

EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE UNA AZOREDUCTASA EN LA RESISTENCIA DE *Bacillus Subtilis* A LOS EFECTOS TÓXICOS DEL CROMO

Ayala García Juan Carlos (1), Valenzuela García Luz Idalia (2), Pedraza Reyes Mario (2)

1[Licenciatura en Biotecnología Genómica, Universidad Autónoma de Sinaloa] | [juancag.94@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [pedrama@ugto.mx]

Resumen

Las altas concentraciones de Cromo(VI) utilizadas en procesos industriales y el manejo inadecuado de sus residuos han convertido a este metal en un contaminante ambiental de creciente preocupación debido a los efectos mutagénicos y teratogénicos que puede llegar a causar. Por lo tanto, la reducción del Cr(VI) a su forma insoluble Cr(III) utilizando microorganismos o enzimas de estos es una alternativa eficiente en el tratamiento de desechos contaminados con Cr(VI). *Bacillus subtilis* cuenta en su genoma con el gen *yhdA* el cual codifica para una azoreductasa perteneciente a la familia "Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH", estas reducen el Cr(VI) a Cr(III) sin generar subproductos parcialmente reducidos que son citotóxicos y genotóxicos. En el presente trabajo se empleó una cepa de *B. subtilis* que sobreexpresa la azoreductasa YhdA con el fin de analizar los efectos conferidos por esta proteína en *B. subtilis* frente a los efectos tóxicos producidos por el Cr(VI). En consideración a los resultados obtenidos, la azoreductasa YhdA de *B. subtilis* es un candidato potencial para ser utilizado en la remediación de ambientes acuáticos contaminados con cromo, principalmente en su forma hexavalente.

Abstract

High concentrations of Chromium(VI) employed in industrial processes and the inadequate management of its waste have converted this ion in an environmental pollutant of increasing concern due to its potential mutagenic and teratogenic effects. Therefore, reduction of Cr(VI) to its insoluble form Cr(III) employing microorganisms or its enzymes can be a valuable strategy for the treatment of Cr(VI) contaminated waste. The genome of *Bacillus subtilis* possesses the gene *yhdA* gene, which encodes an azoreductase belonging to the family of "flavin mononucleotide oxide NADPH-dependent reductases" that may potentially reduce Cr(VI) to Cr(III) without generating partially reduced by-products that are cytotoxic and genotoxic. In this study, a *B. subtilis* strain overexpressing the azoreductase YhdA was employed in order to analyze the effects conferred to *B. subtilis* by this protein against the toxic effects produced by Cr(VI). Based on the results obtained, the azoreductase YhdA could be a potential candidate to be used in the remediation of aquatic environments contaminated with chromium mainly in the form of a chromate ion.

Palabras Clave

Bacillus subtilis; Azoreductasa, Cromoreductasas, YhdA, Cr(VI)

INTRODUCCIÓN

El uso industrial indiscriminado de compuestos derivados del cromo (Cr), ha ocasionado un incremento substancial de este metal en el medio ambiente [1,2]. El Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, siendo las especies trivalente (III) y hexavalente (VI) las formas más estables y abundantes [1]. Los efectos biológicos del Cr varían de acuerdo con su estado de oxidación [3]. El Cr(VI) es considerado altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y mutagénico en bacterias, ya que es altamente móvil y soluble en agua, lo que le permite atravesar con facilidad las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células utilizando el transportador de sulfato, debido a su analogía química con este ion [3,4,5]. Por su parte, el Cr(III) es un micronutriente para muchos organismos superiores, es relativamente insoluble en agua y es 100 veces menos tóxico que el Cr(VI), por lo cual es considerado relativamente inocuo [6]. Dadas las características de ambos oxianiones una alternativa para evitar los efectos tóxicos del Cr(VI) es reducirlo a Cr(III). Para llevar a cabo dicha reducción, generalmente se utilizan procesos fisicoquímicos los cuales tienen como objetivo eliminar o transformar los contaminantes presentes en fase acuosa mediante la adición de reactivos [7]. Sin embargo, dichos procesos son altamente costosos, no garantizan la remoción/reducción del contaminante y no son amigables con el ambiente [8]. Es por ello por lo que surge como una alternativa para la reducción del Cr(VI) la utilización de organismos vivos o enzimas derivadas de ellos [8]. En lo que respecta a la reducción del Cr por microorganismos, la búsqueda se centra en identificar determinantes de resistencia al ion cromato, principalmente aquellas enzimas capaces de catalizar la reducción de Cr(VI) a Cr(III) de manera directa, sin generar intermediarios indeseables como el Cr(V). En estudios previos se describió que *Bacillus subtilis* presenta una respuesta adaptativa al ion cromato [9]. Además, se demostró que dicha bacteria posee la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) [9]. Dichas evidencias experimentales sustentan fuertemente la hipótesis de la existencia de enzimas del tipo cromato reductasas en *B. subtilis*. En un estudio reciente a través de un

