

## CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS* ENDÓFITAS DE LA PLANTA HIPERACUMULADORA DE NÍQUEL *Leucocroton havanensis*

### CHARACTERIZATION OF ENDOPHITE *BACILLUS* SEEDS OF THE NICKEL HYPERACUMULATOR PLANT *Leucocroton havanensis*

**Alexander Govin<sup>1</sup>, Magdia Guerra<sup>1</sup>, Marian de la C. Reyes<sup>1</sup>**

(1) Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Calle 25 No. 455 entre I y J, Plaza de la Revolución, La Habana - Cuba  
(e-mail: agovin@fbio.uh.cu, agovin89@gmail.com)

Recibido: 21/05/2020 - Evaluado: 03/07/2020 - Aceptado: 10/08/2020

#### RESUMEN

En este trabajo se caracterizan bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis*. Se emplearon tres cepas pertenecientes al género *Bacillus*. Se evaluó la tolerancia a Ni (II), la influencia de la temperatura y el pH en el crecimiento, así como la influencia del metal en la producción de ácido indolacético, amoníaco y en la fijación biológica de dinitrógeno. Se determinó la solubilización bacteriana de níquel. Las cepas crecieron en intervalos de temperatura de 30- 50 °C, a valores de pH de 5- 9 y hasta 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II). Las cepas producen AIA, amoníaco y fijan dinitrógeno en presencia de 5 mmol. L<sup>-1</sup> de níquel. Además, solubilizaron más del 70% del níquel incorporado en el medio de cultivo en forma de carbonato de níquel. Las bacterias endófitas de *L. havanensis* presentan características que las hacen interesantes para ser evaluadas en alternativas de fitorremediación.

#### ABSTRACT

In this work, endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulating plant *Leucocroton havanensis* are characterized. Three strains belonging to *Bacillus* genus were used. It was evaluated the tolerance to Ni (II), the influence of temperature and pH in growth, as well as the influence of metal in the production of indolacetic acid, ammonia and in the biological fixation of dinitrogen. Bacterial solubilization of nickel was determined. The strains grew in temperature intervals of 30-50 °C, at pH values of 5- 9 and up to 10 mmol. L<sup>-1</sup> Ni (II). The strains produce AIA, ammonia and fix dinitrogen in the presence of 5 mmol. L<sup>-1</sup> of nickel. In addition, they solubilize more than 70% of the nickel incorporated in the culture medium in the form of nickel carbonate. Endophytic bacteria of *L. havanensis* present characteristics that make them interesting to be evaluated in phytoremediation alternatives.

Palabras clave: *Bacillus*, fitoacumulación, solubilización de níquel, tolerancia a níquel  
Keywords: *Bacillus*, phytoaccumulation, nickel solubilization, nickel tolerance

## INTRODUCCIÓN

La rápida urbanización, la industrialización, la minería y las prácticas agrícolas con el uso de pesticidas y fertilizantes químicos constituyen las principales fuentes de contaminación por metales pesados en el ambiente (Ali *et al.*, 2019). A diferencia de los contaminantes de origen orgánico, los metales no son degradados ni química ni biológicamente y una vez liberados al medio ambiente pueden persistir en los ecosistemas e incorporarse a las cadenas tróficas, donde aumentan su toxicidad, de ahí que constituyen una amenaza para la salud de los organismos (Lv *et al.*, 2018; Naguib *et al.*, 2018).

Los métodos físicos y químicos de remediación además de ser costosos y dañinos afectan la calidad del suelo y la biodiversidad. En este sentido los métodos biológicos han ganado un lugar importante y dentro de estos las técnicas de fitorremediación las que se consideran una alternativa sostenible, rentable y amigable para el medio ambiente (Lal *et al.*, 2018). Las fitotecnologías emplean plantas que absorben, degradan o inmovilizan los contaminantes (Yahaghi *et al.*, 2018). La fitoextracción (fitoacumulación) es una de estas técnicas donde las plantas que se utilizan se caracterizan por capturar y acumular los metales, principalmente en sus órganos aéreos (Visioli *et al.*, 2015b). Las plantas hiperacumuladoras de metales son candidatas ideales para estas tecnologías debido a su capacidad de acumular estos compuestos en sus retoños sin manifestar síntomas de fitotoxicidad (Visioli *et al.*, 2015a). El éxito del proceso se ve limitado, muchas veces, por el lento crecimiento y la escasa producción de biomasa del vegetal ante las condiciones de estrés impuestas por las altas concentraciones de los metales pesados (Pan *et al.*, 2016, Xu *et al.*, 2016).

La microbiota asociada a las plantas pueden mitigar los efectos negativos de los contaminantes metálicos (Ashraf *et al.*, 2017), lo que tributa a mejoras en la fitorremediación. En los últimos años, las bacterias endófitas de plantas hiperacumuladoras han ganado un interés particular porque protegen al vegetal contra el estrés abiótico a través de la producción sustancias poliméricas extracelulares y de enzimas antioxidantes (Ma *et al.*, 2016). Además, pueden estimular el crecimiento vegetal al producir amoníaco, sideróforos, fitohormonas como el ácido indolacético y fijar dinitrógeno atmosférico, así como solubilizar fósforo y potasio (Khan *et al.*, 2020). A esto se le suma que pueden favorecer la solubilización de los metales, su biodisponibilidad y la captura por la planta contribuyendo a lograr una mayor acumulación de estos (Visioli *et al.*, 2015b). Estas características las convierten en una potente herramienta en la fitorremediación.

