

Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto

Yamiris Teresa Gómez D' Angelo, Orquídea Coto Pérez, Lutgarda Abín Vazquéz y Carmen María Hernández Fernández.

Laboratorio de Biotecnología de los Metales, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 No.455 entre Calles J e I. El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 14 septiembre del 2000. Aceptado: 12 de octubre del 2001.

Key words: bacteria resistente níquel-cobalto, método de enriquecimiento, Concentración Mínima Inhibitoria.
Palabras clave: nickel-cobalt-resistant bacteria, enrichment method, Minimum Inhibitory Concentration.

RESUMEN. Se utilizó el método de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto del yacimiento laterítico de Moa, Holguín, Cuba. La resistencia bacteriana se determinó por la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El 100 % de las cepas seleccionadas por este método presentaron una elevada resistencia a estos metales (Ni, 60 y 220 mmol/L y Co, 10 a 200 mmol/L). Este resultado es de gran importancia para el desarrollo de las nuevas tendencias de la Biotecnología Minera, ya que hasta el momento las máximas CMI informados oscilaban entre 30 y 50 mmol/L. Las CMI alcanzadas en este trabajo permiten proponer una modificación a la clasificación Schlegel (1981), de manera que el límite máximo de tolerancia a níquel para las bacterias muy resistentes se extienda hasta 200 mmol/L y no a 50 mmol/L como se había planteado y por otro, lado añadir un cuarto grupo denominado bacterias superresistentes, para aquellas que toleren concentraciones mayores a 200 mmol/L. Las 11 cepas seleccionadas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y fueron ubicadas en los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*. El aislamiento y la identificación de *Enterobacter liquefaciens* y *Citrobacter amalonaticus* constituye el primer informe a nivel internacional de estas especies como resistentes a níquel y cobalto. El método de enriquecimiento es eficaz, rápido y muy selectivo para el aislamiento de bacterias muy resistentes a níquel y cobalto. El comportamiento de la cepa cob1 frente a cobalto es muy interesante debido a su CMI (200 mmol/L). Todas las cepas aisladas por el método de enriquecimiento presentaron notables CMI de níquel y cobalto, a excepción de la cepa nic 12 que solamente lo toleró hasta 10 mmol/L. Al comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio se demuestra la superioridad del cultivo de enriquecimiento sobre el de difusión en agar, debido a que de 31 aislamientos valorados por el segundo método, solamente el 20 % de ellos mostraron notable resistencia a níquel y un solo aislamiento fue resistente a ambos metales.

ABSTRACT. The enrichment method was used to isolate nickel and cobalt resistant bacterial strains from lateritic deposit of Moa, Holguín, Cuba. All the strains selected presented a extreme resistance to nickel and cobalt, which was determined by the high values obtained by Minimum Inhibitory Concentration (MIC). These were in the range of 60 - 220 mmol/L for nickel and 10 - 200 mmol/L for cobalt. This result is extremely important for the development of the new tendencies of the Mining Biotechnology since until in the consulted literature have not met strains with such resistance values. The values of MIC obtained in the presence of nickel allowed us to make a modification of the classification of the bacteria resistant to nickel carried out by Schlegel *et al.* in 1981, so that the maximum limit of tolerance to this metal of the highly resistant bacteria extends up to 200 mmol/L and on the other hand to add a fourth group denominated *super resistant bacteria*, for those that tolerate concentrations of nickel above 200 mmol/L. The 11 strains isolated belong to the *Enterobacteriaceae* family and were identified in four genera, i.e., *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, and *Citrobacter*. The isolation and identification of *Enterobacter liquefaciens* and *Citrobacter amalonaticus* has been the first report about these species as resistant to nickel and cobalt. The enrichment method is effective, efficient and selective for isolating bacteria very resistant to nickel and cobalt.

INTRODUCCION

En los últimos años, los aspectos relacionados con el medio ambiente han ocupado una posición importante en la sociedad. Cuba, a pesar de ser un país subdesarrollado busca alternativas para el reciclaje de los residuos, tanto industriales como urbanos y también para el tratamiento de los minerales de forma económica.¹ Diferentes procesos agrícolas e industriales contribuyen al incremento de la contaminación ambiental con metales pesados.

