultivos de 5 mL de MMT líquido para cada aislado; a uno de los dos se le adicionó níquel (concentración final de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>). Los precultivos se incubaron en agitación en zaranda orbital a 30 °C y 150 r.min<sup>-1</sup> durante 18 h.

Las células provenientes del precultivo en presencia del metal se consideraron como "inducidas" y las cultivadas en ausencia del metal como "no inducidas". Los dos precultivos se inocularon en erlenmeyers (250 mL) con 100 mL de MMT suplementado con Ni (II) (5 mmol.L<sup>-1</sup>). Se tomaron muestras a las 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h, 26 h, 30 h y 35 h, a las que se determinó el crecimiento mediante la absorbancia a una  $\lambda=600$  nm. La experiencia se realizó por triplicado.

#### **2.5. Evaluación de la resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos se determinó mediante el método de difusión en agar (Bauer *et al.* 1966). Se evaluaron los antibióticos: Ampicilina (10  $\mu$ g), Co-Trimoxazol (25  $\mu$ g), Azitromicina (15  $\mu$ g), Polimixina (300 IU), Ciprofloxacina (5  $\mu$ g), Kanamicina (30  $\mu$ g), Penicillina (10 IU), Cefoxitina (30  $\mu$ g), Amikacina (30  $\mu$ g), Meropenem (10  $\mu$ g), Cloranfenicol (30  $\mu$ g), Gentamicina (120  $\mu$ g), Piperacilina (30  $\mu$ g) y Tetraciclina (30  $\mu$ g).

#### **2.6. Análisis biométricos**

La comparación de las medias, de los valores de absorbancia del crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de metales (curva dosis-respuesta), se determinó mediante un análisis de varianza de clasificación simple seguido de una prueba de Tukey de comparación múltiple de medias. Previamente se verificó el cumplimiento de las premisas de normalidad y homogeneidad de varianzas, con el empleo de las pruebas de Shapiro Wilks y Levene, respectivamente.

Las comparaciones entre el crecimiento de los cultivos inducidos y no inducidos en presencia del metal se realizó mediante una prueba t de Student ( $p < 0,05$ ). Todos los análisis se realizaron con el empleo del programa STATISTICA versión 8.0 (StatSoft 2007).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a Ni (II) a partir del escombros laterítico

En las placas Petri con medio LB sólido suplementado con níquel (5,0 mmol/L) se aislaron dos bacterias que se denotaron EL-1 y EL-2 (EL: escombros laterítico). Los dos aislados mostraron una morfología bacilar, Gram positivos y forman endospora (posición subterminal). Por estas características micromorfológicas y tintoriales fueron ubicados dentro de la clase Bacilli. Los dos aislados bacterianos mostraron una respuesta negativa a la prueba citocromo oxidasa, en cambio fueron catalasa positiva y redujeron nitrato.

El API 50CHB permitió determinar el patrón de asimilación de diferentes azúcares. Los aislados asimilaron nueve azúcares como fuente de carbono: D- glucosa, D-fructosa, arbutina, salicina, esculina, D-maltosa, D- trealosa, almidón y glicógeno; mientras que el aislado EL-2, además, asimiló la D-manosa y N-acetyl glucosamina. Estos resultados indican que los dos aislados constituyen cepas diferentes. Teniendo en cuenta las indicaciones del Manual de Bergey las dos bacterias fueron ubicadas en el género *Bacillus* (Logan y De Vos 2007).

#### 3.2. Resistencia a Ni (II), Co (II), Cr (VI) y Al (III)

La Tabla 2 muestra los valores de CMI obtenidos al enfrentar las cepas en estudio a concentraciones crecientes de Co(II), Ni(II), Cr(VI) y Al(II) en medio mínimo Tris sólido. Las dos cepas crecieron en concentraciones iguales o superiores de los 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> de todos los metales evaluados.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria a metales pesados, de las cepas de *Bacillus* sp. en el medio mínimo Tris sólido a 30 °C, durante 120 h. Los valores se registraron en mmol.L<sup>-1</sup>