*Leucocroton havanensis* Borhidi (Euphorbiaceae) es un arbusto perenne, que puede acumular hasta 1900  $\mu\text{g}$ .  $\text{g}^{-1}$  de níquel en sus hojas, es una planta hiperacumuladora de níquel (Alfonso *et al.*, 2017). Es endémica de Cuba y solamente se ha encontrado en los suelos de serpentina de las Lomas de Galindo y Loma de la Coca en la provincia Mayabeque y La Habana respectivamente. Se demostró que esta planta puede acumular níquel *in vitro* (Alfonso & Matrella, 2013). La selección de bacterias endófitas de esta planta con características de promoción del crecimiento vegetal podría constituir una excelente alternativa para mejorar la fitorremediación. Por esto, el objetivo de la presente investigación es caracterizar tres bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se emplearon tres cepas pertenecientes al género *Bacillus* (R1, R5 y R18), endófitas de la raíz de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis* Borhidi (Govin, 2016). Las mismas pertenecen a la Colección de Cultivos Microbianos del Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

### Influencia de la temperatura y el pH en el crecimiento

A partir de precultivos de 18 horas, 150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  a 30°C en caldo Luria Bertani (10 g de triptona, 5g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 L de agua destilada, pH 7,2). Se inocularon tubos con 5 mL del mismo medio. Para

evaluar la influencia del pH en el crecimiento, el pH inicial del medio se ajustó a diferentes valores (5, 6, 7, 8, 9 y 10) mediante el empleo de soluciones de HCl y NaOH respectivamente. Los cultivos se incubaron a 30°C, 150 r.min<sup>-1</sup>, durante 18 horas. Para evaluar la influencia de la temperatura en el crecimiento, se inocularon las cepas en caldo LB y se incubaron a 30, 37, 42, 45, 50 y 60°C, a 150 r.min<sup>-1</sup> durante 18 horas. El crecimiento se determinó mediante la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a  $\lambda = 600$  nm. La experiencia se realizó por triplicado.

#### Determinación de la tolerancia a Ni (II)

La tolerancia a Ni (II) se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria en medio mínimo Tris (MMT) (Mergeay *et al.*, 1985) líquido. A partir de cultivos en MMT (6,06 g de Tris, 4,68 g de NaCl, 1,49 g de KCl, 1,07 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,43 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g de MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,03 g de CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,23 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 0,005 g de citrato de hierro y amonio, 1 mL de solución de elementos traza SL7, 0,2% (p/v) de glucosa como fuente de carbono, 1000 mL de agua destilada, pH 7,0) líquido de 18 horas a 30°C y 150 r.min<sup>-1</sup>, se estandarizó el inóculo (tubo 0,5 de la escala de McFarland). Se inocularon tubos de cultivo con 5 mL de MMT y concentraciones crecientes de Ni (II) (0, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,5, 5,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0 y 20,0 mmol. L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron a 30°C; 150 r.min<sup>-1</sup> durante 18 horas. Se registró el crecimiento bacteriano mediante la absorbancia en espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a  $\lambda = 600$  nm. La experiencia se realizó por triplicado.

#### Influencia del Ni (II) en la producción de AIA, amoníaco y en la fijación biológica de dinitrógeno

Para la producción de AIA se inocularon las cepas en caldo LB suplementados con 1 mg. mL<sup>-1</sup> de L- triptófano y 0, 5 o 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II). Los cultivos se incubaron a 30°C durante 96 horas a 150 r. min<sup>-1</sup>. La concentración de AIA se registró a las 96 horas mediante la metodología de Bric *et al.* (1991). Se diseñó una curva patrón a partir de diferentes concentraciones de ácido indolacético comercial teniendo en cuenta los valores promedio de producción de AIA informados en la literatura (Asaf *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2019). La experiencia se realizó por triplicado.

La fijación biológica de dinitrógeno atmosférico se estudió a través del crecimiento de las cepas en el medio libre de nitrógeno (Nfb) semisólido: ácido málico 3g/L; glucosa 2g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05%, MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O 0,02%; NaCl 0,01%, CaCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O 2 mL (sol.1%); azul de bromotimol 2 mL (0.5% en KOH 0.2N); solución de micronutrientes 2 mL, EDTA-Fe 4 mL (sol 1.64%); solución de vitaminas 1 mL, agar: 2g/L (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009) suplementados con diferentes concentraciones de Ni (II) (0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron a 30°C, por 48 horas. Se realizaron cinco pases sucesivos en este medio (Xinxian *et al.*, 2010). El crecimiento en el tubo de cultivo del último pase se consideró una evidencia cualitativa de la fijación de dinitrógeno atmosférico.

La producción de amoníaco se determinó a través del cultivo de las cepas en agua peptona (peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>) con diferentes concentraciones de níquel (0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 30°C, en estático. La producción de amoníaco se detectó por la aparición de la coloración naranja-marrón en los cultivos al adicionar 0,5 mL de reactivo de Nessler (Mardanova *et al.*, 2017).