análisis bioinformático se demostró que la azoreductasa YhdA presente en esta bacteria mostró 63% de homología con la proteína ChrR de *Escherichia coli*, la cual representa a la cromato reductasa mejor descrita hasta ahora [10]. YhdA pertenece a un grupo de proteínas denominado "Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH" [11], mismo grupo al que pertenece ChrR, enzima eficiente en reducir el Cr(VI) a Cr(III) de manera directa sin generar intermediarios dañinos para la célula.

Dados los antecedentes planteados, se pretende determinar el papel que juega la azoreductasa YhdA presente en *B. subtilis* en la tolerancia en contra de los efectos mutagénicos ocasionados por el Cr(VI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este estudio se listan en las Tabla 1.

Para el crecimiento y propagación de las diferentes cepas tanto de *B. subtilis* como de *E. coli* se empleó el medio Luria-Bertani (LB).

La densidad óptica (DO) de los cultivos líquidos se determinó a 590nm. Cuando se requirió, los medios fueron suplementados con Kanamicina (Kn) 10 µg/mL.

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

| CEPA | GENOTIPO O FENOTIPO | REFERENCIA |
|-----------|--|-----------------|
| PERM 110 | <i>B. subtilis</i> 1A751 <i>eglS</i> Δ102, <i>bglT1/bglS</i> ΔEV <i>npr apr his</i> | Cepario PERMLab |
| PERM 1568 | <i>B. subtilis</i> 1A751 conteniendo el plásmido pDG148 con el ORF del gen <i>yhdA</i> (722pb) Kn ^R | Cepario PERMLab |
| PERM 1585 | <i>B. subtilis</i> 1A751 conteniendo el vector vacío pDG148 Kn ^R | Este estudio |

Caracterización molecular de la cepa PERM1585

Para corroborar la transformación de *B. subtilis* con el vector pDG148, se seleccionaron colonias con resistencia a Kn. Posteriormente se extrajo DNA plasmídico de estas clonas, con el cual se realizó análisis de restricción con la enzima EcoRV y los patrones de corte fueron analizados mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Ensayos de susceptibilidad al Cr (VI)

Para determinar la susceptibilidad de las cepas PERM1568 y PERM1585 (Tabla 1) al Cr(VI) se utilizó la siguiente metodología. Ambas cepas se crecieron a 37°C en medio LB a una DO₅₉₀ de 0.5. En este punto el cultivo se suplementó con IPTG (0.5 mM) y se incubó 2h a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, el cultivo se repartió en alícuotas de 2 mL en tubos de ensayo estéril, a los cuales se les adicionaron distintas cantidades de Cr(VI), como se indica en la Tabla 2. Los tubos fueron incubados 3h a 37°C en agitación, pasado este tiempo se efectuaron diluciones seriadas, las cuales fueron sembradas en placas de LB. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y posteriormente las colonias fueron contadas para determinar las dosis letales (DL) 50 y 90 de ambas cepas.