Cepas	Ni(II)	Co (II)	Cr (VI)	Al (III)
<i>Bacillus</i> sp. EL-1	25,0	3,0	0,5	1,0
<i>Bacillus</i> sp. EL-2	25,0	3,5	1,0	2,0

Los mayores niveles de resistencia se observaron en presencia de níquel (25 mmol.L<sup>-1</sup>). El resto de los metales ejercieron un mayor efecto negativo en el crecimiento bacteriano. Las dos cepas mostraron un comportamiento similar en cuanto a la resistencia: Ni (II) > Co (II) > Al (III) > Cr (VI). La cepa

EL-2 mostró mayor resistencia a los metales Co (II), Cr (VI) y Al (III) con respecto a la cepa EL-1. Estos resultados indican que las dos cepas son multirresistentes a metales.

En el medio líquido las dos cepas fueron resistentes a los cuatro metales (curva dosis-respuesta). En este medio, la toxicidad de los iones metálicos fue mayor a la que se observó en el medio sólido. La cepa *Bacillus* sp. EL-2 reveló mayores valores de absorbancia con respecto a la cepa *Bacillus* sp. EL-1 en presencia de los diferentes metales. Las dos cepas crecieron hasta 10 mmol.L<sup>-1</sup> de Ni (II) (Figura 1A). Para el resto de los metales: cobalto (Figura 1B), cromo (Figura 1C) y aluminio (Figura 1D) la cepa EL-1 manifestó crecimiento hasta 2 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> y 1 mmol.L<sup>-1</sup> de estos metales en ese orden; mientras que para la cepa EL-2 fue 1,25 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,15 mmol.L<sup>-1</sup> y 0,75 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