Ciertos metales de transición como cobalto, cobre, níquel y cinc a concentraciones trazas del orden 10^{-1} mmol/L son utilizados como bioelementos, micronutrientes o cofactores enzimáticos; sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos e inhiben el crecimiento microbiano. Normalmente las bacterias no toleran concentraciones mayores a los 50 μ mol/L de níquel ni cobalto a excepción de las que habitan ambientes muy contaminados, como tierra, aguas ácidas de mina y residuales de las industrias relacionadas con los metales. Algunas cepas del género *Alcaligenes* crecen en presencia de 50 y 20 mmol/L de níquel y cobalto, las cuales han sido catalogadas como muy resistentes.² Otros metales pesados como plomo, cadmio, mercurio, plata y cromo no poseen ninguna función biológica, por lo que incluso a bajas concentraciones son muy tóxicos.^{3,4} Diferentes mecanismos se han planteado para explicar cómo los organismos pueden resistir esas condiciones tan

drásticas, entre los que se encuentran flujo de iones con un carácter quimiosmótico, detoxificación enzimática, bioacumulación y otros.

La resistencia de las poblaciones microbianas a los metales se ve alterada por el tipo de metal, la interacción de este con el microorganismo, el pH, la concentración de agar, la presencia de sustancias orgánicas, de halógenos o de agentes quelantes que puedan interactuar con el metal y disminuir su toxicidad.

Dentro de las tendencias actuales de la Biotecnología Minera se encuentra la selección y caracterización de cepas con capacidad de resistencia a metales, las cuales puedan ser utilizadas en la biorremediación de ambientes contaminados con metales o en la biolixiviación. Para lo cual, se necesitan métodos de aislamiento que consuman el mínimo de reactivos y de tiempo. No existe ningún método definido para este fin. El más utilizado ha sido el de difusión en agar,^{6,7} sin embargo, los microorganismos seleccionados por él presentan poca resistencia a los metales. Lo cual se debe al carácter oligodinámico de estos, lo que provoca que las concentraciones del metal alrededor del disco sean muy inferiores a las impregnadas en el disco de papel de filtro y además, por la capacidad de los metales de formar quelatos con los compuestos orgánicos presentes en el medio.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un método rápido y efectivo para el aislamiento de bacterias muy resistentes a níquel y cobalto de ambientes contaminados con metales.

MATERIALES Y METODOS

Método de selección

Se empleó el método de enriquecimiento con el objetivo de seleccionar la población microbiana resistente a níquel y cobalto.

Toma de muestras

Se tomaron muestras de agua y lodo de dos zonas del yacimiento laterítico de Moa, Holguín. Las cuales fueron identificadas como zona 1 y 2, ambas representativas por los elevados contenidos en metales y fueron colectadas en frascos ámbar estériles de boca ancha y rotulados como agua 1, agua 2, lodo1, lodo 2 según la zona de recolección.

Cultivo de enriquecimiento-aislamiento

Para la selección de cepas tolerantes a níquel y cobalto, cada muestra fue

inoculada en dos erlenmeyers con medio LB.⁸ Uno contenía 5 mmol/L de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el otro 1 mmol/L de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Todos los cultivos fueron incubados a 30 °C, con agitación constante (100 r/min) durante 72 h. Posteriormente, diferentes frascos con 2 mL de medio fresco de LB con 5, 10 y 20 mmol/L de níquel y con 1, 5 y 10 mmol/L de cobalto fueron inoculados con 20 μL del cultivo de los erlenmeyers donde se observó un crecimiento notable. El tiempo de incubación fue de cinco días.

Transcurrido este tiempo, se tomaron 20 mL de cultivo de los frascos con las mayores concentraciones donde se observó crecimiento. Estos fueron inoculados por diseminación con espátula de Drigalsky en placas Petri que contenían medio LB con suplemento de 10 mmol/L de sulfato de cobalto o 20 mmol/L de sulfato de níquel. El aislamiento y la purificación de las bacterias se realizó mediante cinco pases sucesivos de cada colonia sobre medio sólido LB con la correspondiente concentración de los metales. La pureza de los cultivos se comprobó mediante la tinción de Gram.