Tabla 2: Concentraciones de Cr(VI) utilizadas en los ensayos de susceptibilidad

| CEPA | Concentraciones de Cr(VI) en ppm |
|----------|----------------------------------|
| PERM1568 | 0, 50, 100, 200 y 300 |
| PERM1585 | 0, 12, 24, 48, 96 y 150 |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de cepas de *B. subtilis* portando el vector pDG148 (PERM1585) y la construcción para sobreexpresar *yhdA* (PERM1568)

La obtención de la cepa PERM1585 fue verificada mediante análisis de restricción de DNA plasmídico utilizando la enzima EcoRV. El patrón de corte del vector vacío (Figura 1, Carriles 1 y 2) fue comparado con el de la construcción que porta una copia del gen *yhdA* de la cepa PERM1568. Los productos de las restricciones analizados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostraron la obtención de las bandas esperadas (Fig. 1).

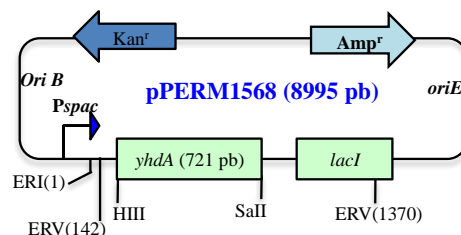
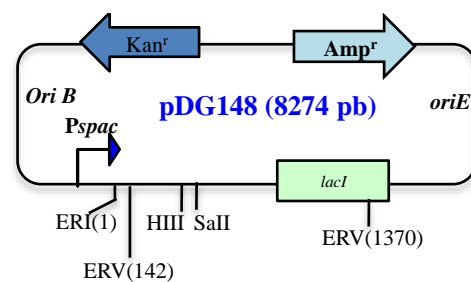
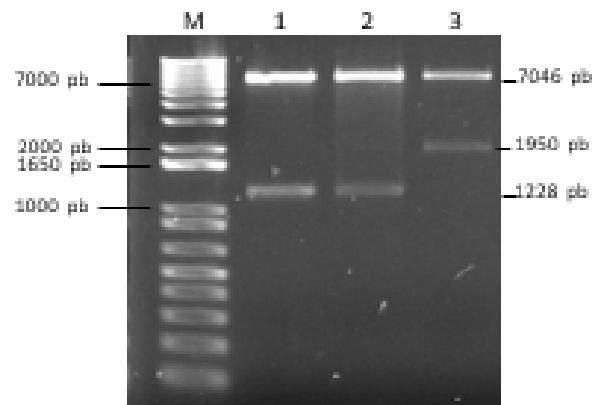


Figura 1. Análisis de restricción de mini-preparaciones de ADN plasmídico de las cepas *B. subtilis* PERM1568 y PERM1585. M) Marcadores de peso molecular; Carriles, Carril 1: Patrón de restricción del plásmido pDG148 cortado con EcoRV (Control +); Carril 2: Patrón de restricción del plásmido extraído de la cepa PERM1585 cortado con EcoRV; Carril 3: Patrón de restricción del plásmido extraído de la cepa PERM1568 cortado con EcoRV. **Abajo)** Mapas del vector pDG148 y pPERM1568 mostrando los sitios de corte para EcoRV.

Efecto de la sobreexpresión de *yhdA* en la capacidad de resistencia de *B. subtilis* a los efectos citotóxicos de Cr(VI)

