

Universidad Nacional de Tucumán

CA - Medio Ambiente

**ACTIVIDAD REDUCTORA DE Cr(VI) EN EXTRACTO LIBRE DE CÉLULAS DE
LEVADURAS AISLADAS DE EFLUENTES INDUSTRIALES**

María Martha Martorell, Pablo Marcelo Fernández

Directores: Lucía Inés Castellanos de Figueroa, Julia Inés Fariña

e-mail: mariamartha86@hotmail.com; pmfernandez@argentina.com

Palabras clave: Levaduras, Biorremediación, Cromo

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la liberación de contaminantes al ambiente, ha superado ampliamente los mecanismos naturales de reciclaje y autodepuración de los ecosistemas receptores. Entre los xenobióticos más perjudiciales se encuentran los metales pesados. Estos provienen de fuentes antropogénicas tales como desechos domésticos, agrícolas y diferentes tipos de efluentes industriales.

El efecto de los metales pesados en el medio ambiente depende de la concentración y de la capacidad de movilización de los mismos entre la atmósfera, hidrósfera y litósfera, debido a que estos no pueden degradarse y la mayoría de ellos, se acumulan en suelos, plantas y animales, aumentando sus concentraciones en los predadores superiores de las cadenas alimentarias (Lloyd, 2003).

La contaminación ambiental por cromo es un problema ampliamente distribuido a nivel mundial. Este elemento posee varios estados de oxidación desde -2 a +6, siendo el +3 y +6 los más estables en el medio ambiente. El Cr(VI) es altamente tóxico debido a su facilidad para atravesar las membranas celulares y a su alto poder oxidante (Zayed y col., 2003). También se sabe que genera estrés oxidativo en el interior celular, causando daño a organelas, proteínas y ácidos nucleicos (Jamnik y Raspor, 2003).

El cromo se encuentra principalmente en los efluentes de curtiembres y de industrias textiles, metalúrgicas, entre otras (Thacker y col., 2007). Actualmente diversas técnicas físico-químicas son de uso frecuente para la remoción de metales pesados en desechos industriales (Kratochvil y col., 1997). Estas técnicas presentan un denominador común: costos elevados y dificultades de aplicación en grandes áreas de suelos y sedimentos contaminados. Por lo tanto, es imperioso el desarrollo de mecanismos de descontaminación de bajo costo que puedan ser utilizados, ya sea para la extracción, inmovilización o transformación de los metales a formas inocuas o menos tóxicas (Lloyd, 2003).

Actualmente están en auge las tecnologías llamadas “eco-amigables” o de biorremediación (remoción de compuestos tóxicos por agentes biológicos), que involucran la bioabsorción, bioadsorción y/o bioespeciación (directa por enzimas o indirecta por metabolitos) (Cervantes y col., 2001). Estos procesos son más exitosos cuando se utilizan microorganismos aislados de ambientes contaminados con metales pesados (Gadd, 2000). Las investigaciones en biorremediación de Cr(VI) se orientaron hacia la bioacumulación del metal, principalmente en levaduras, donde se observó que la deshidratación de las células y la temperatura son factores determinantes al momento de implementar una estrategia de este tipo (Wang y Chen, 2007), siendo los géneros más estudiados *Candida* (Muter y col., 2001) y *Saccharomyces* (Liu y col., 2001).

En bioespeciación se estudiaron procesos aeróbicos y anaeróbicos, y la mayoría de las investigaciones se centraron en bacterias y en el estudio de enzimas solubles con

actividades del tipo cromato reductasa. En presencia de oxígeno, bacterias como *Pseudomonas maltophilia* O-2 y *Bacillus megaterium* TKW3, utilizan reductasas asociadas a membranas (Cheung y Gu, 2007); también se purificaron dos reductasas de Cr(VI) solubles (ChR y YieF), a partir de *Pseudomonas putida* MK1 (Park y col., 2000) y *Escherichia coli* (Park y col., 2002), respectivamente.

En condiciones anaeróbicas, la reducción de Cr(VI) con ambos tipos de enzimas (solubles y asociadas a membranas) se encuentra acoplada a la oxidación de un sustrato dador de electrones, generalmente NADH o NADPH, presentes en la reserva endógena de la propia célula (Appenroth y col., 2000).

