



ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización fenotípica de una colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Cuba

Phenotypic characterization of bacterial collection isolated from the lateritic ore Yagrumaje Norte, Holguin, Cuba

Alexander Govin Sanjudo, Orquidea Coto Perez y Jeannette Marrero Coto

Departamento de Microbiología,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana

* Autor para correspondencia:
agovin@fbio.uh.cu

RESUMEN

En este trabajo, se caracterizó fenotípicamente una colección compuesta por 14 bacterias aisladas del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Holguín, Cuba. Cinco cepas fueron clasificadas como *Serratia marcescens*, cuatro como *Escherichia coli*, dos como *Enterobacter aerogenes* y tres como *Ochrobactrum anthropi*. El 71.4% de las cepas fueron resistentes a níquel. Se informa por primera vez la presencia de la especie *Ochrobactrum anthropi* en suelos de serpentina y además la resistencia a níquel es esta especie. El 85,7% de las cepas solubilizaron fósforo inorgánico y el 50% fijaron dinitrógeno atmosférico. Las cepas de *Serratia marcescens* mostraron un fenotipo no pigmentado y la potencialidad de producir enzimas como lipasas, fosfolipasas, caseinasas, gelatinasas y nucleasas. Todas las cepas mostraron la capacidad de remover Ni(II) y Co (II) de soluciones monometálicas de 25 y 30 ppm, respectivamente. Estos resultados sugieren que los ambientes extremos constituyen una fuente potencial de metabolitos bioactivos de interés para la biotecnología agrícola, médica y ambiental.

Palabras clave: suelos ultramáficos, ecosistemas extremos, adsorción y resistencia bacteriana, metabolitos bioactivos

ABSTRACT

In this work, a collection composed by fourteen bacteria isolated from an ore, Yagrumaje Norte, Holguín, Cuba) was phenotypically characterized. Five strains were classified as *Serratia marcescens*, four as *Escherichia coli*, two as *Enterobacter aerogenes*, and three as *Ochrobactrum anthropi*. 71.4% of strains were resistant to nickel. This is the first report of the isolation of *Ochrobactrum anthropi* from serpentine soils and nickel resistance in this species. The 85.7% of the strains were able to solubilize inorganic phosphate and 50% to fix atmospheric nitrogen. The five strains of *Serratia marcescens*

Recibido: 2014-07-18

Aceptado: 2015-01-20

showed a non-pigmented phenotype and have the potentialities to produce enzymes as lipases, phospholipases, caseinases, gelatinases and nucleases. All strains were capable to remove Ni(II) and Co(II) from 25 and 30 ppm monometallic solution respectively. These results suggest that extreme environments are potential sources of bioactive metabolites with potential application in agricultural, medical biotechnologies and environmentally friendly technologies.

Keywords: *ultramafic soils, extreme ecosystem, adsorption, bacterial resistance, bioactive metabolites*

INTRODUCCIÓN

La diseminación de metales pesados en sedimentos y aguas subterráneas constituye un problema mundial y su solución es un reto para el saneamiento ambiental, debido a que no se dispone de tecnologías eficientes que permitan su total eliminación. Los ecosistemas contaminados con metales pesados representan una amenaza para todos los organismos vivos (Addo *et al.*, 2012). Los elementos metálicos no pueden ser destruidos debido a la imposibilidad de cambiar su estructura nuclear, solamente son transformados de un estado de oxidación o complejo orgánico a otro. Por esta razón han surgido nuevas tecnologías de bajo costo y factibles para el saneamiento y recuperación de los ecosistemas, como la biorremediación.

Los suelos ultramáficos o serpentina son ecosistemas naturales con altas concentraciones de metales pesados como níquel, cromo y cobalto (Chiarucci y Baker, 2007). Además, se caracterizan por su bajo contenido de nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno, potasio y calcio, un desbalance del coeficiente magnesio/calcio y elevados coeficientes de erosión (Bourne *et al.*, 2014). Por todas estas características son considerados ambientes extremos e inhabitables para muchas especies de plantas y microorganismos (Mengoni *et al.*, 2010). A la vez estos suelos constituyen fuente de microorganismos atractivos para la biotecnología ya que sus ventajas adaptativas les permiten sobrevivir en condiciones extremas (Marrero, 2008).