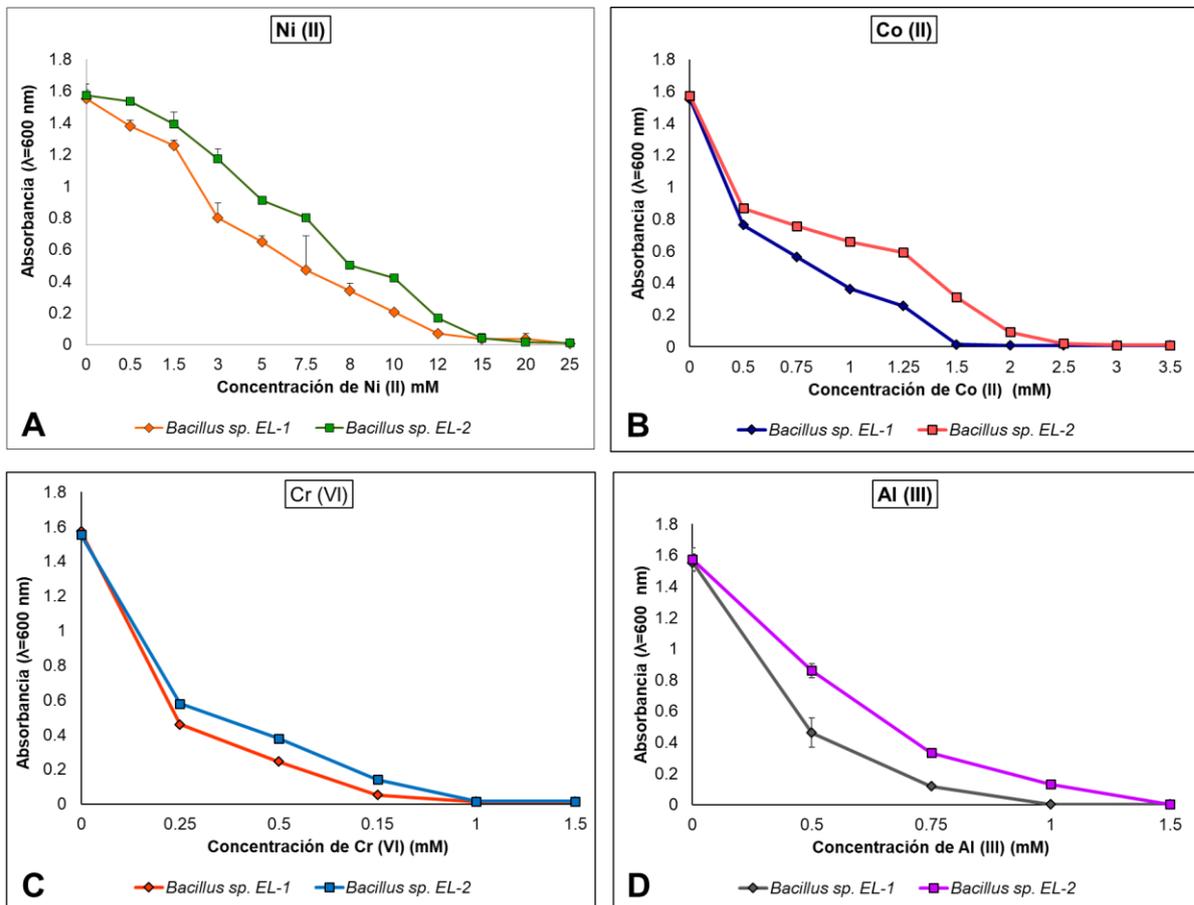


Figura 1. Crecimiento de las cepas en presencia de diferentes concentraciones de (A) Ni (II), (B) Co (II), (C) Cr (VI) y (D) Al (III), en medio mínimo Tris líquido, durante 18 h (150 rpm, 30 °C). Las barras representan el valor medio de tres determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

### 3.3. Mecanismo de resistencia a Ni (II)

En la cepa *Bacillus* sp. EL-1 la fase de adaptación de los cultivos no inducidos fue de aproximadamente ocho horas, resultando cuatro veces mayor a la duración de la fase de adaptación, de los cultivos inducidos correspondientes (Figura 2A). Se observaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia del cultivo inducido y las del no inducido a partir de las 4 h de incubación y hasta aproximadamente las 24 h. Estos resultados indican que la cepa EL-1 exhibe un mecanismo inducido de resistencia a Ni (II), es decir, en presencia del metal se induce la expresión de la maquinaria enzimática responsable de este fenómeno.

En el crecimiento de los cultivos (células inducidas y no inducidas) de la cepa *Bacillus* sp. EL-2 no se observaron diferencias significativas y el tiempo de adaptación fue aproximadamente igual en ambos casos: 2 h (Figura 2B). Estos resultados indican que la cepa EL-2 presenta un mecanismo de resistencia constitutivo.