La obtención y caracterización de Extractos Libre de Células (ELC) de bacterias aisladas de ambientes contaminados fue objeto de estudio en numerosas investigaciones que utilizan diferentes géneros tales como *Brucella* (Thacker y col., 2006), *Pseudomonas* (Bopp y Erlich, 1988) y *Bacillus* (Camargo y col., 2003).

En microorganismos eucariotas, especialmente levaduras, muy poco es lo que se conoce sobre los mecanismos enzimáticos de reducción de cromo. Solo se ha descrito la participación de una enzima con actividad reductora de cromato en el ELC de levaduras resistentes a cromo como *Candida maltosa* (Ramirez-Ramirez y col., 2004) y *Candida utilis* (Muter y col., 2001).

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es la obtención y caracterización de extractos libres de células, obtenido a partir de dos cepas de levaduras tolerantes a Cr(VI), *Pichia jadinii* y *Pichia anomala*, aisladas de efluentes de una industria textil en la localidad de Famaillá, Tucumán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medio de cultivo

Las levaduras usadas fueron aisladas a partir de muestras de agua de efluentes industriales de una fabrica textil (Arroyo Maravilla, Famaillá, Tucumán). Las cepas seleccionadas fueron identificadas como *Pichia jadinii* (Número de acceso a GeneBank: FJ865435) y *Pichia anomala* (Número de acceso a GeneBank: FJ865436). Ambas fueron cultivadas en frascos de 1 L, con un volumen de trabajo de 200 mL. La composición del medio de cultivo (YNB´) fue (por litro de agua destilada): YNB 10X (*Yeast Nitrogen Base w/o a.a. and ammonium sulfate*, DIFCO), 10% v/v; sacarosa, 50 g; sulfato de amonio, 0,6 g. Se adicionó una fuente de Cr(VI) para obtener una concentración final de 1 mM ($52 \mu\text{g mL}^{-1}$). Se inoculó al 10% (v/v) y las condiciones de incubación fueron: 25°C y 250 rpm. Cultivos sin Cr(VI) fueron usados como control de crecimiento.

Después de 48 horas, los cultivos fueron centrifugados a 10.000 $\times g$ a 4°C durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante y la biomasa recuperada fue lavada 2 veces con agua destilada.

Preparación de los Extractos Libres de Células

Para la obtención de los extractos libres de células (ELC), se pesó un gramo de biomasa húmeda y se resuspendió en 5 mL de buffer Fosfato-Citrato (BFC) pH 5. Se adicionó 50 μL de un coctel de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail Set I, CALBIOCHEM) y 1 mL de perlas de vidrio estériles. Se sometieron a 6 ciclos de sonicación de 5 minutos cada uno (Sonics Vibra Cell, VCX 130). Una vez finalizado el proceso, los homogenados se centrifugaron a 10.000 $\times g$ (Centrifuga THERMO Electron Corporation IEC Multi RF Refrigerated Centrifuge) durante 10 minutos a 4°C para separar el detritus celular y las células sin romper. El sobrenadante recuperado fue filtrado a través de membranas de acetato de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro (Sartorius) y almacenado a -20°C hasta su uso.

Determinación de actividad reductora de Cr(VI) en ELC

Para un volumen de reacción de 250 μL , se agregaron: 50 μL de ELC, 150 μL de BFC (pH 5), 25 μL de solución de K_2CrO_4 (5mM) y 25 μL de NADH (10mM). La temperatura de incubación fue 30°C. Se tomo muestra en tiempo cero y a los 60 minutos de incubación. Para descontar reducciones inespecíficas del metal, se realizaron controles sin la adición de ELC ó NADH, los que fueron sometidos a las mismas condiciones de incubación.

La actividad fue definida como los mmoles de Cr reducido por mg de proteína en el ELC y por unidad de tiempo (min).

Efecto del pH y la temperatura sobre la reducción de Cr(VI) en los ELC

El efecto del pH sobre la reducción de Cr(VI) en ELC de *P. jadinii* y *P. anomala* fue determinado a 30°C en diferentes buffers: buffer Fosfato Citrato (pH 4-6), buffer Fosfato (pH 6-8) y buffer Tris-HCl (pH 8-9). En el caso de la temperatura, el efecto sobre la reducción de Cr(VI) fue determinado por incubación de las mezclas de reacción en un rango de 10-60°C en el buffer correspondiente a pH óptimo de cada ELC.