Las formaciones de serpentina de Cuba se reconocen como los sistemas edáficos con mayores niveles de endemismo vegetal, ocupan el 7 % de la superficie del país y sus comunidades microbianas han sido poco estudiadas. El territorio de Moa (Holguín) es reconocido por sus reservas de níquel, en esta región se localiza la mayor industria minero-metalúrgica cubana. En los últimos años, la búsqueda de metabolitos bioactivos de origen microbiano con aplicaciones

biotecnológicas y en el saneamiento ambiental ha ganado gran interés. La microbiota presente en los ambientes extremos como los suelos ultramáficos podría ser fuente potencial de una gran variedad de metabolitos con impacto positivo en el desarrollo de las biotecnologías agrícola, médica y ambiental. El Laboratorio de Biotecnología de los Metales de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana cuenta en la actualidad con una amplia colección bacteriana aislada de diferentes suelos ultramáficos de Cuba como Cajalbana, Pinar del Río; Cuabal Cubanacán, Villa Clara (Amores, 2013); Yacimiento Punta Gorda, Moa (Abinet *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002; Marrero *et al.*, 2007a,b).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente aislamientos del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa (Holguín, Cuba) con el empleo de métodos convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

La descripción y procedencia de los microorganismos empleados en esta investigación se presentan en la Tabla 1. Todas las cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Biotecnología de los Metales de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, a excepción de *Streptococcus pyogenes* donada por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital "Hermanos Ameijeiras".

Caracterización morfológica, cultural y fisiológico-bioquímica

Para ubicar las cepas en el taxón familia se aplicaron las pruebas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reducción de nitrato y fermentación de la glucosa, según Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994).

Tabla 1. Microorganismos de la colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Cuba y fuente de procedencia.

Table 1. Microorganisms of the bacterial collection isolated from Yamugraje Norte, Moa, Cuba, and source of isolated

Cepas	Fuente de referencia y procedencia
Aislamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b, 9a, 9b, 10, 11, 12	Ecosistema extremo: yacimiento de lateritas Yagrumaje Norte, Moa (Holguín), Cuba
Cepa control: <i>Serratia marcescens</i> C-1	Ecosistema extremo: yacimiento laterítico Punta Gorda, Moa (Abín <i>et al.</i> , 2002).
<i>Bacillus</i> sp. VC2	Ecosistema extremo: Cuabal Cubanacán, Villa Clara, Cuba (Amores, 2013).
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	Cepas de referencia pigmentada : Colección Americana de Cultivos tipo (ATCC)
<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121	Cepas de referencia pigmentada: Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares (DSMZ) (Braunschweig).
<i>Serratia marcescens</i> LMG 3271	Cepas de referencia pigmentada: Colección Belga de microorganismos (BCCM/LMG)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Control positivo prueba de hemolisina Cepa donada por el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras.

Para ubicar las cepas en el taxón familia se aplicaron las pruebas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reducción de nitrato y fermentación de la glucosa, según Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994).

Para la clasificación de las cepas hasta el taxón especie se emplearon los sistemas Enterotube II para las enterobacterias y API 20NE para las no enterobacterias. Estos sistemas utilizan diferentes pruebas fisiológico-bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas. En los casos en que fue necesario discriminar entre especies similares, se realizaron las pruebas adicionales según lo indicado por el sistema de identificación correspondiente.

Determinación de la producción de prodigiosina

Teniendo en cuenta que la prodigiosina es un marcador fenotípico para la especie *Serratia marcescens*, se determinó su producción en las cepas clasificadas en esta especie mediante el método propuesto por Goldschmidt y Williams, (1968). Se empleó la cepa *Serratia marcescens* ATCC 8100 como control positivo y la cepa *Serratia marcescens* C-1 como control negativo.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de Ni (II) y Co (II) en medio sólido

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de Mergeay *et al.* (1985). La presencia o ausencia de crecimiento bacteriano se evaluó a los 5 días de incubación a 37°C.

Evaluación de la capacidad de remoción de Ni(II) y Co(II)

Se cultivaron las diferentes cepas a evaluar en medio LB líquido, se incubaron en agitación a 150 r.min⁻¹ durante 16 horas a 37°C. Las células fueron separa-

das del medio de cultivo mediante centrifugación (10 000 r.min⁻¹ durante 10 minutos) y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente la biomasa se secó a 60°C durante 4 horas, se pulverizó en mortero con mango manual, 10mg de biomasa seca se puso en contacto con 10 mL de una solución de 25 ppm de Ni (II) y otra de 30 ppm de Co (II), ambas a pH 4,5. Finalmente se incubaron en agitación a 150 r.min⁻¹ a temperatura ambiente durante 2 horas. La experiencia se realizó por duplicado. Posteriormente las biomásas fueron separadas de las soluciones por centrifugación (Marrero *et al.*, 2009). Para concluir el ensayo a estas soluciones se les determinó el pH y la concentración de iones metálicos Ni (II) y Co (II) mediante el método semicuantitativo "Merckoquant" lo cual permitió el cálculo de los miligramos de metal retenido por gramo de biomasa (q) con empleo de la ecuación propuesta por Vieira y Volesky (2000):

$$q = (C_i - C_f) \cdot V / m$$

... donde:

C_i = Concentración inicial del metal (mg.L⁻¹)

C_f = Concentración final del metal (mg.L⁻¹)

m = masa de la biomasa en la mezcla de reacción (g)

V = Volumen de la mezcla de reacción (L)

Determinación de enzimas exocelulares

Se evaluó la capacidad de hidrólisis de la gelatina (agar gelatina de Frazier), del almidón (agar almidón), de la caseína (agar-leche al 10%), de lípidos (agar-Tween 80), de la lecitina (agar-yema de huevo), hemólisis sobre agar sangre y la actividad desoxirribonucleasa bacteriana (medio ADNasa), según los métodos descritos por Harrigan y McCance (1968), además de

la producción de fosfatasa mediante el método de Nautiyal (1999) y la presencia de la enzima nitrogenasa con empleo del medio Nfb semisólido (medio libre de dinitrógeno).

RESULTADOS

Caracterización morfo-cultural de las cepas

Las características morfológicas, culturales y las pruebas bioquímicas aplicadas se muestran en la Tabla 2. El análisis de estas pruebas permitió ubicar taxonómicamente a once de las cepas en la familia Enterobacteriaceae (2,3,4,5,6,7,8a,9b,10,11,12 y las restantes tres (1, 8b, 9a) como no enterobacterias (Holt *et al.*, 1994).

La identificación hasta nivel de especie se muestra en la Tablas 3 (enterobacterias) y 4 (no enterobacterias). De las once cepas agrupadas como enterobacterias, el mayor porcentaje correspondió a la especie *Serratia marcescens* (45,5 %). Le siguieron en orden decreciente *Escherichia coli* (36,4 %) y *Enterobacter aerogenes* (18,2 %). Las tres cepas no enterobacterias fueron clasificadas como *Ochrobactrum anthropi*.

Producción de prodigiosina.

Ninguna de las cinco cepas de *Serratia marcescens* (2, 3, 7, 8a, 9b) aisladas del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte produjeron prodigiosina a 30°C, al igual

que la cepa *Serratia marcescens* C-1 utilizada como control negativo mientras que la cepa de referencia *Serratia marcescens* ATCC 8100 mostró la típica coloración roja, indicativa de la producción de este pigmento, tanto en el medio agar glicerol a 30°C como en el medio LB a 25°C. Ninguna cepa produjo prodigiosina al ser incubadas a 37°C.

La prodigiosina es un pigmento sintetizado por algunas especies del género *Serratia*. La temperatura requerida para que el pigmento se exprese es de 27°C a 30°C (Williams *et al.*, 1971) y temperaturas iguales o superiores a los 37°C inhiben su síntesis (Giri *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Bharmal *et al.*, 2012).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y la capacidad de biosorción de Ni (II) y Co (II) de las cepas de la colección.

Todas las cepas mostraron mayor resistencia a níquel que a cobalto. Las cepas *Serratia marcescens* (2, 3, 7, 8a y 9b), *Enterobacter aerogenes* (10 y 11) y *Ochrobactrum anthropi* (1, 8b, 9a) crecieron hasta 10 mM de níquel, lo que las clasifica como resistentes a níquel, según Schlegel *et al.* (1991) y las cepas de *Escherichia coli* crecieron hasta 0,5 mM del metal. En el caso del cobalto (II) las cepas crecieron hasta 0,5 mM por lo que fueron sensibles a este metal.

Tabla 2. Características micro morfológicas y culturales de los aislados del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Holguín.

Table 2. Cultural and morphological characteristics of the isolates from the lateritic deposit Moa.