Las dosis letales 50 y 90 determinadas mediante la estrategia descrita en Materiales y Métodos mostraron que la cepa *B. subtilis* PERM1568, que porta la construcción que sobreexpresa al gen *yhdA* fue menos susceptible que la cepa control (PERM1585) a los efectos nocivos del ion cromato. Los datos preliminares mostrados en la Tabla 3 indican que en referencia a la cepa control, la sobreexpresión de *yhdA* incrementó alrededor de 100% la resistencia de la bacteria al tratamiento con el ion metálico.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *yhdA* reduce los efectos citotóxicos ocasionados por el Cr(VI), lo que le confiere a *B. subtilis* la capacidad de tolerar mayores concentraciones de este metal. Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Ackerley y col. (2004) [12] y González y col. (2005) [13], para la enzima ChrR de *Pseudomonas putida*, perteneciente a la misma familia de proteínas de YhdA, la cual se reportó le permite a esta bacteria tener una mayor resistencia y protección a los efectos nocivos del ion cromato. El mecanismo mediante el cual YhdA protege a *B. subtilis* de los daños celulares causados por el Cr(VI) se encuentra actualmente en investigación en nuestro laboratorio.

Tabla 3: Dosis letales (DL) 50 y 90 de las cepas PERM1568 y PERM1585 en ppm al tratamiento con Cr (VI)

| Cepa | DL ₅₀ | DL ₉₀ |
|----------|------------------|------------------|
| PERM1568 | 100 ppm | 220 ppm |
| PERM1585 | 44 ppm | 120 ppm |

CONCLUSIÓN

La sobreexpresión del gen *yhdA* incrementó la resistencia de *B. subtilis* a los efectos nocivos del ion cromato.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP-936-2016 y 1090-2016). Los autores agradecen el apoyo técnico de Rocío Rubí Díaz Trujano y Norma Ramírez Ramírez. JC. Ayala-García agradece la beca otorgada por la DAIP durante la estancia de verano 2017.

REFERENCIAS

- [1] Ramírez-Díaz, MI., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismo y aplicaciones. REB 28(3), 73-79.
- [2] Martínez-Pérez, R., Sandoval-Ibarra, P., Cárdenas-González, JF., Martínez-Juárez, VM. & Acosta-Rodríguez I. (2011). Reducción y remoción de cromo VI en solución por la cascara de lichee (*Litchi chinensis* Soon). Geoquímica Ambiental. 2(1), 1-8.
- [3] Gutiérrez-Corona, JF. & Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: Mecanismos y potencial biotecnológico. CONCYTEG 37(3), 21-36.
- [4] Masood, F. y Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* Sp. Strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. Bull Environ Contam Toxicol 86(4), 114-119.
- [5] Losi, ME., Amrhein, C. y Frankenberger, T.J. (1994). Environmental biochemistry of chromium. Environ Contam Toxicol 136: 91-131.
- [6] Megharaj, M, Avudainayagam, S & Naidu, R. (2002). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. Current Microbiol 47: 51-54.
- [7] Kaifer MJ. (2006). Tratamientos físico-químico de residuos. Ingeniería y gestión medio ambiental. 3-46.
- [8] Castillo Rodríguez, F., Roldán Rúa, MD, Blasco Plá, R & Caballero Domínguez, FJ. (2005). Biotecnología ambiental. (1era edición). Madrid, editorial Tébar.

- [9] Santos-Escobar, F., Gutiérrez-Corona, F. & Pedraza-Reyes, M. (2014). Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system (GO) in counteracting hexavalent chromium-promoted-oxidative DNA damage. *Appl Environ Microbiol* 80(17), 5493- 5502.
- [10] Díaz-Trujano, RR., Ramírez-Ramírez, N. & Pedraza-Reyes Mario. (2016). Obtención de una construcción génica para la sobreexpresión homóloga del gen *yhdA* de *Bacillus subtilis*. *Jóvenes en la ciencia* 3 (2): 1-5.
- [11] Deller S, Sollner S, Trenker-El-Toukhy R, Jelesarov I, Gubitz GM & Macheroux P. (2006). Characterization of a Thermostable NADPH:FMN Oxidoreductase from the Mesophilic Bacterium *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 45(1), 7083-7091.
- [12] Ackerley, DF, Gonzalez, CF, Park, CH, Blake R, Keyhan M & Matin A (2004) Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70:873–882.
- [13] González, CF., Ackerley, DF., Lynch, SV. & Matin A (2005) ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H₂O₂. *J Biol Chem* 280:22590–22595.