Efecto de iones y especies dadoras de electrones

La actividad de la enzima en los ELC fue determinada en presencia de los siguientes iones (concentración final 1 mM): Hg^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , a partir de

soluciones stock de HgCl_2 , FeCl_3 , Na_2SO_4 , MnSO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , ZnSO_4 , CuCl_2 . La influencia de NADH y NADPH como especies dadoras de electrones también fue ensayada.

Técnicas analíticas

Determinación de Cr(VI)

La técnica se basa en la medida colorimétrica del complejo coloreado rosa-violeta, formado después de la reacción del Cr(VI) con difenilcarbazida (DFC) en solución ácida a $\text{pH } 1,0 \pm 0,3$ (Urone, 1945). Un protocolo miniaturizado fue desarrollado empleando: 50 μL de muestra, 50 μL de H_2SO_4 0,2 N y volumen suficiente de agua destilada para 2 mL. A la mezcla de reacción, se adicionaron 40 μL de solución de DFC (5 mg DFC mL^{-1} acetona). Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, las determinaciones fueron realizadas a 540 nm (Beckman DU640 UV-VIS) contra un blanco de reactivo.

Determinación de Proteínas

Se utilizó el Quantipro BCA assay Kit (SIGMA), que determina proteínas totales por reacción con ácido Bicinconínico (BCA). La absorbancia se determinó a 562 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los nuevos aislamientos, designados como *P. jadinii* y *P. anomala*, mostraron resistencia y capacidad de remoción de Cr(VI), en cultivos adicionados con una concentración de 1 mM de Cr(VI). Después de la lisis por sonicación, los ELC obtenidos mostraron actividad reductora de cromato en las condiciones ensayadas, al igual que otras cromato reductasas reportadas en ELC de varias especies de bacterias, aunque sólo unas pocas de ellas han sido purificadas y caracterizadas (Thacker y col., 2007).

pH óptimo

Para caracterizar la actividad cromato reductasa en los ELC, se ensayó la actividad en un rango de pH de 4,0-9,0. El valor óptimo fue obtenido en buffer Fosfato a pH 6,0 y 7,0, para *P. jadinii* y *P. anomala*, respectivamente. De acuerdo a las Figuras 1, *P. jadinii* pierde casi un 30% de actividad cuando el pH se incrementa una unidad, a diferencia de lo observado para *P. anomala* (Figura 2), donde se observa una caída del 20% tanto a pH 6 y 8. Estos valores concuerdan con lo reportado para bacterias, donde se observó una marcada caída de la actividad a pH alcalino y un máximo de actividad en un rango de pH entre 5-9 (Bae y col., 2005; Elangovan y col., 2006).

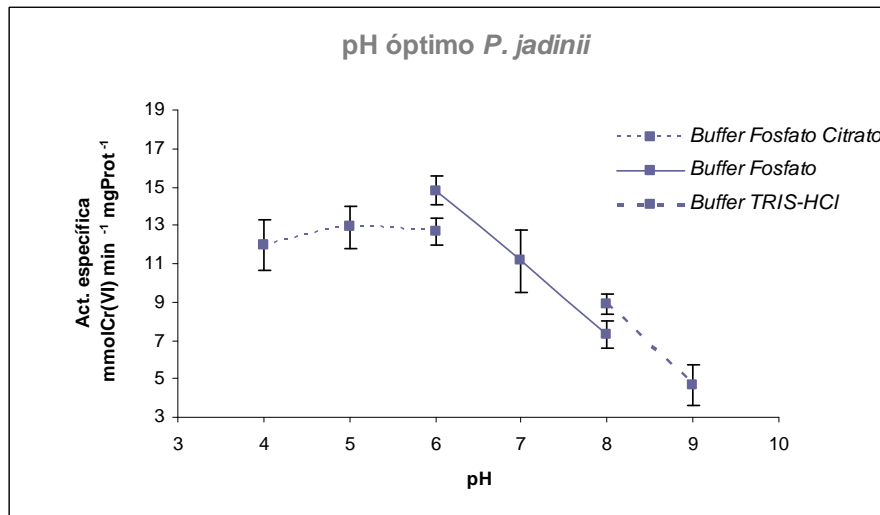


Figura 1: Efecto del pH y la especie de buffer usado sobre la actividad reductora de cromato en ELC de *P. jadinii*.