Cepas	1, 8b, 9a	2	3, 7, 8a, 9b	4,5,6,12	10,11	ATCC
Respuesta a la Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-
Cistos	-	-	-	-	-	-
Endospora	-	-	-	-	-	-
Morfología	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos	bacilos
Características culturales	Colonias puntiformes, planas, color beige, de bordes regulares	Colonias de forma circular, iridiscentes, bordes enteros, color beige claro y superficie lisa		Colonias circulares, convexas, lisas de bordes regulares y color beige claro	Colonias circulares, convexas, lisas de bordes regulares y color beige	Colonias de forma circular, iridiscentes, bordes enteros, pigmentadas (rojas) y superficie lisa
Oxidasa	+	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Fermentación de la glucosa	-	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	+	+	+	+	+
Agrupación	No enterobacterias			Enterobacterias		

Legenda: ATCC: *Serratia marcescens* ATCC 8100. +: respuesta positiva, -: respuesta negativa a la prueba

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa según el sistema "Enterotube II".

Table 3. Results of the biochemical and physiological ph tests of the strains from the lateritic deposit "Yagrumaje Norte" (Moa, Holguín) using "Enterotube II" system.

Pruebas Bioquímicas	AISLADOS											Cepa de referencia
	2	3	7	8a	9b	4	5	6	12	10	11	
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Omitina	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Adonitol	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Fenilalanina.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Identificación	<i>Serratia marcescens</i>					<i>Escherichia coli</i>					<i>S.liquefaciens/ E.aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>

Leyenda: *S. liquefaciens*: *Serratia liquefaciens*. *Serratia marcescens*: *Serratia marcescens* ATCC 8100. *E. aerogenes*: *Enterobacter aerogenes*.
+: respuesta positiva, -: respuesta negativa a la prueba.

Las cepas estudiadas tuvieron la capacidad de remover Ni (II) y Co (II) de las soluciones monometálicas de 25 y 30 ppm, respectivamente. La mayoría de las cepas adsorbieron mayor cantidad de Co (II) que de Ni (II) excepto la cepa 2, 3 y 5; esta última removió igual cantidad de Ni (II) y Co (II). La mayor remoción de Co (II) se logró con *Serratia marcescens* cepa 7, seguida de las cepas *Ochrobactrum anthropi* 1, *O. anthropi* 8b, *O. anthropi* 9a y *S. marcescens* 8a (Fig. 1). Los porcentajes de remoción de Co (II) oscilaron entre 27 y 67%, el mayor valor lo alcanzó *Serratia marcescens* cepa 7 mientras que los valores de Ni (II) oscilaron entre 40% y 52%.

Determinación de la capacidad de producción de enzimas exocelulares

Solo las cepas identificadas como *Serratia marcescens* (2, 3, 7, 8a, 9b) tuvieron la capacidad de producir ADNasas, gelatinasas, lipasas, fosfolipasas y caseinasas (Tabla 5). El 85,7 % de las cepas produjeron fosfatasa y el 50% mostraron capacidad diazotrofa al mostrar la formación del un anillo en la interfase el medio Nfb semisólido, después del tercer pase consecutivo en este medio de cultivo sin adición de fuente de nitrógeno.

Tabla 4. Resultados de las cepas (no enterobacterias) mediante el sistema API 20NE.

Table 4. Identified strains by API20NE system.

Pruebas bioquímicas	1	8b	9a
Nitrato (NO ₃)	-	-	-
Triptófano TRP	-	-	-
Glucosa (GLU)	-	-	-
Arginina (ADH)	-	-	-
Urea (URE)	-	-	-
Escualina (ESC)	-	-	-
Gelatina (GEL)	-	-	-
Galactosa (PNPG)	-	-	-
Glucosa (GLU)	+	+	+
Arabinosa (ARA)	+	-	+
Manosa (MNE)	-	-	-
Manitol (MAN)	+	-	+
N acetil Glucosamina (NAG)	+	+	+
Maltosa (MAL)	+	+	+
Gluconato (GNT)	+	+	+
Ácido cáprico (CAP)	-	-	-
Ácido adipico (ADI)	-	-	-
Ácido málico (MLT)	+	+	+
Citrato(CIT)	+	+	+
Ácido fenil acético (PAC)	-	-	-
Oxidasa (OX)	+	+	+
Identificación:	<i>Ochrobactrum anthropi</i>		

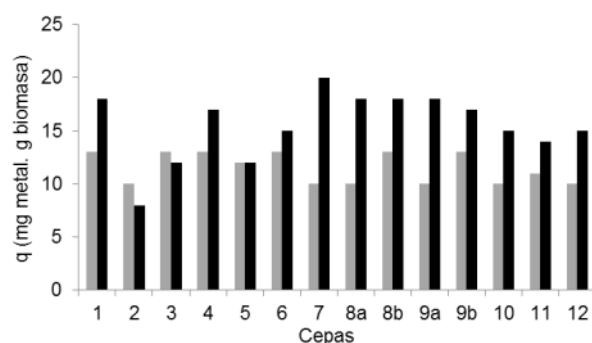
Leyenda: Cepas 1, 8b y 9b. +: respuesta positiva, -: respuesta negativa

Tabla 5. Enzimas producidas por las cepas aisladas del yacimiento laterítico de Moa.