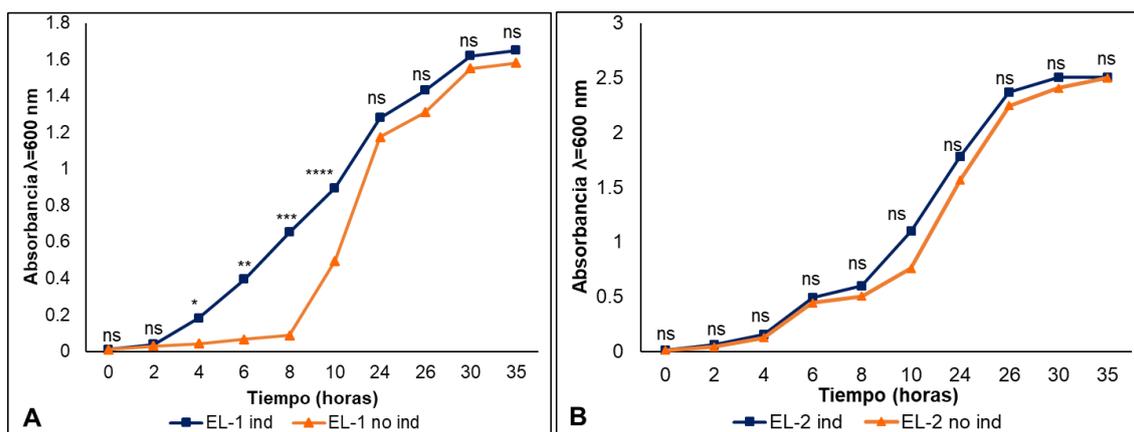


Figura 2. Crecimiento de los cultivos inducidos y no inducidos, de cada una de las cepas en presencia de iones Ni(II), en medio mínimo Tris, durante 30 h a 150 r. min<sup>-1</sup> (A) *Bacillus* sp. EL-1, (B) *Bacillus* sp. EL-2. (\*) Representa diferencias significativas entre los valores, ns: no existen diferencias significativas, resultado del t de Student para comparar las medias de los cultivos inducidos y no inducidos por cepa,  $p < 0,001$ ,  $n = 3$ .

### 3.4. Resistencia a antibióticos

La Tabla 3 exhibe los resultados de la susceptibilidad de las cepas frente a antibióticos que se evaluaron. Las dos cepas mostraron un predominio de la susceptibilidad a estos agentes antimicrobianos. Las dos cepas fueron sensibles a nueve antibióticos: Meropenem, Azitromicina, Polimixina, Ciprofloxacina, Kanamicina, Gentamicina, Amikacina, Cloranfenicol,

Piperacilina, y Tetraciclina; mientras que mostraron resistencia a todos los antibióticos de la familia de los  $\beta$ -lactámicos que se evaluaron.

Tabla 3. Resistencia de los aislados bacterianos endófitos (resistentes a níquel) a diferentes antibióticos por el método de difusión en agar

<b>Antibióticos</b>	<b><i>Bacillus sp. EL-1</i></b>	<b><i>Bacillus sp. EL-2</i></b>
Ampicilina	R	R
Meropenem	S	S
Cefoxitina	R	R
Co-Trimoxazol	S	S
Azitromicina	S	S
Polimixina	S	S
Ciprofloxacina	S	S
Kanamicina	S	S
Penicilina G	R	R
Gentamicina	S	S
Amikacina	S	S
Cloranfenicol	S	S
Piperacilina	S	S
Tetraciclina	S	S

**Leyenda:** R (Resistente), S (Sensible)

#### 4. DISCUSIÓN

Las regiones mineras se reconocen como uno de los ambientes más atractivos para el aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados (Adekanmbi *et al.* 2019). Se consideran ecosistemas extremos por sus características químicas y constituyen un sistema ideal para realizar estudios genéticos de la adaptación al hábitat y evolución de nuevas ecovariedades microbianas (Díaz 2013). El género *Bacillus* se informa como uno presente en los ambientes mineros (Yik *et al.* 2018).

La resistencia bacteriana a metales pesados, sus mecanismos y determinantes genéticos, han recibido especial atención debido a que estos microorganismos resistentes tienen una función principal en la restauración de diferentes ecosistemas contaminados (Nwagwu *et al.* 2017). Los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados pueden ser aplicados en procesos como: 1) la biorremediación de ambientes contaminados con metales; 2) la bioextracción de metales, directamente desde los minerales o por recobrado de metales desde efluentes de procesos

industriales y 3) como biosensores para el monitoreo ambiental (Farooq *et al.* 2010).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento (Madigan, Martinko y Parker 2019). Los altos niveles de resistencia a níquel de los aislados se deben, fundamentalmente, al método selectivo de aislamiento. Además, son el reflejo de la biodisponibilidad que tiene este metal en el mineral y su toxicidad. En el caso del cobalto fue uno de los metales que más afectó el crecimiento microbiano en este estudio. Esto se debe principalmente a su efecto genotóxico, que provoca daños directos en el ADN e inhibe sus mecanismos de reparación, al mismo tiempo induce estrés oxidativo (Bresson *et al.* 2013), de ahí que son escasos los informes de bacterias resistentes a cobalto.

En el caso del aluminio, su biodisponibilidad en el suelo y agua es baja debido a que se adsorbe a las superficies minerales, su asociación con materia orgánica e insolubilidad de los complejos hidróxidos se forman cuando el pH es cerca de la neutralidad (Garcidueñas y Cervantes 1996). Esto explica que a pesar de que la concentración de aluminio presente en el mineral sea mayor que el resto de los metales evaluados, su biodisponibilidad es menor.