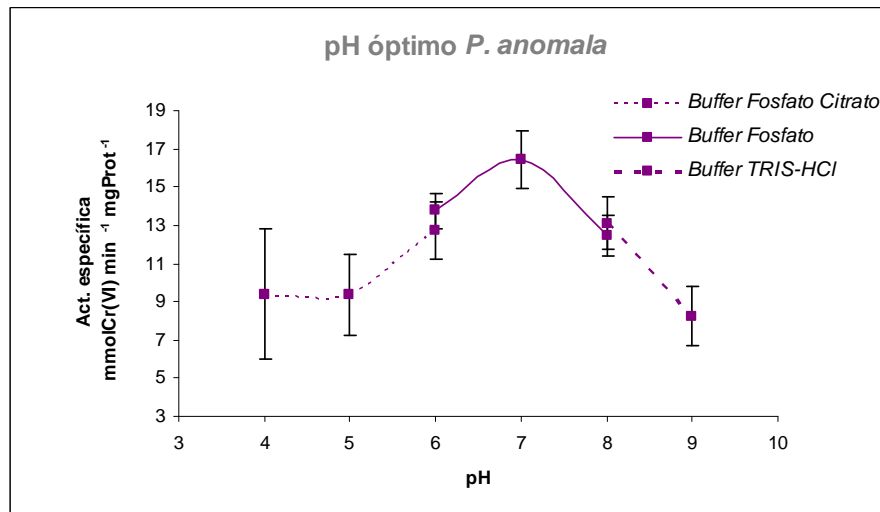


Figura 2: Efecto del pH y especie de buffer usado sobre la actividad reductora de cromato en ELC de *P. anomala*.

Temperatura óptima

Cuando se incubó a temperaturas entre 10 y 60°C, se observó que para *P. jadinii*, la temperatura óptima sería máxima a valores cercanos a 50°C en buffer Fosfato pH 6 mientras que para *P. anomala* la óptima fue cercana a los 30°C en el mismo buffer a pH 7, observando un descenso más marcado por fuera del óptimo para *P. anomala* que para *P. jadinii* (Figura 3). A partir de estos resultados, se realizó un análisis más exhaustivo empleando un gradiente de temperatura entre 40 y 60°C para *P. jadinii* y entre 20 y 40°C para *P. anomala*. Así se alcanzaron actividades máximas a 55°C para *P. jadinii* y a 35°C para *P. anomala*. (Figuras 4 y 5).

Efecto de iones

Se conoce que los metales afectan la actividad de las enzimas. En el caso de la cromato reductasa, el inhibidor más común reportado es el Hg^{2+} y el Cu^{2+} como activador (Camargo y col., 2003; Elagovan y col., 2006; Sarangi y col., 2008). Resultados similares se obtuvieron en ensayos con ELC de las levaduras seleccionadas.

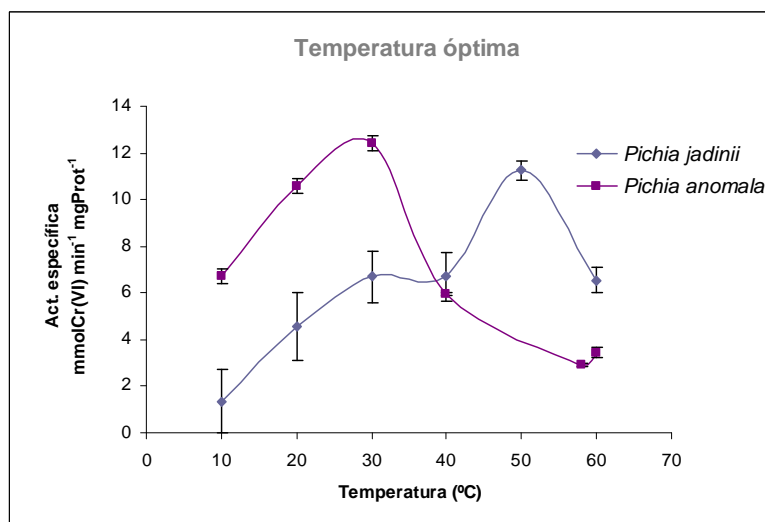


Figura 3: Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad cromato reductasa en ELC de *P. jadinii* y *P. anomala* en buffer Fosfato pH 6 y pH 7, respectivamente.