Table 5. Enzymes produce by the strains isolated from the lateritic deposit in Moa.

Enzimas	<i>O. anthropi</i> (1,8b, 9a)	<i>S. marcescens</i> (2, 3, 7, 8a, 9b)	<i>E. coli</i> (4, 5, 6, 12)	<i>E. aerogenes</i> (10, 11)
Nucleasa	-	+	-	-
Fosfolipasa	-	+	-	-
Lipasa	-	+	-	-
Amilasa	-	-	-	-
Gelatinasa	-	+	-	-
Caseinasa	-	+	-	-
Hemolisina	-	-	-	-
Fosfatasa	-	+	+	+
Actividad nitrogenasa	+	-	+	-

+: producción de la enzima, -: no producción de la enzima.

**Figura 1.** Remoción de Ni (II) y Co (II) de soluciones monometálicas, 25 ppm de Ni (II) y 30 ppm de Co (II), por la colección bacteriana. pH 4,5, con un tiempo de incubación de 2 horas a 30°C. (n=2), 150r.min⁻¹. ■ Níquel ■ Cobalto.Figure 1. Ni(II) (25 ppm) and Co (II) (30 ppm) uptake from monometallic solutions by bacterial strains at pH 4,5, incubation time 2h, at 30°C (n=2), 150 r. min⁻¹. ■ Nickel ■ Cobalt.

DISCUSIÓN

Los suelos ultramáficos o de serpentina constituyen un sustrato difícil para la colonización y crecimiento de microorganismos. Una vez más se pone de manifiesto la prevalencia de enterobacterias en los suelos ultramáficos de Moa, Holguín, específicamente, las especies *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y el género *Enterobacter* (Gómez *et al.*, 1999, 2002; Abin *et al.*, 2002; Marrero, *et al.*, 2009). La microbiota presente en estos ecosistemas manifiestan una reducida biodiversidad (Mengoni *et al.*, 2010). Estos suelos constituyen un sistema ideal para el estudio de la genética de la adaptación al hábitat y evolución de nuevas ecovariedades microbianas (Marrero, 2008).

Las cepas resistentes a níquel podrían considerarse buenos candidatos para procesos de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados. Los hábitats de mayor potencialidad para el aislamiento de microorganismos resistentes a metales son los altamente contaminados, como las zonas mineras, los sitios de descarga de desechos de la industria metalúrgica y los derrames industriales (He *et al.*, 2010; Aram *et al.*, 2012; Malik y Aleem, 2011; Rajkumar *et al.*, 2012). La presencia de iones Co (II) en el medio de cultivo ejerció una mayor influencia negativa sobre el crecimiento bacteriano. Actualmente, la caracterización de microorganismos que habitan en ambientes extremos ha recibido una gran atención, debido a que estos ambientes son considerados una fuente de nuevos metabolitos bioactivos con una elevada estabilidad en estas condiciones, resultando atractivos para procesos industriales como la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos, tratamiento de residuales, extracción de petróleo y diagnóstico y tratamiento de enfermedades (van den Burg, 2003). Las cinco cepas de *Serratia marcescens* no pigmentadas, productoras de ADNasa, gelatinasa, fosfolipasa, lipasa, caseinasa, no productoras de hemolisinas, con potencialidad de solubilizar fósforo inorgánico y además resistentes a Ni (II) revelan el valor práctico de esta colección bacteriana.

Estas cepas son candidatos promisorios en diversos procesos biotecnológicos como: las biotecnologías agrícola, ambiental y médica. La colonización de diversos hábitat por *Serratia marcescens* se ha relacionado con la producción de un amplio espectro de sustancias extracelulares que incluyen quitinasas,

proteasas, lipasas, nucleasas y bacteriocinas (Mukesh Kumar *et al.*, 2012; Mohankumar *et al.*, 2011). La no producción de hemolisinas es favorable para sus posibles aplicaciones porque las hemolisinas son factores de virulencia (Madigan *et al.*, 2014). Las ADNasas son empleadas en diferentes vías de recombinación para eliminar genes dañados en la cadena del ADN. Las aplicaciones de estas enzimas incluyen la terapia de genes para enfermedades genéticas, ingeniería genética y antitumorales (Kamble y Kadu, 2012).