#### Solubilización "in vitro" de níquel a partir de carbonato de níquel

La solubilización "in vitro" de níquel a partir de la sal insoluble carbonato de níquel, se evaluó en medio mínimo Tris suplementado con 0,5 g.L<sup>-1</sup> de níquel en forma de carbonato de níquel. Los cultivos se incubaron a 30°C a 150 r.min<sup>-1</sup>, durante 360 horas (Xinxian *et al.*, 2010). Se tomaron muestras a las 24, 96, 144 y 192, 240 y 360 horas de incubación, se determinó el pH del medio y la concentración del níquel en solución, a través de espectrometría de absorción atómica (equipo Philips 9100, con llama de aire-acetileno). El control negativo comprendió medio de cultivo con carbonato de níquel sin inocular. La experiencia se realizó por triplicado.

## Análisis biométricos

La comparación de las medias, de los valores de absorbancia del crecimiento en diferentes temperaturas, pH, concentraciones de Ni (II) se determinó mediante un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con nivel de significación 0,05. Para determinar las concentraciones de AIA se realizó una regresión lineal a partir de los datos obtenidos con las soluciones estándar de AIA comercial y se siguió el mismo análisis de comparación de medias a los valores de absorbancia. Para el ANOVA de los porcentajes de solubilización, los datos se transformaron a logaritmo antes de realizar los análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron con el empleo del programa STATISTICA versión 8.0 (StatSoft 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia de la temperatura y pH en el crecimiento bacteriano

Las tres cepas crecieron en los intervalos de pH de 5 a 9 y se registró menor crecimiento cuando el medio se ajustó a pH 10 (Figura 1A). En el caso de la cepa R1 el mayor crecimiento se detectó en los intervalos entre 5 y 9, sin diferencias significativas entre los valores de absorbancia. Mientras que el mayor crecimiento de las cepas R5 y R18 se observó en el pH 6, seguido de los pH 5 y 7 en estos últimos no se detectó diferencias significativas entre los valores de absorbancia. La identificación de las especies dentro del género *Bacillus* se consideran una de las más complejas, se indican que algunas especies pueden crecer en intervalos de pH de 5 a 10, encontrándose especies alcalófilas que cuyo valor de pH óptimo es 10 como por ejemplo *B. agaradhaerens*, *B. clarkii*, *B. pseudocalophilus*, *B. vedderi* asimismo se encuentran miembros de este género que crecen en medios ligeramente ácidos como es el caso de las especies *Bacillus fumarioli* y *Bacillus naganoensis* (Logan & De Vos, 2009). Las variaciones en el pH afectan a las proteínas de la membrana citoplasmática de los microorganismos debido a cambios del estado de ionización, provocando la alteración de los sistemas de transporte celulares (Saikia *et al.*, 2013).

Por otro lado, las cepas crecieron en el intervalo de temperaturas comprendidos entre 30 y 50°C (Figura 1B). Se observó una disminución del crecimiento al aumentar la temperatura. El aumento de la temperatura puede afectar la actividad enzimática, influyendo negativamente en el metabolismo de la célula y por lo tanto afecta el crecimiento, puede causar la muerte celular, debido a la desnaturalización de las enzimas y puede desintegrar la bicapa lipídica de la membrana (Indah *et al.*, 2017). Las cepas R1 y R5 mostraron los mayores valores de absorbancia en las temperaturas 30 y 37°C, mientras que en la cepa R18 se alcanzaron a 30°C. Teniendo en cuenta estos resultados las tres cepas son mesófilas (Madigan *et al.*, 2019).

### Tolerancia a Ni (II)

Las tres cepas en estudio mostraron en general un comportamiento similar, al registrarse una disminución en los valores de absorbancia con el aumento de la concentración de Ni (II) en el medio de cultivo (Figura 2). Las cepas R5 y R18 crecieron hasta 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II), mientras que la cepa R1 creció hasta 12 mmol. L<sup>-1</sup>.

La tolerancia a metales pesados es una característica distintiva de bacterias endófitas de plantas hiperacumuladoras de metales. Los resultados de la tolerancia a Ni (II) observados en estas cepas avala la hipótesis de que las bacterias endófitas aisladas de plantas hiperacumuladoras de metales toleran el metal que la planta acumula. La planta *Leucocroton havanensis* hiperacumula más de 19 169 µg de Ni por gramo de peso seco en las hojas (Alfonso & Matrella, 2013). Aunque las bacterias endófitas en estudio fueron aisladas de la raíz, se plantea que en este sitio es donde el metal se encuentra más biodisponible para la bacteria porque en las hojas se acumula en las vacuolas, por esta razón las bacterias aisladas de la raíz generalmente toleran concentraciones mayores del metal comparado con las aisladas de las hojas (Barzanti *et al.*, 2007). Como resultado de la colonización de los tejidos de las plantas hiperacumuladoras, las bacterias endófitas han desarrollado mecanismos que les permite tolerar las altas concentraciones de metales pesados (Idris *et al.*,

2004; Visioli *et al.*, 2014). Los resultados de tolerancia a Ni observados en estas bacterias están en correspondencia a los informados en bacterias endófitas de las plantas hiperacumuladoras de Ni *Thlaspi goesingense* y *Alysum bertoloni*, donde los aislados de las mismas, toleraron de 5 mmol. L<sup>-1</sup> a 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II) (Idris *et al.*, 2004; Barzanti *et al.*, 2007). También los aislados bacterianos endófitos (raíz) de la planta *Noccaea caerulescens* toleraron concentraciones entre 1 mmol. L<sup>-1</sup> y 6 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II) (Visioli *et al.*, 2014). En el caso de los endófitos de la planta acumuladora de níquel *Alysum serpyllifolium*, la tolerancia a este metal varió entre 12 mmol. L<sup>-1</sup> y 17 mmol. L<sup>-1</sup> (Ma *et al.*, 2011). La tolerancia bacteriana al metal que la planta acumula se informó en estudios de endófitos de la planta *Pteris vittata* (hiperacumuladora de As) en el que los aislados crecieron en presencia de concentraciones superiores a 45 mmol. L<sup>-1</sup> de As (Gu *et al.* 2018).