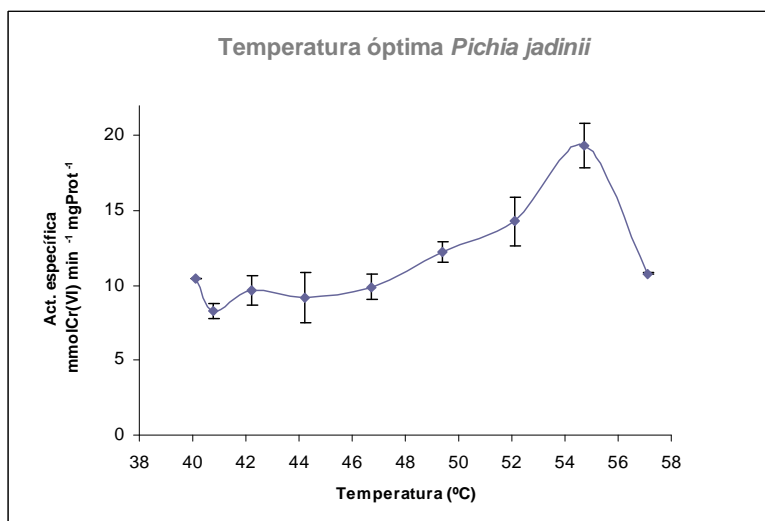


Figura 4: Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad reductora de cromato en ELC de *P. jadinii* en buffer fosfato pH 6.

La actividad cromato reductora de *P. anomala* mostró aumentos moderados respecto al control frente a Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ y Mg^{2+} con actividades porcentuales relativas respecto al control de 118, 112, 109, 108 y 108%, respectivamente. Se observó inhibición por el agregado de Hg^{2+} y Mn^{2+} en un 69% en ambos casos, y por Zn^{2+} en un 86%, en relación al control sin iones. En de *P. jadinii*, Mn^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} incrementaron la actividad reductora de

cromato en un 227, 137, 128%, respectivamente; mientras que Hg^{2+} , Zn^{2+} y Na^+ inhibieron la actividad en distintas proporciones (69-90%) (Figura 6). Park y col. (2000), sugieren la presencia de un grupo tiol en la catálisis debido a la inhibición reportada por mercurio, mientras que la función del ión cobre en la activación todavía no ha sido esclarecida.

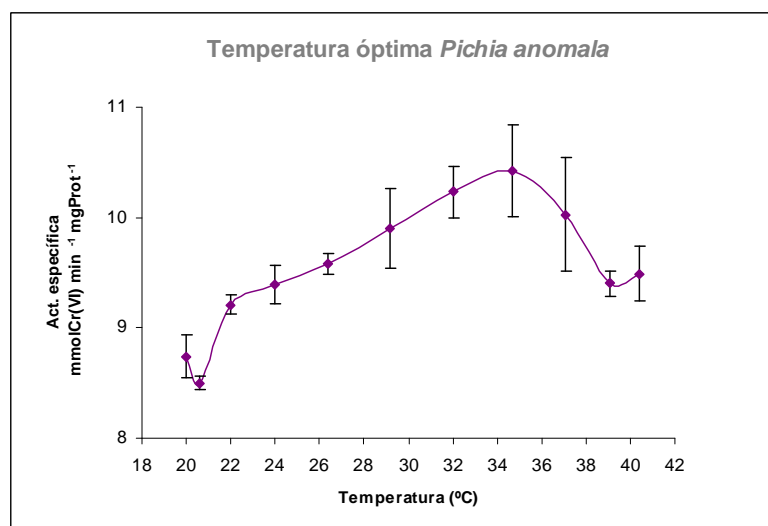


Figura 5: Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad reductora de cromato en ELC de *P. anomala* en buffer Fosfato pH 7.