El cromo se encuentra en las fases cristalinas y residual (Hernández *et al.* 2009) por lo que la biodisponibilidad de este es menor, con respecto a los metales Ni (II) y Co (II). Igualmente, el cromato es altamente tóxico y provoca daños oxidativos en la célula (Barzanti *et al.* 2007). De ahí que los aislados mostraron valores de CMI de este ión de 0,5 y 1 mmol.L<sup>-1</sup>.

La multirresistencia a metales pesados de la microbiota autóctona de suelos de serpentina se informó por Abou-Shanab, Van Berkum y Angle (2007) en un ecosistema en Estados Unidos. Los aislados mostraron resistencia a Ni (15 mmol.L<sup>-1</sup>) y a Co (10 mmol.L<sup>-1</sup>), atribuyendo estos resultados de resistencia a los altos contenidos del metal en el suelo del cual fueron aisladas. En Cuba de la zona Yagrumaje Norte, Moa, Holguín se aislaron cepas de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *Ochrobactrum antropii* que mostraron resistencia a Ni (II) y Co (II) (Govin, Coto y Marrero 2015).

La biodisponibilidad de los cationes metálicos se incrementa en medio acuoso, por esta razón su toxicidad es mayor con respecto al medio sólido. Esto explica los valores inferiores de resistencia bacteriana a los metales evaluados en el medio líquido, con respecto al medio sólido. Estas diferencias fueron informadas también por Marrero (2008) en la cepa *Serratia marcescens* C-1 aislada del yacimiento laterítico Punta Gorda, Moa, Holguín.

Esta cepa resistió 20 mmol.L<sup>-1</sup> de níquel en medio mínimo Tris sólido, mientras que en el medio líquido la cepa mostraba crecimiento hasta 8 mmol.L<sup>-1</sup> del metal.

También Díaz (2013) caracterizó una colección bacteriana compuesta por siete cepas de *Serratia marcescens* aisladas del yacimiento laterítico Punta Gorda, Holguín, las que presentaron valores de CMI a níquel que oscilaron entre 15 mmol.L<sup>-1</sup> y 25 mmol.L<sup>-1</sup> en el medio mínimo Tris sólido, mientras que en el medio líquido resistían de 3,5 mmol.L<sup>-1</sup> a 7 mmol.L<sup>-1</sup> de níquel.

La resistencia bacteriana a metales puede estar determinada por mecanismos de resistencia expresados constitutivamente o inducidos por la presencia del metal (Nies 2000). Los mecanismos inducibles de resistencia a metales han evolucionado como consecuencia de la adaptación de las células al reto que representa la presencia de estas especies químicas tóxicas en su hábitat natural (Banjerdkiy, Vattanaviboon y Mongkolsuk 2003). Las cepas *Bacillus* sp. EL-1 y *Bacillus* sp. EL-2 muestran mecanismos diferentes de resistencia a Ni.

La mayoría de los mecanismos involucrados en la resistencia a metales que confieren elevados valores de resistencia frente a estas especies tóxicas son inducidos por la presencia del metal (Marrero 2008; Díaz 2013). Entre los ejemplos de microorganismos resistentes a Ni (II) que poseen un mecanismo constitutivo de resistencia se encuentra *Arthrobacter* sp. RM1/6. Esta cepa exhibe mecanismos constitutivos de resistencia a Ni(II) (20-25 mmol.L<sup>-1</sup>), Co(II) (2-5 mmol.L<sup>-1</sup>), Zn(II) (2 mmol.L<sup>-1</sup>) y Cr(III) (3-5 mmol.L<sup>-1</sup>) (Margesin y Shinner 1996).