La ausencia de la capacidad de síntesis de prodigiosina en las cepas autóctonas del yacimiento niquelífero Yagrumaje Norte (Moa) pudo deberse a un largo proceso de adaptación en un tipo de suelo muy evolucionado con altos contenidos de metales pesados y sequía edáfica. Este ambiente extremo pudo haber contribuido a su selección natural y posiblemente haya influido en la evolución de la especie, lo cual permitió que prevalecieran cepas resistentes a Ni (II) no pigmentadas (Marrero, 2008), quien lo informó por primera vez al caracterizar molecularmente cepas de *Serratia marcescens* aisladas del yacimiento Punta Gorda, Moa. Posteriormente, este hallazgo también fue confirmado cuando se identificaron 8 nuevas cepas en la especie *S. marcescens* aisladas del mismo yacimiento laterítico (Díaz, 2013). Los resultados que aquí se presentan avalan lo planteado por Marrero (2008) respecto a la selección natural y contribución a la evolución de la especie *S. marcescens*, lo cual confirma la presencia de nuevos representantes infraespecíficos con un fenotipo distintivo (colonias no pigmentadas y resistentes a Ni y Co) de *S. marcescens*, prevaleciente en el ecosistema ultramáfico del territorio de Moa, Cuba.

En la literatura científica consultada no se ha informado la presencia de *Ochrobactrum anthropi* en suelos ultramáficos por lo que este constituye el primer informe de esta especie en ecosistemas extremos así como su resistencia y capacidad de remover Ni(II) y Co(II) con posible aplicación biotecnológica.

Las bacterias, con la capacidad para fijar dinitrógeno atmosférico y solubilizar el fósforo inorgánico (fosfato tricálcico) provenientes de suelos ultramáficos, presentan ventajas con respecto a cepas de otros ecosistemas, debido a su potencialidad natural para resistir la baja fertilidad de los suelos ultramáficos (bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo) y las altas concentraciones de metales pesados. Los microorganis-

mos aislados del depósito de serpentina con la capacidad de fijar dinitrógeno atmosférico y solubilizar fósforo son promisorios para ser aplicados en procesos de biorremediación como la fitorremediación y fitominería, ya que pueden favorecer la nutrición vegetal en los ecosistemas mineros la cual se ve muy afectada.

La biosorción del metal por la biomasa microbiana depende fundamentalmente de los componentes de la célula, especialmente, la superficie celular y la estructura espacial de la pared celular (Basurco y Torrem, 2010). Todas las bacterias empleadas en esta investigación son Gram negativas. Las estructuras celulares en estas entidades se caracterizan por la presencia de la membrana externa compuesta por lipopolisacáridos y fosfolípidos, los cuales pueden ofrecer abundantes grupos funcionales para la unión de estos metales. Los grupos más importantes son carbonilo (cetona), carboxilo, sulfhidrilo (tiol), sulfonato, tioéter, aminas secundarias, amidas, imina, imidazol, fosfonato, fosfodiéster (Abdel-Monem *et al.*, 2010; Chojnacka, 2010). La composición química del peptidoglicano de la pared celular bacteriana puede también tributar con los centros activos, como grupos carboxilos, hidroxilos y aminos para el secuestro o intercambio con los iones Ni (II) y Co (II). Los microorganismos aislados a partir de ecosistemas con metales pesados utilizados como biosorbentes, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con las soluciones de los metales. Esto podría minimizar los costos en un proceso de biorremediación. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos y sus estudios se encuentra en crecimiento constante (Macaskie *et al.*, 2010; Singh y Gadi, 2012a,b; Orandi y Lewis, 2012; Dhal *et al.*, 2013).

A diferencia de los procesos basados en el empleo de células vivas, los procesos de biosorción (biomasa muerta) no requieren de sistemas de cultivo con consumo de nutrientes, ni son afectadas por los residuos tóxicos del proceso. Además, presentan una mayor sensibilidad ante bajas concentraciones de metales, mayor efectividad para la posterior recuperación del metal y pueden ser almacenadas con facilidad (Alam y Ahmad, 2011).

En esta investigación la biomasa fue inactivada por calor por lo que se descarta el mecanismo de acumulación intracelular de los iones níquel y cobalto por

sistemas de proteínas transportadoras que pueden incorporarlos al citosol (Marrero *et al.*, 2007b).