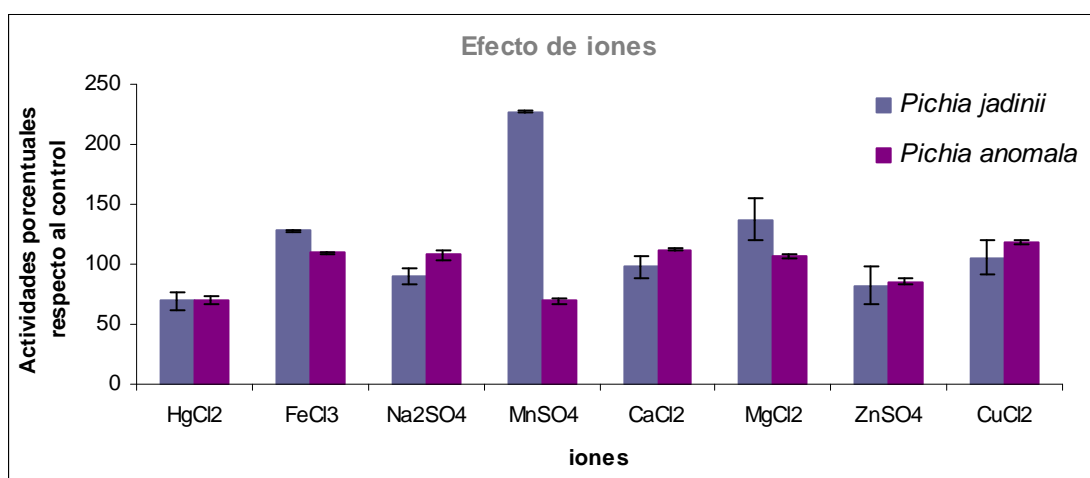


Figura 6: Efecto de iones metálicos sobre la actividad cromato reductasa a pH y temperatura óptimos para cada ELC.

Efecto especie dadora de electrones

La reducción de Cr(VI) requiere usualmente la presencia de una fuente de electrones, tales como NADH y NADPH (Puzon y col., 2002). La actividad específica del tipo cromato reductasa en los ELC obtenidos fue favorecida por la adición de NADH a la mezcla de reacción. También se observó actividad cuando se usó NADPH, pero menor a la obtenida con NADH, presentando una caída del 65% para *P. jadinii* y del 54% para *P. anomala*, con respecto a los valores alcanzados con NADH (Figura 7). Reportes previos en enzimas de

origen bacteriano mostraron resultados similares cuando se estudio la dependencia de las especies dadoras de electrones (Camargo y col., 2003; Bae y col., 2005; Desai y col., 2008).