El estudio de los mecanismos inducibles de resistencia a metales posibilitó el empleo de estos microorganismos como biosensores. La presencia de mecanismos inducibles de resistencia a Cd(II), Zn(II), Cu(II), Cr(III), Co(II), Ni(II), Tl(II), Pb(II) y Hg(I) en *Cupriavidus metallidurans* permitió la creación de biosensores a partir de células completas de este microorganismo. Estos fueron inducidos al entrar en contacto con suelos, residuos, minerales o cenizas con elevadas concentraciones de estos metales, en dependencia de su biodisponibilidad para la célula (Diels *et al.* 2009).

Mediante el empleo de técnicas de genética molecular, la región reguladora de diferentes sistemas inducibles de resistencia a metales se fusionó a los genes *lux* desarrollando sensores bacterianos que producen bioluminiscencia, en dependencia de la concentración del ion metálico. Entre ellos se incluyen los sistemas de resistencia a Hg(I), capaces de detectar concentraciones de hasta 0,5 mM de este metal, sensores para antimonio y arsenito, Zn(II), Cd(II) y Pb(II) (Nies 2003). Este tipo de sensores también podría ser utilizado

en la medición de la genotoxicidad de los metales pesados en diferentes ecosistemas.

Estos resultados resaltan el valor práctico de estas bacterias por su posible aplicación como biosensores ambientales. También las hace interesantes para ser incluidas en estudios genéticos de la resistencia a metales pesados.

El estudio de los patrones de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de ecosistemas con altas concentraciones de metales pesados resulta un aspecto importante a evaluar. Los determinantes genéticos involucrados en la resistencia a metales pueden estar localizados físicamente en el mismo elemento genético (plásmido) donde están los genes que confieren resistencia a antibióticos (Pal *et al.* 2015; Azam *et al.* 2018).

En este caso, la presencia de metales puede constituir una presión selectiva permanente, recalcitrante y ampliamente distribuida con importancia clínica y medioambiental. Asimismo, contribuye potencialmente en el mantenimiento y dispersión de algunos de los factores que determinan la resistencia a antibióticos (Sidhu *et al.* 2015).

En este estudio las dos cepas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos evaluados. Estos resultados están en concordancia con el estudio realizado por Samanta y otros investigadores (2012), quienes aislaron bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, resistentes a níquel, cobalto, cromo y cadmio, a los que les evaluaron la resistencia frente a once antibióticos (cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, norfloxacin, rifampicina, kanamicina, metilicina, co-trimoxazol, neomicina, ampicilina y ácido nalidíxico). Estos aislados mostraron un predominio de la sensibilidad, aunque fueron resistentes a kanamicina, ampicilina y metilicina.

La resistencia a los betalactámicos de las dos cepas aisladas del escombro laterítico puede deberse a la presencia en el ecosistema de otros microorganismos con la capacidad de producir estos metabolitos. La presión ejercida por microorganismos productores de antibióticos podría conducir a la dispersión de genes de resistencia localizados en plásmidos y transposones, los cuales contienen no solo determinantes genéticos de resistencia a antibióticos, sino también otros marcadores de selección, como la resistencia a metales pesados (López, Torres-Caycedo y Prada-Quiroga 2015).

#### 4. CONCLUSIONES

- Los escombros lateríticos constituyen un ambiente adecuado para el aislamiento de bacterias resistentes a metales pesados. Las dos cepas de *Bacillus* sp. se caracterizan por resistir a Ni (II), Co (II), Cr (VI),

Al (III), tanto en medio líquido como en medio sólido. Además, presentan mecanismos de resistencia a níquel diferentes lo que las hace atractivas para ser aplicadas en la biotecnología de los metales. El considerable predominio de la susceptibilidad a antibióticos entre las cepas aisladas de Moa constituye un elemento a favor en sus posibles aplicaciones biotecnológicas para ser empleadas en la biorremediación de ecosistemas contaminados con metales pesados.