Identificación de las cepas resistentes a níquel y cobalto

Inicialmente se realizó la prueba de la oxidasa⁹ con el objetivo de definir la batería de pruebas bioquímicas a utilizar, las cuales fueron agar Kligler, pruebas de la ornitina, producción de H_2S , producción de indol, utilización del adonitol como fuente de carbono, descarboxilación de la lisina, prueba de la arabinosa, utilización del sorbitol como fuente de carbono, Voges-Proskauer, fermentación de dulcitol, desaminación de la fenilalanina, hidrólisis de la urea y utilización del citrato de sodio según los métodos "Enterotube II"¹⁰ y Encise System.¹¹

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La máxima concentración de níquel y cobalto capaz de inhibir el crecimiento de las cepas en estudio se determinó al inocular 50 μL de cultivo joven de 10^8 cel. $\cdot \text{mL}^{-1}$ a una batería de tubos que contenían 5 mL de medio LB que presentaban concentraciones crecientes de cada metal, por separado:

$[\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260 y 280 mmol/L.

$[\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$: 1, 3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 mmol/L.

Todos los tubos fueron incubados a 30 °C con agitación constante de 100 r/min. La medida del crecimiento se realizó por el método de turbidimetría cada 24 h durante 7 d.

RESULTADOS Y DISCUSION

Método de enriquecimiento

Las cuatro muestras inoculadas en presencia de 5, 10 y 20 mmol/L de níquel produjeron turbidez notable (Tabla 1). El comportamiento frente a cobalto fue diferente, ya que en tres de las cuatro muestras en estudio la turbidez se observó en los medios con 1 mmol/L de cobalto, y solamente en la muestra agua 1 se evidenció el desarrollo de una microbiota tolerante hasta la máxima concentración de cobalto empleada.

Posteriormente, se procedió al aislamiento y purificación de las colonias mediante pases sucesivos sobre medio sólido que contenía cobalto (10 mmol/L) o níquel (20 mmol/L), según la máxima concentración del metal a la cual se observó crecimiento.

Se aislaron 11 cepas bacterianas, las cuales fueron identificadas por un número consecutivo y por la palabra *nic* o *cob*, en dependencia del metal presente en el medio de enriquecimiento (Tabla 2). De la muestra lodo 2 se aisló el mayor número de cepas bacterianas (*nic3*, *nic5*, *nic6*, *nic9* y *nic10*). Del total de los aislamientos, tan solo dos de ellas (*cob1* y *cob 8*) fueron aisladas de los cultivos con cobalto correspondientes a la muestra agua 1, lo que evidencia que la toxicidad de este metal es superior a la del níquel.

Identificación de las cepas

Las 11 bacterias aisladas respondieron de forma negativa a la tinción de Gram, lo que demuestra que presentan mayor tolerancia a la contaminación por metales pesados que las bacterias Gram positivas.⁷ Esto podría estar determinado por la estructura de la pared celular, así como por factores fisiológicos y genéticos. Todas las cepas fueron oxidasa negativas, por lo que fueron seleccionados los métodos del Enterotube II¹⁰ y del Encise System¹¹ para llevar a cabo la identificación.

Todos los aislamientos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, lo que corrobora que esta familia habita con gran frecuencia suelos, plantas y tractos intestinales de animales.¹²

Fue manifiesta la biodiversidad en cuanto a los géneros de bacteria presentes en el yacimiento níquelífero de Moa (Tabla 3), pero no a ni-

Tabla 1. Crecimiento a las 72 h a partir de las diferentes muestras evaluadas por el método de enriquecimiento.

	NiSO ₄ · 7H ₂ O			CoSO ₄ · 7H ₂ O		
	(mmol/L)					
	5	10	20	1	5	10
Agua 1	+	+	+	+	+	+
Agua 2	+	+	+	+	-	-
Lodo 1	+	+	+	+	-	-
Lodo 2	+	+	+	+	-	-

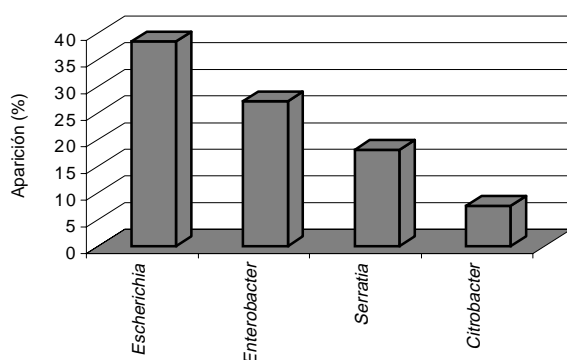
+ Crecimiento. - No crecimiento.