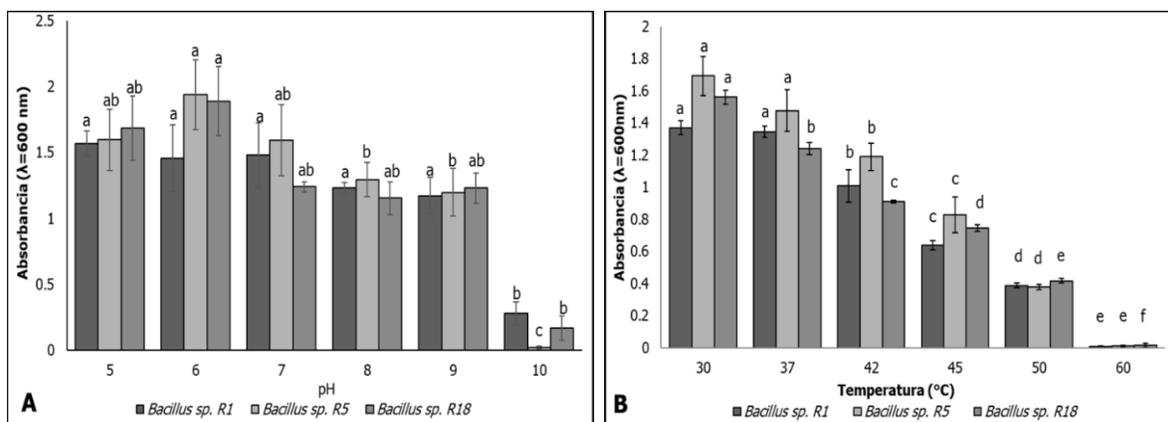


Fig. 1: Crecimiento de las cepas endófitas en caldo LB, (A) influencia del pH en el crecimiento (B) influencia de la temperatura, durante 18 horas a 150 r.min<sup>-1</sup>. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre una misma cepa, Tukey (n=3, p<0,05).

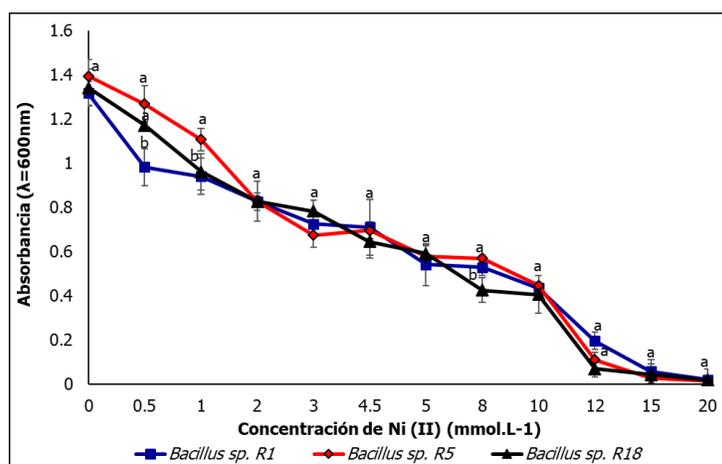


Fig. 2: Crecimiento de las cepas en presencia de diferentes concentraciones de Ni (II). Los cultivos se incubaron a 30°C durante 18 horas a 150 r.min<sup>-1</sup>. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar (n=3).

El estudio de la tolerancia a metales pesados se puede realizar tanto en medios sólidos como en medios líquidos, generalmente en el medio líquido el valor es menor teniendo en cuenta que en estos el metal está más disponible para la célula y por tanto afecta más el crecimiento (Govin *et al.*, 2020). La tolerancia a metales pesados constituye una de las características que se desean en los microorganismos que se aplican en la fitorremediación. Estos resultados permiten definir las concentraciones más adecuadas para el cultivo de las

cepas en presencia del metal. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron las concentraciones de 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II) para determinar la influencia de este metal en las características de promoción del crecimiento vegetal.

#### Influencia del Ni (II) en la promoción del crecimiento vegetal

Todas las cepas produjeron ácido indolacético en ausencia de Ni (II) (Figura 3). En los medios suplementados con 10,0 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II) se registraron las menores concentraciones de AIA; en estos, los valores disminuyeron más de cinco veces a los observados en los medios sin el metal y con 5 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II). La producción de AIA por las cepas R5 y R18 en presencia de 5 mmol. L<sup>-1</sup> del metal, no mostró diferencias significativas con respecto a los cultivos en ausencia del metal, a diferencia de la cepa *Bacillus* sp. R1 en la que se manifestó un efecto negativo del metal en la producción de la fitohormona.