## 5. REFERENCIAS

- Abou-Shanab, R. A. I.; Van Berkum, P. y Angle, J. S. 2007: Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*, 68 (2): 360-367.
- Adekanmbi, A. O.; Adelowo, O. O.; Okoh I. A. y Fagade O. E. 2019: Metal-resistance encoding gene-fingerprints in some bacteria isolated from wastewaters of selected printeries in Ibadan, South-western Nigeria. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1): 266-273.
- Ali, H.; Khan, E. y Ilahi, I. 2019: Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Hindawi Journal of Chemistry*, ID 6730305. Consulta: 20/12/2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- Argudín, M. A.; Hofer, A. y Butaye, P. 2019: Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Research in Veterinary Science*, 122: 132-147.
- Azam, M.; Tasleem, A.; Kumar, A.; Siddiqui, K.; Mondal, A. H. y Haq, R. 2018: Study of pandrug and heavy metal resistance among *E. coli* from anthropogenically influenced Delhi stretch of river Yamuna. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3): 471-480.
- Banjerdkij, P.; Vattanaviboon, P. y Mongkolsuk, S. 2003: Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*. *Curr Microbiol*, 47(3): 260-262.
- Barzanti, R.; Ozino, F.; Bazzicalupo, M.; Gabbrielli, R.; Galardi, F.; Gonnelli, C. y Mengoni, A. 2007: Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.*, 53(2): 306-316.
- Bauer, A. W.; Kirby, M. M.; Sherris, J. C. y Truck, M. 1966: Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J clin pathol*, 45(4): 493-496.
- Bazan, G. y Galizia, G. 2018: Geographical and ecological outline of metal (loid) accumulating plants in Italian vascular flora. *Ecocycles*, 4(1): 47-64.

- Bresson, C.; Darolles, C.; Carmona, A.; Gautier, C.; Sage, N.; Roudeau, S.; Ortega, R.; Ansoborlo, E. y Malard, V. 2013: Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with zinc. *Metallomics*, 5(2): 85-176.
- Díaz, A. 2013: *Caracterización de la resistencia a metales de una colección bacteriana aislada del yacimiento níquelífero de Moa (Cuba) y sus potencialidades en la biorremediación ambiental de sitios contaminados por metales pesados*. Jeannette Marrero Coto, José Manuel Gómez Montes de Oca, Gema Cabrera Revuelta (Tutores). Tesis doctoral. Universidad de Cádiz. 249 p.
- Diels, L.; Van Roy, S.; Taghavi, S. y Van Houdt, R. 2009: From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96(2): 247-58.
- Farooq, U.; Kozinski, J. A.; Ain, K. M. y Makshoof, A. 2010: Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents. A review of the recent literature. *Bioresource Technology*, 101(14): 5043-5053.
- Garcidueñas, R. P. y Cervantes, C. 1996: Microbial interactions with aluminium. *BioMetal*, 9(3): 311-316.
- Govin, A.; Coto, O. y Marrero, J. 2015: Caracterización fenotípica de una colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico de Yagrumaje Norte, Moa, Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 4(1):69-77.
- Harrigan, W. F. y Mccance, M. E. 1968: *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. España: Editorial Académica.
- Hernández, I.; Galizia, F.; Coto, O. y Donati, E. 2009: Improvement in metal recovery from laterite tailings by bioleaching. *Advanced Materials Research*, 71-73: 489-492. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.71-73.489>.
- Igiri, B. E.; Okoduwa, S. I. R.; Idoko, G. O.; Akabuogu E. P.; Adeyi, A. O.; y Ejiogu, I. K. 2018: Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Hindawi Journal of Toxicology*. ID 2568038. Consulta: 20/12/2019. <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>.
- Logan, N. A. y De Vos, P. 2007: Genus I. *Bacillus*. En: Brenner *et al.* (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da ed. Vol. 3. NY: Springer.
- López, D. P.; Torres-Caycedo, M. I. y Prada-Quiroga, C. F. 2015: Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Rev. Univ. Salud*, 18(1): 190-202.
- Madigan, J.; Martinko, B. y Parker, J. 2019: Microbial Growth and Its Control. En: *Biology of Microorganisms*. New Jersey: Prentice Hall. 1 058 p.