Tabla 2. Cepas bacterianas aisladas por el método de enriquecimiento.

Cepas	Muestras
cob1	Agua 1
cob8	Agua 1
nic2	Agua 2
nic3	Lodo 2
nic4	Lodo 1
nic5	Lodo 2
nic6	Lodo 2
nic9	Lodo 2
nic10	Lodo 2
nic11	Agua 2
nic12	Agua 1

Tabla 3. Identificación de las 11 cepas bacterianas.

Cepas	Organismo
cob1	<i>Escherichia coli</i>
nic2	<i>Escherichia coli</i>
nic3	<i>Escherichia coli</i>
nic4	<i>Enterobacter liquefaciens</i>
nic5	<i>Serratia liquefaciens</i>
nic6	<i>Escherichia coli</i>
Cob8	<i>Enterobacter liquefaciens</i>
nic9	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
nic10	<i>Serratia liquefaciens</i>
nic11	<i>Escherichia coli</i>
nic12	<i>Enterobacter liquefaciens</i>


Fig. 1. Géneros identificados.

vel de especie. Se pudo observar que las cinco cepas del género *Escherichia* fueron identificadas como *Escherichia coli* (cob1, nic2, nic3, nic6, nic11), las cuales se aislaron de tres de las muestra en estudio (Tabla 2). Las tres cepas de *Enterobacter* como *E. liquefaciens* (nic4, cob8 y nic12) las cuales fueron aisladas de las muestras lodo 1 y agua 1 y las dos cepas del género *Serratia* (nic5 y nic10) como *Serratia liquefaciens*. En el género *Citrobacter* solamente fue ubicada la cepa nic 9, la cual fue identificada como *Citrobacter amalonaticus* y fue aislada de la muestra lodo 2.

De los cuatro géneros identificados, *Escherichia* fue el de mayor aparición (38,4 %), en segundo lugar, *Enterobacter* (27,2 %), luego *Serratia* (18,1 %) del total de los aislamientos y el menor porcentaje correspondió al género *Citrobacter* (7,6 %) (Fig. 1).

Se reporta a *Enterobacter agglomerans*⁷ y a *Enterobacter cloacae*¹³ como resistentes a níquel. Tres de las cepas identificadas en este trabajo (nic4, cob8 y nic12) pertenecen a este género, pero a diferente especie, siendo este el primer informe a nivel internacional referente a *Enterobacter liquefaciens* con resistencia a níquel y cobalto.

Por otro lado, se ha demostrado que un aumento en las concentraciones de níquel en los ambientes naturales acuáticos induce a la presencia de determinantes genéticos de resistencia a este metal en cepas de *Escherichia coli*.^{14,15} También es conocido que cuando esta bacteria se cultiva en condiciones de anaerobiosis, necesita de la presencia de iones níquel en su membrana celular para la activación de la enzima hidrogenasa.^{16,17}

A pesar del limitado número de cepas de *E. coli* resistentes a níquel y cobalto en la naturaleza, es importante destacar que esta especie es la que más se ha empleado como receptora de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia a níquel, cobalto, cadmio o cinc de cepas del género *Alcaligenes*.¹⁸⁻²⁰ La clonación y expresión de determinados genes en *E. coli* ha tenido como resultado la transformación de cepas sensibles en resistentes. Recientemente, se logró la clonación del operón czcCBAD en *E. coli*, el cual porta la información genética del complejo proteico CzcCBA que media la resistencia a cobalto, cinc y cadmio en *Alcaligenes eutrophus*. La expresión de estos genes le confirió a la cepa de *E. coli* cierta tolerancia a esos metales.²¹

La información sobre cepas del género *Citrobacter* catalogadas como resistentes a níquel y cobalto es muy escasa, a excepción de *Citrobacter amalonaticus* y *Citrobacter freundii* que después de habersele transferido por conjugación los determinantes de resistencia a níquel de la cepa *Klebsiella oxytoca* CCUG 15788,²² fue que mostró resistencia frente a 5 a 10 mmol/L de NiCl₂.