Resultados similares se informaron en la cepa *Bacillus megaterium* SR28C a la que se le evaluó la producción de AIA en presencia de 100, 200 y 300 mg/L de Ni (II). La mayor producción de este compuesto se registró en presencia de 100 y 200 mg/L del metal (Rajkumar *et al.*, 2013). Asimismo, Zhang *et al.* (2015) informaron que las bacterias endófitas aisladas de la raíz, el tallo y las hojas de la planta hiperacumuladora de manganeso (*Mn*) *Phytolacca americana* sintetizaron de 1,8 µg. mL<sup>-1</sup> a 48,3 µg. mL<sup>-1</sup> de AIA en ausencia del metal. Sin embargo, bajo el estrés de Mn, la producción de AIA de las bacterias varió desde 0,2 µg. mL<sup>-1</sup> hasta 17,4 µg. mL<sup>-1</sup>, observándose en este último caso una significativa disminución en la concentración de AIA. Mukherjee *et al.* (2018), aislaron bacterias endófitas de la planta tolerante a arsénico *Lantana camara*, las que sintetizaron AIA en presencia de 1000 mg. L<sup>-1</sup> de As.

El ácido 3- indolacético es una de las auxinas de mayor interés por su efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal. Este favorece la elongación celular, la división celular, la iniciación y elongación de las raíces, por lo que su producción se considera una de las características fundamentales presentes en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Khan *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016).

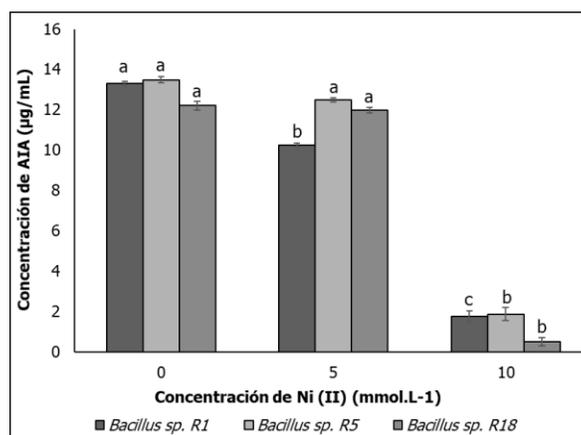


Fig.3: Producción de AIA de las tres cepas de *Bacillus* en en medio LB suplementado con triptófano y diferentes concentraciones de níquel (0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup>). Los cultivos se incubaron a 30°C durante 96 horas a 150 r.min<sup>-1</sup>. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones ± desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de una misma cepa, Tukey (n=3, p<0,05).

En el caso de la fijación biológica de N<sub>2</sub> atmosférico, los tres aislados crecieron en el medio libre de nitrógeno (Nfb) en ausencia de Ni (II) y con 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup> del metal después de cinco pases consecutivos, lo que indica su capacidad de fijar dinitrógeno atmosférico. En la Figura 4A se muestra el crecimiento de la cepa R1, el resto de los aislados mostraron un comportamiento muy similar. A las 24 horas se observó un halo traslúcido solo en

aquellos medios que no presentaban níquel en su composición, sin embargo, a las 48 horas esta respuesta se mostró en todos los medios, lo que evidencia la influencia del Ni (II) en este proceso.

En todos los cultivos en agua de peptona se observó una coloración roja- naranja al adicionar el reactivo de Nessler comparado con los controles abióticos (control 0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup>), lo que indica la producción de NH<sub>3</sub>. En la Figura 4B, se muestra la respuesta de la cepa R1, este comportamiento fue similar en las cepas R5 y R18. La coloración fue más intensa en el medio que no presentaba níquel y disminuyó su intensidad al aumentar la concentración del metal. Estas respuestas muestran la influencia negativa del aumento la concentración de níquel en la producción de amoníaco.

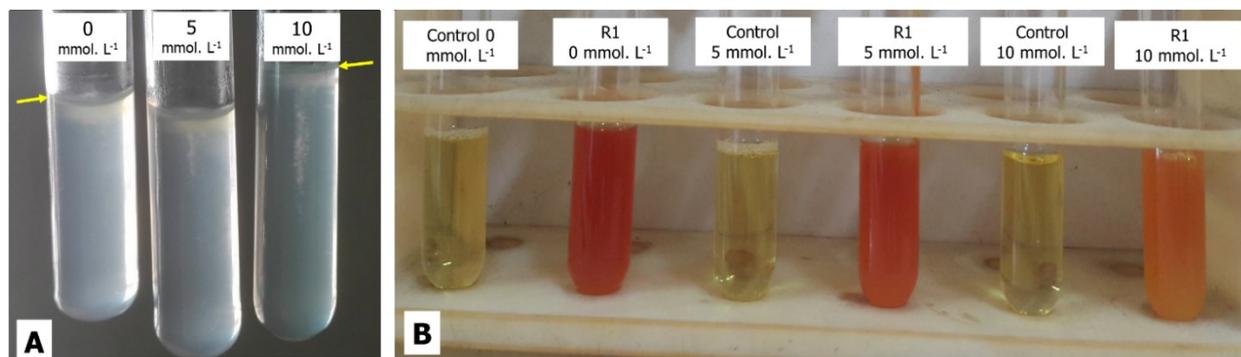


Fig. 4: Crecimiento de *Bacillus* sp. R1 en (A) medio libre de nitrógeno, suplementado con 0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II), 120 horas después del quinto pase consecutivo en el medio. (B) agua de peptona suplementados con 0, 5 y 10 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II), al adicionar reactivo de Nessler, después de 72 horas. Todos los cultivos se incubaron a 30°C. Las flechas indican el crecimiento bacteriano.