Se identificaron 14 nuevas cepas bacterianas pertenecientes a la colección microbiana del Laboratorio de Biotecnología de los Metales de la Facultad de Biología: cinco de estas fueron identificadas como *Serratia marcescens*, cuatro como *Escherichia coli*, dos como *Enterobacter aerogenes* y tres cepas como *Ochrobactrum anthropi*. Todas las cepas de las especies *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* y *Ochrobactrum anthropi* fueron resistentes a Ni (II). Las cepas de *Serratia marcescens* (2, 3, 7, 8a, 9b) aisladas del yacimiento de Yagrumaje Norte, ambiente extremo, caracterizadas por presentar un fenotipo no pigmentado y sintetizar metabolitos bioactivos (desoxirri-bonucleasa, lipasa, fosfolipasa, gelatinasa, caseinasa); son promisorias para ser empleadas en procesos de fitorremediación y poseen la capacidad de remover Ni (II) y Co (II) lo que las convierte en buenas candidatas para su empleo en la biotecnología ambiental y médica.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Monem, M.O.; A. H. S. AL-Zubeiry y A. A. S. AL-Gheethi (2010) Biosorption of nickel by *Pseudomonas cepacia* 120S and *Bacillus subtilis* 117S. *Water Sci. & Tech.* 61: 2994-3007.
- Abin, L., O. Coto, Y. Gómez y K. Boserker (2002) Isolation and characterization of indigenous microbiota from lateritic nickel ore of Moa mine. *Rev. Biol.* 16: 66-68.
- Addo, M. A., E. O. Darko, C. Gordon, B.J.B. Nyarko *et al.* (2012) Evaluation of heavy metals contamination of soil and vegetation in the vicinity of a Cement Factory in the Volta Region, Ghana. *Int. J. Sci. Tech.* 2 (1): 40-50.
- Alam, M. Z. y S. Ahmad (2011) Chromium Removal through Biosorption and Bioaccumulation by Bacteria from Tannery Effluents Contaminated Soil. *Clean – Soil, Air, Water* 39 (3): 226-237.
- Amores, I. (2013) Caracterización de dos rizobacterias aisladas de plantas acumuladoras de níquel. Tesis de Maestría. Facultad de Biología Universidad de La Habana.
- Aram, M., A. Sharifi, F. Kafeelzadeh, M. Naghmachi *et al.* (2012) Isolating Mercury-resistant Bacteria from Lake Maharloo. *Int. J. Biol.* 3: 63-71.
- Basurco, J. E. y M. L. Torem (2010) Biosorption of aluminum ions onto *Rhodococcus opacus* from wastewaters. *Chem. Eng. J.* 161: 1-8.
- Bergey, D.H., F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer *et al.* (1923) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Bredner y Farmer.
- Bharmal M. H., N. J. Nasser y K. Aruna (2012) Study on optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* MSK1 isolated from air. *Int. J. Adv. Biol. Res.* 2(4): 671-680.
- Bourne, E., D. Mina, S.C. Gonçalves, J. Loureiro, *et al.* (2014) Large and variable genome size unrelated to serpentine adaptation but supportive of cryptic sexuality in *Cenococcum geophilum*. *Mycorrhiza* 24:13-20.
- Chiarucci, A. y G. Baker (2007) Advances in the ecology of serpentine soil. *Plant soil* 293: 1-2.
- Chojnacka, K. (2010) Biosorption and bioaccumulation-the prospects for practical applications. *Env. Int.* 36: 299-307.
- Dhal, B., H.N. Thatoi, N.N. Das y B.D. Pandey (2013) Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *J. Hazardous Mat.* 250: 272- 291.
- Díaz, A. (2013) Caracterización de la resistencia a metales de una colección bacteriana aislada del yacimiento niquelífero de Moa (Cuba) y sus potencialidades en la biorremediación ambiental de sitios contaminados por metales pesados. Tesis de Doctorado. Universidad de La Habana, Universidad de Cádiz.
- Giri, A.V., N. Anandkumar, G. Muthukumar y G. Pennathur (2004) A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology* 4: 1-10.
- Goldschmidt, M. C. y R. P. Williams (1968) Thiamine induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosina. *J. Bacteriol.* 96:609-616.
- Gómez Y., O. Coto, L. Abín y C. Hernández (2002) Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y/o cobalto. *Cien. Biol. CENIC* (1). 33.
- Gómez Y., O. Coto, J. Capote, L. Abin *et al.* (1999) Nickel-resistant bacteria from cuban laterite soils. En: Amils, R. y A. Ballester (Eds) *Biohydrometallurgy Processing. Part A*: 673-679, Madrid.
- Harrigan, W.F y M. E. McCance (1968) *Métodos de Laboratorio en Microbiología*. Editorial Academia. España.
- He, M., X. Li, L. Guo, S.J. Miller, *et al.* (2010) *Microbiology Journal* 10:1-10.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley y S. T. Williams (1994) En: Williams y Wilkins (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. pp.787. Baltimore. USA.
- Kamble, K. y D. Kadu (2012) Enhancement of DNase production from a moderate halophilic bacterium and studies on its phylogeny. *Int. J. Env. Sci.* 3(3): 1031-1037
- Kim, S.J., H.K. Lee y J.H. Yim (2009) Statistical optimization of medium components for the production of prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1903-1907.
- Macaskie, L.E., I.P. Mikheenko, P. Yong, K. Deplanche, *et al.* (2010) Today's wastes, tomorrow's materials for environmental protection. *Hydrometallurgy* 104: 483-487.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley *et al.* (2014) *Brock. Biology of Microorganisms*. Fourteenth Edition. 23: 714 -721.
- Malik, A. y A. Aleem (2011) Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural

- soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ. Monit. Assess.* 178:293–308
- Marrero, J. (2008) Estudio molecular de la resistencia a níquel y cobalto en *Serratia marcescens* C-1, Tesis de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
- Marrero, J. G. Auling, O. Coto y D. H. Nies (2007a) High-Level Resistance to Cobalt and Nickel but Probably No Transenvelope Efflux: Metal Resistance in the Cuban *Serratia marcescens* Strain C-1. *Microbial Ecol.* 53, 123–133.
- Marrero, J., A. Díaz, A. Valle, D. Cantero, J.M. Gómez y O.Coto (2009) Nickel and cobalt removal capacities of native metal-resistant bacteria. *Adv. Materials Res.* 71-73: 617-620.
- Marrero, J., G. Auling, O. Coto y D. Nies (2007b) High-Level Resistance to Cobalt and Nickel in Cuban *Serratia marcescens* strains isolated from serpentine deposits. *Adv. Materials Res.* 20-21: 521-525.
- Mengoni A., S. Henk, J. Vangronsveld (2010) Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant and Soil*, 331: 5-16.
- Mergeay, M., L. D. Nies, H. G. Schlegel, J. Gerits, *et al.* (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162(1): 328-334.
- Mohankumar A. (2011) Production and Characterization of Serrati-opeptidase Enzyme from *Serratia marcescens*. *Int. J. Biol.* 3: 39-51.
- Mukesch Kumar, D.J. L. Lawrence, R. Rajan, S. Priyadarshini *et al.* (2012) Characterization of lipase and protease from *Serratia marcescens* DEPTK21 and its destaining capability. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 3: 621-628.
- Nautiyal C S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS. Microbiol. Lett.* 170: 265-270.
- Nies, D. H. (1999) Microbial heavy-metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750.
- Orandi, S. y D.M. Lewis (2012) Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor—a batch process study. *Appl. Microbiol. Biotechnol. Online*. DOI 10.1007/s00253-012-4316-5.
- Rajkumar, B., G. D. Sharma y A. K. Paul (2012) Isolation and Characterization of Heavy Metal Resistant Bacteria from Barak River contaminated with Pulp Paper Mill Effluent, South Assam. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89:263–268
- Rajkumar, M., M. Narasimha, P. F. Varay y A. Noriharu (2009) Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals, *Biotechnology* 29(2): 120-130.
- Schlegel, H.G., J.P. Cosson y A. Baker (1991) Nickel hyperaccumulating plants provide a niche for nickel resistant bacteria. *Bot. Act.* 104: 18-25.
- Singh, N y R. Gadi (2012 a) Removal of Ni (II) and Cu (II) from their solutions and waste water nonliving biomass of *Pseudomonas oleovorans*. *Hydrol. Curr. Res.* 3(1): 1-3.
- Singh, N y R. Gadi (2012 b) Bioremediation of Ni(II) and Cu(II) from wastewater by the nonliving biomass of *Brevundimonas vesicularis*. *J. Env. Chem. Ecotox.* 4(8): 137-142
- van den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Op. Microbiol.* 6:1-6
- Vieira, R. H. y B. Volesky (2000) Biosorption a solution to pollution? *Int. Microbiol.* 3 (1): 17-24.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Annia Hernández