Los géneros *Alcaligenes*,⁵ *Klebsiella*,²² *Arthrobacter*,²³ *Pseudomonas*,⁷ *Acinetobacter*,¹³ *Enterobacter*,^{7,13} *Serratia*⁷ y *Acidiphilum*²⁴ son los géneros con resistencia a níquel y cobalto más referidos. El género *Alcaligenes* ha sido el más estudiado de todos, dentro del cual se han aislado cepas capaces de tolerar concentraciones máximas entre 20 y 50 mmol/L de NiCl₂ y 20 mmol/L de CoCl₂.⁵

La mayoría de los genes involucrados en los mecanismos de resistencia a metales se localizan en plasmidios por lo que la selección de nuevos géneros bacterianos con resistencia a níquel y cobalto puede estar dado por la característica de los plasmidios de transferirse de una cepa a otra. Esta propiedad es conocida como transferencia horizontal y ocurre entre diferentes especies y géneros bacterianos e incluso de bacterias a levaduras y viceversa.²⁵ Es posible que en la zona minera de Moa, ambiente muy contaminado con metales, haya ocurrido una transferencia horizontal de genes dando como resultado la existencia de nuevos géneros y especies capaces de sobrevivir bajo condiciones extremas.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Este método es ampliamente utilizado para identificar la actividad antimicrobiana de una sustancia, mediante la cual se determina la concentración límite que inhibe el crecimiento de un organismo en particular.¹² Se observó que la cepa *nic4* presentó la mayor tolerancia a níquel (Tabla 4), seguida en orden decreciente por las cepas *nic3*, *nic6* y *nic5* con 160, 140 y 120 mmol/L respectivamente y por último, las cepas *nic9*, *nic12*, *cob1*, *nic2*, *cob8*, *nic10* y *nic11* con CMI entre 100 y 60 mmol/L. Un grupo de investigadores alemanes aisló un conjunto de bacterias de suelos ricos en níquel y las agruparon en tres categorías, según la concentración de níquel que toleraban.⁵ En un primer grupo ubicaron a aquellas que crecieron en presencia de

3 mmol/L, las que denominaron **moderadamente resistentes**; en el segundo grupo, las que lo hacían entre 5 y 20 mmol/L, catalogadas como **resistentes** y en un tercer grupo, las que crecieron entre 20 y 50 mmol/L, clasificadas como **muy resistentes**.⁵

Teniendo en cuenta las elevadas CMI obtenidas con las cepas en estudio, se propone modificar la clasificación de Schlegel, de forma tal que el límite máximo de tolerancia a níquel se extienda desde 5 hasta 200 mmol/L, para aquellas bacterias clasificadas como muy resistentes. En este grupo se ubican las cepas *cob1*, *nic2*, *nic3*, *nic4*, *nic5*, *nic6*, *cob8*, *nic9*, *nic10*, *nic11* y *nic12*. Y por otro lado, adicionar un cuarto grupo nombrado superresistentes para las bacterias que toleren concentraciones por encima de los 200 mmol/L (*nic4*).

El aislamiento de bacterias muy y superresistentes a níquel de suelos níquelíferos cubanos, es un hallazgo novedoso a nivel internacional, ya que hasta el momento, solamente cepas de los géneros *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, habían sido capaces de exhibir CMI de níquel, pero valores bajos (30 y 50 mmol/L), aunque algunas de estas cepas fueron mejoradas genéticamente.^{26,27}

El número de cepas resistentes a cobalto es muy limitado, si se tiene en cuenta que hasta el momento solamente se han podido aislar tres cepas (*A. eutrophus* CH34, *A. eutrophus* KTO2 y *A. xylosoxydans* 31A) capaces de crecer a una concentración máxima de 20 mmol/L de cobalto.⁵ Por lo que la selección de cinco cepas cubanas resistentes a concen-

traciones superiores a los 20 mmol/L de cobalto, constituye otro hallazgo novedoso, pero no sorprendente, ya que la zona de Moa (Cuba) es reconocida como una de las mayores reservas del mundo en minerales de níquel y cobalto. Una vez más, se manifiesta la gran influencia del ambiente sobre el genotipo de los organismos.