El nitrógeno es un elemento esencial para todas las formas de vida, un compuesto básico para las síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos nitrogenados orgánicos. La principal fuente de nitrógeno para las plantas la constituye la materia orgánica del suelo, la cual es oxidada por los microorganismos del suelo para liberar el nitrógeno. Sin embargo, en suelos con bajas concentraciones de materia orgánica, como son los suelos ultramáficos, este proceso no proporciona a las plantas cantidades suficientes de nitrógeno inorgánico, por lo que la fijación biológica de nitrógeno adquiere una gran importancia como fuente de nitrógeno adicional (Das *et al.*, 2013). Las bacterias endófitas fijan N<sub>2</sub> sin la necesidad de formar estructuras nodulares ya que el interior de la planta constituye un ambiente favorable para el proceso, al ser rico en carbono y bajo en O<sub>2</sub> (Kandel *et al.*, 2017).

La producción bacteriana de NH<sub>3</sub> constituye otra fuente de nitrógeno para la planta, de ahí que es una característica importante de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que influye directamente el desarrollo del vegetal (Ngoma *et al.*, 2013). Es una de las características que se evalúa con frecuencia en la selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kumar *et al.*, 2015). El uso de simbiontes naturales como los endófitos bacterianos reduce la necesidad del empleo de fertilizantes para aumentar el crecimiento vegetal (Kandel *et al.*, 2017).

#### Solubilización *in vitro* de níquel

El 100% de los aislados solubilizaron níquel a partir de carbonato de níquel (Figura 5A). En todos los casos el porcentaje de solubilización aumentó en el tiempo mostrando los mayores valores a las 360 horas de incubación. Al concluir el experimento se registraron porcentajes de solubilización superiores al 70%. El aislado R1 solubilizó mayor cantidad de Ni (II) (90%) comparado con el resto de los aislados. En el control negativo no se detectó el metal en el medio, lo que indica que el Ni (II) soluble en los cultivos bacterianos son el resultado de la actividad biológica.

El pH del medio disminuyó durante el experimento en los medios inoculados. En el control negativo el pH se mantuvo constante durante el estudio. El menor valor de pH se detectó en la cepa R1 en la misma se registraron los mayores porcentajes de solubilización de Ni (II). La solubilización de  $\text{Ni}(\text{CO}_3)_2$  puede ocurrir por el incremento de la concentración de  $\text{H}^+$  del medio, que podría estar determinado como consecuencia de la asimilación de amonio y la producción de ácidos orgánicos (Xinxian *et al.*, 2010). Estos resultados indican que los aislados tienen la capacidad de solubilizar el níquel a partir de una sal insoluble. Esta potencialidad también se informó en endófitos de *Sedum alfredii* que solubilizaron el Zn (II) a partir de dos compuestos insolubles,  $\text{ZnCO}_3$  y  $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ , las mejores cepas solubilizaron  $145.5 \text{ mg. L}^{-1}$  a los ocho días (Xinxian *et al.*, 2010).

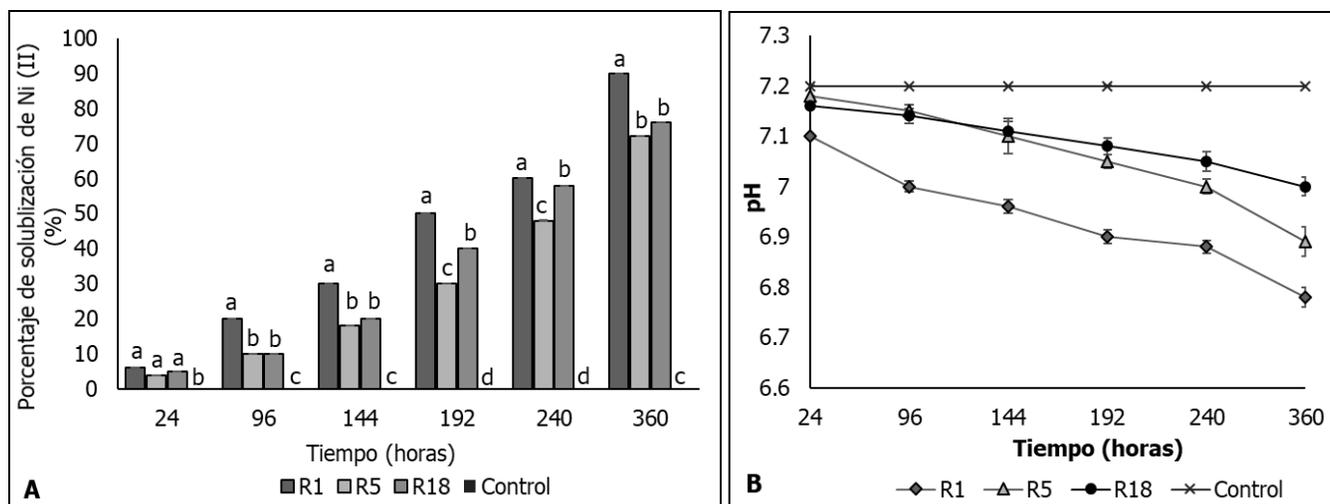


Fig. 5: Porcentaje de solubilización de Ni (II) a partir del carbonato de níquel (A) y variación del pH del medio (B) por las cepas endófitas en medio MMT, durante 360 horas a 30°C y 150 r.min<sup>-1</sup>. (Leyenda: Control: control negativo.)