- Margesin, R. y Schinner, F. 1996: Bacterial heavy metal tolerance extreme resistance to nickel in *Arthrobacter* spp. Strains. *Basic Microbiol.*, 36(4): 269–282.
- Marrero, J. 2008: *Estudio molecular de la resistencia a níquel y cobalto en Serratia marcescens cepa C-1*. Dra. Lila Castellanos Serra, Dr. Dietrich Nies (Tutores). Tesis doctoral Universidad de La Habana. 103 p.
- Marrero, J.; Auling, G.; Coto, O. y Nies, D. H. 2007: High-Level Resistance to Cobalt and Nickel but Probably No Transenvelope Efflux: Metal Resistance in the Cuban *Serratia marcescens* strain C-1. *Microbial Ecology*, 53(1): 123–133.
- Marrero, J.; Coto, O. y Schippers, A. 2016: Anaerobic and aerobic reductive dissolution of iron-rich nickel laterite overburden by *Acidithiobacillus*. *Hydrometallurgy*, 168: 49-55. 10.1016/j.hydromet.2016.08.012.
- Marzan, L. W.; Hossain, M.; Mina, S. K.; Akter, Y. y Masudul, A. M. 2017: Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research and Fisheries*, 43(1): 65–74.
- Mergeay, M.; Nies, L. D.; Schlegel, H. G.; Gerits, J.; Charles, P. y Van Gijsegem, F. 1985: *Alcaligenes Eutrophus* Ch34 Is A Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. *J Bacteriol.*, 162(1): 328-334.
- Nies, D. H. 2000: Heavy metal resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles*, 4(2): 77–82.
- Nies, D. H. 2003: Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, 27(2-3): 313-339.
- Nwagwu, C. E.; Moltong, V.; Eucharia, N. y Onwumere, G. B. 2017: Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from Panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, 16(1): 32-40.
- Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Kristiansson, E. y Joakim-Larsson, D. G. 2015: Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1): 964.
- Palacios, A. y García, E. 2014: Extracción de cobalto de escombros lateríticos mediante lixiviación ácida. *Minería y Geología*, 30(2): 73-86.
- Reeves, R.; Baker, A. J. M.; Borhidi, A. y Berazain, R. 1999: Nickel hiperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany*, 83(1): 29-38.

- Samanta, A.; Bera, P.; Khatun, M.; Sinha, C.; Pal, P.; Lalee, A. y Mandal, A. 2012: An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus* sp. isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1): 178-189.
- Schedlbauer, J. L. 2015: Serpentine ecosystem responses to varying water availability and prescribed fire in the U.S. Mid-Atlantic region. *Ecosphere*, 6(7): 108. Consulta: 20/12/2019. <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00528.1>.
- Sidhu, A. K.; Metkar, G. J.; Nandurikar, S. P. y Patil, S. N. 2015: An Investigation on Metal Tolerance and Antibiotic Resistance Properties of Bacterial Strains Isolated From Two Different Drinking Water Sources. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 4(2): 305-313.
- Valcarce, R. M. y Rojas, I. S. 2017: Análisis euclidiano de agrupación aplicado al estudio del yacimiento Yagrumaje Oeste. *Revista Cubana de Ingeniería*, 8(2): 3-10.
- Yik, L. Y.; Lie-Chin, G. J. W.; Budiman, C.; Joseph, C. G.; Musta, B. y Rodríguez, K. F. 2018: Adaptive Strategies of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Acid Mine Drainage Site in Sabah, Malaysia. *Indian J Microbiol*, 58(2): 165-173.

## **Información adicional**

### **Conflicto de intereses**

No se declaran conflictos de intereses

### **Contribución de los autores**

AGS: diseño y ejecución de los experimentos, redacción, y aprobación de versión final. MCRP: ejecución de los experimentos y aprobación de versión final. MGQ: ejecución de los experimentos y aprobación de versión final. MISL: diseño de los experimentos, revisión y aprobación de versión final.

### **ORCID**

AGS, <https://orcid.org/0000-0002-9148-2484>

MCRP, <https://orcid.org/0000-0001-8617-7904>

MGQ, <https://orcid.org/0000-0002-5210-2493>

MISL, <https://orcid.org/0000-0003-3982-486X>

Recibido: 24/01/2020

Aceptado: 25/02/2020