El comportamiento de la cepa *cob1* frente a cobalto (Tabla 4) es de resaltar, ya que exhibió una elevadísima CMI (200 mmol/L). Este resultado también constituye la primera referencia sobre una cepa bacteriana capaz de resistir tal concentración de cobalto, lo cual sienta las bases para comenzar el estudio del sistema de resistencia a este metal, aspecto que no ha sido estudiado previamente.

A modo de resumen, se puede decir que el 100 % de las cepas aisladas por el método de enriquecimiento presentaron CMI por encima de los 40 y 10 mmol/L de níquel y cobalto, respectivamente, a excepción de la cepa *nic 12* que solamente lo toleró hasta 10 mmol/L.

Al comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente en el laboratorio de las autoras⁷ se demuestra la superioridad del cultivo de enriquecimiento sobre el de difusión en agar, debido a que del total de los aislamientos realizados por Gómez y col., solamente el 20 % de ellos mostraron notable resistencia a níquel y cobalto. Este hecho está condicionado por la propia metodología empleada. En el método de enriquecimiento, desde un inicio, los microorganismos se cultivan en medio líquido y se ponen en contacto directo con el metal. Entonces, la

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria frente a níquel y cobalto de las cepas aisladas por el método de enriquecimiento.

Cepas	NiSO ₄ · 7H ₂ O	CoSO ₄ · 7H ₂ O
	(mmol/L)	
<i>cob1</i>	80	200
<i>nic2</i>	80	20
<i>nic3</i>	160	20
<i>nic4</i>	220	100
<i>nic5</i>	120	80
<i>nic6</i>	140	100
<i>Cob8</i>	80	100
<i>nic9</i>	100	40
<i>nic10</i>	80	40
<i>nic11</i>	60	20
<i>nic12</i>	100	10

selección dependerá de la capacidad de la bacteria de crecer bajo el estrés impuesto, lo cual está condicionado por sus características genéticas.

Por otro lado, aunque el método de difusión en agar es práctico porque se trabaja con un elevado número de cepas en un período corto, tiene el inconveniente de que el aislamiento se realiza sin la presencia del metal. Esto trae como consecuencia la posible inhibición de la síntesis de proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia, ya que la mayoría de estas proteínas son inducidas. Otra desventaja del método es la imposibilidad de precisar la concentración exacta de los metales que inhibe el crecimiento del organismo, ya que la concentración alrededor del disco siempre será inferior a la impregnada en el disco de papel, debido a la formación de quelatos con los compuestos orgánicos presentes en el medio de cultivo y por el carácter oligodinámico de los metales.⁶

El método de enriquecimiento trae consigo un ahorro significativo de reactivos y recursos materiales, el incremento de la población microbiana resistente al metal en cuestión y la selección de cepas con mayores valores de concentración mínima inhibitoria.

CONCLUSIONES

Se propone el método de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias con elevada resistencia a níquel y cobalto por su rapidez, efectividad y selectividad.

Se informa por primera vez a *Enterobacter liquefaciens* y *Citrobacter amalonaticus* como bacterias muy resistentes a níquel y cobalto.

BIBLIOGRAFIA

1. Guerra A., Palau L., y Rodríguez J. Tratamiento a residuos sólidos de la industria del níquel. Concurso Internacional de Aprovechamiento Racional de los Recursos Minerales, Holguín, Cuba, 1998.
2. Trajanovska S., Britz M.L. and Bhawe M. Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. **Biodegradation**, **8**, 113, 1997.