La movilidad y biodisponibilidad de metales pesados es un factor crítico que afecta el proceso de fitorremediación. Los metales pesados, en general, se encuentran unidos en el suelo a compuestos orgánicos e inorgánicos que se presentan como precipitados insolubles, por lo que su disponibilidad para la planta es baja. Las bacterias endófitas pueden alterar la biodisponibilidad y la toxicidad del metal para la planta, a través de la acidificación o por la producción de quelatos, sideróforos, ácidos orgánicos o por la movilización de fosfatos metálicos (Sheng *et al.*, 2008). Saravanan *et al.* (2007), evaluaron el potencial de solubilización de compuestos insolubles de Zn, detectando la producción de ácido 5 cetoglucónico, como el producto principal, responsable de la solubilización del catión metálico a partir del compuesto insoluble. Asimismo, la inoculación de *Brassica napus* con bacterias endófitas resistentes a plomo, incrementaron la captura de este metal por las raíces; de un 76% a un 131 % para la cepa *Pseudomonas fluorescens* y de 59% a 80% para la cepa de *Microbacterium* sp (Sheng *et al.*, 2008). Pan *et al.* (2016), informaron que la cepa *Sphingomonas* SaMR12, endófito de *Sedum alfredii*, aumenta la acumulación del cadmio por la planta *Sedum alfredii*.

## CONCLUSIONES

Las cepas de *Bacillus* endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis* crecen en intervalos de pH de 5 a 9, son mesófilas y toleran altas concentraciones de Ni (II). Las cepas producen ácido indolacético, amoniaco y fijan dinitrógeno atmosférico incluso en presencia de 5 mmol. L<sup>-1</sup> de Ni (II), lo que indica que podrían contribuir al crecimiento y desarrollo de la planta. Además, solubilizan níquel a partir de sales insolubles del metal. Las características observadas en las cepas endófitas las hacen interesantes para ser evaluadas en tecnologías de fitorremediación de ecosistemas contaminados por metales pesados.

## REFERENCIAS

- Alfonso, D. & Matrella, S. (2013). Nickel hyperaccumulation —*in vitro* by *Leucocroton havanensis* (Euphorbiaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 34, 1-6.
- Alfonso, D., Cicatelli, A., Guarino, F., Rodríguez, D. & Castiglione, S. (2017). *In vitro* propagation of *Leucocroton havanensis* Borhidi (Euphorbiaceae): A rare serpentine- endemic species of Cuba. *Plant Biosystems*, 11 (11), 1-9.
- Ali, H., Khan, E. & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Hindawi Journal of Chemistry*. 6730305, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- Asaf, S., Khan, M.A., Khan, A.L., Waqas, M., Shahzad, R., Kim, A. *et al.* (2017). Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions*, 12 (1), 31-38.
- Ashraf, M.A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M. & Arif, M.S. (2017). Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: A review. *Journal of Environmental Management*, 198, 132-143.
- Barzanti, R., Ozino, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R., Galardi, F., Gonnelli, C. *et al.* (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microb. Ecol.*, 53 (2), 306-316.
- Bric, J., Bostock, R. & Silverstone, S. (1991). Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrana. *Appl Environ Microbiol*, 57(2), 535-538.
- Das, A.J., Kumar, M. & Kumar, R. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): An alternative of chemical fertilizer for sustainable, environment friendly agricultura. *Res. J. Agriculture and Forestry Sci*, 1 (4), 21- 23.
- Das, S., Nurunnabi, T.R., Parveen, R., Mou, A.N., Islam, M.E., Islam K.M.D. *et al.* (2019). Isolation and characterization of indole acetic acid producing bacteria from rhizosphere soil and their effect on seed germination. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8 (3), 1237-1245.
- Govin, A. (2016). Caracterización de bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis*. Tesis de Maestría. Departamento de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.
- Govin, A., Reyes, M.C., Guerra, M. & Sánchez, M.I. (2020). Caracterización de bacterias resistentes a metales pesados aisladas de un residual minero cubano. *Minería y Geología*, 36 (2), 188-203.
- Gu Y., Wang, Y., Sun, Y., Zhao, K., Xiang, Q., Yu, X. *et al.* (2018). Genetic diversity and characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria isolated from *Pteris vittata*, an arsenic hyperaccumulator. *BMC Microbiology*, 18 (42), 1-10.
- Idris R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. & Sessitsch, A. (2004). Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Applied and Environ. Microbiol*, 70 (5), 2667-2677.
- Indah T.N., Rusman, Hanim, C. & Zuprizal. (2017). Effect of pH and temperature on *Bacillus subtilis* FNCC 0059 oxalate decarboxylase activity. *Pak. J. Biol. Sci*, 20. 436-441.