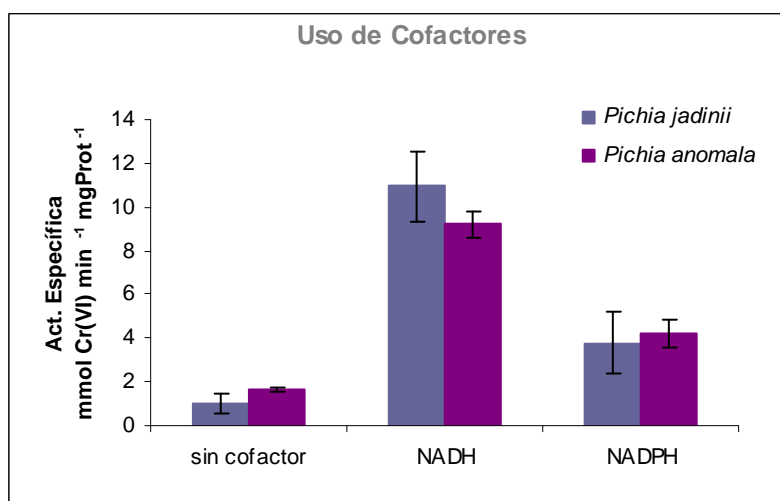


Figura 7: Actividad cromato reductora en ausencia y presencia de NADH y NADPH

CONCLUSIONES

Este trabajo describe la caracterización de la actividad reductora de cromato en extractos libres de células de las levaduras *P. jadinii* y *P. anomala*. Ambas actividades precisan de NADH o NADPH como dadores de electrones, siendo mayores en presencia de NADH. El ELC de *P. jadinii* posee su máxima actividad en buffer Fosfato pH 6, a una temperatura de incubación de 55°C y en presencia del ión Mn²⁺. Para *P. anomala*, el máximo de actividad se observó a pH 7 del mismo buffer, a 35°C y en presencia de Cu²⁺. Futuros estudios enfocados en la purificación de enzimas presentes en ELC de las levaduras seleccionadas permitirán ampliar el conocimiento de los mecanismos de reducción de Cr(VI), para proponer una aplicación biotecnológica en el tratamiento de efluentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al aporte financiero de: Agencia Nacional Promoción Científica y Técnica (ANPCYT-PICT 38164/05 BID 1728/OC-AR), Universidad Nacional de Tucumán (UNT-CIUNT D-415) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

BIBLIOGRAFÍA

1. Appenroth KJ, Bischoff M, Gabrys H, Stoeckel J, Swartz HM, Walczak T and Winnefeld K. (2000). Kinetics of chromium (V) formation and reduction in fronds of the duckweed *Spirodela polyrhiza*-a low frequency EPR study. *J Inorg Biochem* 78: 235-242.
2. Bae WC, Lee HK, Choe YC, Jahng DJ, Lee SH, Kim SJ, Lee JH and Jeong BC. (2005). Purification and Characterization of NADPH-Dependent Cr(VI) Reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *J Microbiology* 43(1): 21-27.
3. Bopp LH and Ehrlich HL. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Arch Microbiol* 150: 426-431.
4. Camargo FAO, Okeke BC, Bento FM and Frankenberger WT. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu²⁺. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 569-573.
5. Cervantes C, Campos-Garcia J, Devars S, Gutierrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzman JC, Moreno-Sanchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25: 65-71.
6. Cheung KH and Gu JD. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int Biodeterior Biodegradation* 59(1): 8-15.
7. Desai C, Jain K and Madamwar D. (2008). Evaluation of *In vitro* Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill. *Bioresour Technol* 99(14): 6059-6069.
8. Elangovan R, Abhipsa S, Rohit B, Ligy P and Chandraraj K. (2006). Reduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett* 28: 247-252
9. Gadd GM. (2000). Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11: 271-279.
10. Jamnik P and Raspor P. (2003). Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *J Biochem Mol Toxicol* 17(6): 316-323
11. Katrochvil D, Volesky B and Demopoulos G. (1997). Optimizing Cu removal/recovery in a biosorption column. *Wat Res* 31:2327-2339.
12. Liu J, Zhang B, He X, Zhang P and Chai Z. (2001). Selection of a high-biomass, chromium-rich yeast strain and optimization of cultivation conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(4): 195-198.
13. Lloyd JR. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* 777: 1-15.
14. Muter O, Patmalnieks A, Rapoport A. (2001). Interactions of the yeast *Candida utilis* and Cr(VI): metal reduction and its distribution in the cell and medium. *Proc Biochem* 36(10): 963-970.
15. Park CH, Gonzalez D, Ackerley D, Keyhan M and Matin A. (2002). Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. In: Pellei, M, Porta A, Hinche RE (Eds.). Remediation and beneficial Reuse of Contaminated Sediments, vol. 3. Batelle Press, Columbus, OH.
16. Park CH, Keyhan M, Wielinga B, Fendorf S and Matin A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl Environ Microbiol* 66: 1788-1795.
17. Puzon J, Petersen J, Roberts A, Kramer D and Xun L. (2002). A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD⁺ complex. *Biochem Biophys Res Commun* 294(1): 76-81.
18. Ramírez-Ramírez R, Calvo-Méndez C, Ávila-Rodríguez M, Lappe P, Ulloa M, Vazquez-Juarez R and Gutierrez-Corona F. (2004). Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 85: 63-68.
19. Sarangi A and Krishnan C. (2008). Comparison of in vitro Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bioresour Technol* 99(10): 4130-4137.
20. Thacker U, Parikh R, Shouche Y and Madamwar D. (2007). Hexavalent Chromium reduction by *Providencia* sp. *Proc Biochem* 41(6): 1332-1337.
21. Urone PF. (1945). Stability of colorimetric reagent for chromium, S-diphenylcarbazide, in various solvents. *Anal Chem* 27:1354-1355.
22. Zayed A and Ferry N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* 249: 139-156.