3. Brown N.L., Lee B., T.O. and Silver S. Bacterial transport of and resistance to copper. **Metal Ions in Biological Systems**, **30**, 405, 1994.
4. Gadd G.M. Heavy metal pollutants: environments and biotechnological aspects. In: Lenderberg L. (Ed.). **I Encyclopaedia of Microbiology**, 1992.
5. Schlegel H.G., Cosson J.P. and Baker A. J.M. Nickel hyperaccumulating plants provide a niche for nickel resistant bacteria. **Botanica Acta**, **104**, 18, 1991.
6. Muller H.E. Oligodynamic action of 17 different metals on *Bacillus subtilis*, *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Micrococcaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.**, **182**, 95, 1985
7. Gómez Y., Coto O., Capote J., Abin L. and Perera J. Nickel-resistant bacteria from Cuban laterite soils. **Biohydrometallurgy and The Environment Toward the Mining of The 21st Century and the Processing** (Ed. R. Amils and A. Ballester), Part B, 673, 1999.
8. Maniatis T., Fritsh E.F., and Sambrook J. **Molecular cloning: A Laboratory Manual** 2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A., 1989.
9. Holt J., Staley J., Bryant M. and Pfennig N. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3, 9th Edition, Williams and Wilkins (Ed.). Baltimore, USA, 1989.
10. Roche Diagnostic. **Systema informatique de codage et d'identification pour (Enterotube II)**. Edition: Janvier, Francia, 1981.
11. Rojas N. y Coto O. **Temas de Microbiología Clínica II**. Editorial ENPES. Ministerio de Educación, La Habana, Cuba, 1989.
12. Brock T.D. and Madigan M.T. **Biology of microorganisms**. Editorial Prentice Hall, 1994.
13. Pickup R.W., Mallinson H.E.H., Rhodes G. and Chatfield L.K. A novel resistance determinant found in sewage associated bacteria. **Microbial Ecology**, **33**, 230, 1997.
14. Kelly D.P., Norris P.R. and Brierley C.L. **Microbiological methods for the extraction and recovery of metals**. **Microbial Technology: Current State, Future Prospects**. 29th Symp. of Soc. for General Microbiology. Bull. A.T., Ellwood D. and Ratledge C. (Ed). Cambridge, USA, 263, 1981.
15. Seginkova Z. and Kralikova K. Monitoring the contemporary resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* strains isolated from aquatic environment to antibiotics and ions of heavy metals. **Ekologia-Bratislava**, **12**, 111, 1993.
16. Wu L.F., Navarro C., Depina K., Quenard M. and Mandrand M. A. Antagonistic effect of nickel on the fermentative growth of *Escherichia coli* and comparison of nickel and cobalt toxicity on the aerobic and anaerobic growth. **Environ. Health Perspectives**, **102**, 297, 1994.
17. Frederick C. and Neidhardt N. *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Nature**, **298**, 273, 1996.
18. Liesegang H., Lemke K., Siddiqui R.A. and Schlegel H.G. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. **J. Bacteriol.**, **175**, 767, 1993.
19. Schmidt T. and Schlegel H.G. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxydans* 31A. **J. Bacteriol.**, **176**, 7045, 1994.
20. Nies D.H. Microbial Heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **51**, 730, 1999.
21. Sakurai I., Kawamura Y., Hocke H., Iove Y., Kosako Y., Nakase T., Kondou Y. and Sakurai S. Bacterial accumulation of metallic compounds. **Applied Environmental Microbiology**, **2580**, 1990.
22. Stoppel R.D., Meyer M. and Schlegel H.G. The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*, conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel resistant bacteria. **Biometals**, **8**, 70, 1995.
23. Margesin R. and Schinner F. Bacterial heavy metal tolerance extreme resistance to nickel in *Arthrobacter spp.* strains. **J. of Basic Microbiol.**, **36**, 269, 1996.
24. Mahapatra N.R. and Banerjee P.C. Extreme tolerance to cadmium and high resistance to copper, nickel, and zinc in different *Acidiphilium* strains. **Lett. Appl. Microbiol.**, **26**, 393, 1996.
25. Del Solar G., Moscoso M. and Espinosa M. A family of highly related promiscuous plasmid. **Trends in microbial ecology**, 697-700, 1993.
26. Mergeay M. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance **Tibtech- January**, **9**, 17, 1991.
27. Silver S. and Phung L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Microbiology**, **50**, 753, 1996.