- Kandel, S.L., Joubert, P.M. & Doty, S.L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5 (4), 77. doi: 10.3390/microorganisms5040077.
- Khan, M.S., Gao, J., Chen, X., Zhang, M., Yang, F., Du, Y. *et al.* (2020). Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. *Hindawi BioMed Research International*, 8650957. <https://doi.org/10.1155/2020/8650957>.
- Khan, M.U., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M. *et al.* (2015). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Frontiers in Plant Science*, 5, 755.
- Kumar, A., Maurya, B.R. & Raghuwanshi, R. (2015). Characterization of bacterial strains and their impact on plant growth promotion and yield of wheat and microbial populations of soil. *Afr. J. Agric. Res.*, 10(12), 1367-1375.
- Lal, S., Ratna, S., Said, O.B. & Kumar, R. (2018). Biosurfactant and exopolysaccharide- assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 243-263.
- Logan, N.A. & De Vos, P. (2009). Genus I. *Bacillus*. En De Vos *et al.* (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Vol 3. The Firmicutes. (pp 21- 127): William B. Whitman, Georgia, EUA.
- Lv S., Yang, B., Kou, Y., Zeng, J., Wang, R., Xiao, Y. *et al.* (2018). Assessing the difference of tolerance and phytoremediation potential in mercury contaminated soil of a non- food energy crop, *Helianthus tuberosus* L. (*Jerusalem artichoke*). *Peer J.*, 6, e4325. <https://doi.org/10.7717/peerj.4325>
- Ma, Y., Rajkumar M., Vicente, J.A.F. & Freitas, H. (2011). Inoculation of Ni- resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. *Int. J. Phytoremediation*, 13, 126-139.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C.H. & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Env. Manag.*, 174, 14-25.
- Madigan M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. & Stahl, D.A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. (pp 188- 196): Pearson Education.
- Mantilla-Paredes, A.J., Cardona, G.I., Peña-Venegas, C.P., Murcia, U., Rodríguez, M. & Zambrano, M.M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana, *Rev. Biol. Trop.*, 57(4), 915-927.
- Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G. *et al.* (2017). *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi. *Agricultural Sciences*, 8, 1-20.
- Mergeay, M., Nies, L.D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. *J Bacteriol*, 162 (1), 328-334.
- Mukherjee, G., Saha, C., Naskar, N., Mukherjee, A., Mukherjee, A., Lahiri, S. *et al.* (2018). Consortium modulates multiple strategies to improve Arsenic Phytoremediation Efficacy in *Solanum nigrum*. *Scientific Reports*, 8 (1), 6979. doi: 10.1038/s41598-018-25306-x.
- Naguib, M.M., El-Gendy, A.O. & Khairalla, A. S. (2018). Microbial diversity of *Mer* operon genes and their potential roles in mercury bioremediation and resistance. *The Open Biotechnology Journal*, 12, 56-77.

- Ngoma, L., Esau, B. & Babalola, O.O. (2013). Isolation and characterization of beneficial indigenous endophytic bacteria for plant growth promoting activity in Molelwane Farm, Mafikeng, South Africa. *Afr. J. Biotechnol.*, 12 (26), 4105-4114.
- Pan, F., Meng, Q., Wang, Q., Luo, S., Chen, B., Khan, K.Y. *et al.* (2016). Endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 promotes cadmium accumulation by increasing glutathione biosynthesis in *Sedum alfredii* Hance. *Chemosphere*, 154, 358- 366.
- Rajkumar, M., Ma, Y. & Freitas, H. (2013) Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal of Environmental Management*, 128, 973-980.
- Saikia, U., Bharanidharan, R., Vendhan, E., Kumar, S. & Shankar, S. (2013). A Brief Review On The Science, Mechanism And Environmental Constraints Of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). *International Journal of ChemTech Research*, 5(3), 1205-1212.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66, 1794-1798.
- Sheng, X.F., He, L.Y., Wang, Q., Ye, H. & Jiang, C. (2008). Effects of inoculation of biosurfactant- producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium- amended soil. *J Hazard Mater*, 155, 17-22.
- Visioli, G., D'Egidio, S. & Sanangelantoni, A.M. (2015a). The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5, 752.
- Visioli, G., Vamerali, T., Mattarozzi, M., Dramis, L. & Sanangelantoni, A.M. (2015b). Combined endophytic inoculants enhance nickel phytoextraction from serpentine soil in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-12.
- Visioli, G., D'Egidio, S., Vamerali, T., Mattarozzi, M. & Sanangelantoni, A. M. (2014). Cultivable endophytic bacteria enhance Ni translocation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Chemosphere*, 117, 538-544.
- Xinxian, L., Xuemei, C., Yagang, C., Woon-Chung, W.J., Zebin, W. & Qitang, W. (2010). Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27 (5), 1197-1207. Online. DOI 10.1007/s11274-010-0568-3.
- Xu, J.Y, Han, Y.H., Chen, Y., Zhu, L.J. & Ma, L.Q. (2016). Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As- resistant endophytic bacteria from As- hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere*, 144, 1233-1240.
- Yahaghi, Z., Shirvani, M., Nourbakhsh, F., Coba de la Peña, T., Pueyo J.J. & Talebi M. (2018). Isolation and characterization of Pb- solubilizing bacteria and their effects on Pb uptake by *Brassica juncea*: Implications for microbe- assisted phytoremediation. *J. Microbiol. Biotechnol*, 28 (7), 1156-1167.
- Zhang, W.H., Chen, W., He, L.Y., Wang, Q. & Sheng, X.F. (2015). Characterization of Mn-resistant endophytic bacteria from Mn hyperaccumulator *Phytolacca americana* and their impact on Mn accumulation of hybrid penisetum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 369-376.

