



Oxidoreductasas Bacterianas: Enzimas Ubicuas con Aplicación Potencial en Bioremediación de Efluentes contaminados con Cr(VI)

Mario Pedraza Reyes^{1*}, Rocío Rubí Díaz Trujano¹ y Norma Ramírez Ramírez¹.

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., CP. 36050, México.

*Para correspondencia: pedrama@ugto.mx

Resumen

Las industrias generan grandes cantidades de contaminantes entre ellos los colorantes tipo “azo” y el cromo (VI), por ello la bioremediación con microorganismos o las enzimas que estos producen pueden ser una alternativa para contrarrestar los efectos nocivos de estos contaminantes. *Bacillus subtilis* cuenta con genes que codifican proteínas pertenecientes a un grupo de enzimas denominado FMN-Oxido Reductasas. En algunas bacterias, homólogos de estas proteínas reducen el Cr(VI) a Cr(III) sin generar subproductos tóxicos. En el presente manuscrito se describe la ubicuidad de estas proteínas, así como las características estructurales y su potencial aplicación en bioremediación de efluentes contaminados con metales pesados y compuestos nitrogenados carcinógenos.

Palabras clave: Bacterias, Oxidoreductasas, Cromo, Bioremediación

Abstract

Anthropomorphic activities release contaminants to aqueous effluents including “azo” dyes and chromium (VI) which are potentially genotoxic and cytotoxic. Therefore, bioremediation of polluted environments with microorganisms or enzymes produced by them are excellent alternatives to counteract the noxious effects of these compounds. *Bacillus subtilis* possesses genes encoding proteins belonging to a group of enzymes called FMN-Oxide Reductases. In distinct bacteria, this class of enzymes reduce Cr(VI) to Cr(III) without generating cytotoxic by-products. In this manuscript, we describe the distribution, functional and structural properties of these proteins which makes them potential candidates to remediate effluents contaminates with heavy metals and nitrogen-based carcinogenic compounds.

Key words: Bacteria, Oxide Reductases, bioremediation



Desarrollo

Diferentes actividades industriales utilizan metales pesados para sus procesos, incluyendo al Cromo (Cr), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), entre otros. La contaminación del agua con Cr(VI) causada por diferentes industrias, incluyendo la del cuero, representa un serio problema ambiental (Wuana y Okieimen, 2011; Chourey y col., 2006). Se estima que a nivel mundial billones de gentes enfrentan serios riesgos de salud al ingerir agua contaminada con cantidades de Cr(VI) suficientes para generar neoplasias (Costa y Klein, 2006, Quievryn y col., 2003). La industria textil también genera contaminación ambiental al descargar grandes volúmenes de agua con altos contenidos de colorantes sintéticos; se estima que alrededor del 10-15% de los tintes que no se unen a las fibras de las prendas son eliminados al medio ambiente afectando la integridad de los ecosistemas (Kumar y col., 2007; Sudha y col., 2014). Los colorantes tipo “azo” son particularmente peligrosos por su potencial genotóxico induciendo en la

especie humana diferentes tipos de cáncer (Rawat y col., 2016).

Los nichos ecológicos que sufren problemas de contaminación con cromo son propicios para la búsqueda de bacterias resistentes a este contaminante (Cervantes y col, 2001). Sin embargo, el aislamiento de estas y la corroboración de su capacidad de crecer en medios contaminados artificialmente con Cr(VI) no garantiza su aplicación inmediata en procesos de remediación de este metal. Esto obedece a que muchas bacterias toleran altas concentraciones de Cr(VI) mediante procesos que promueven su expulsión del interior celular antes de que este ejerza sus efectos nocivos (Cheung y Gu, 2007), lo que no elimina el problema de contaminación con este ion. Adicionalmente, es necesario invertir esfuerzos experimentales a largo plazo para caracterizar a nivel fisiológico, bioquímico y molecular estos microorganismos aislados antes de aplicarlos racionalmente en los procesos de bioremediación.

Se considera que una alternativa más directa es aplicar la bioinformática a



la búsqueda de determinantes de resistencia al ion cromato en genomas de bacterias de vida libre capaces de proliferar en distintos hábitats y cuya información se encuentre disponibles en las bases de datos. El aislamiento de la información genética de dichos determinantes, mediante síntesis de DNA dirigida, clonación y expresión en un huésped conocido es una estrategia potencial para el diseño racional de bacterias recombinantes con potencial utilidad en procesos de remediación de ambientes contaminados con cromato (Ramírez y col., 2008; Rojas y col., 2010; Romero y col., 2009; Romero y col., 2004).

Entre los potenciales determinantes de resistencia al ion cromato existentes en bacterias, resaltan las “Oxidorreductasas”, enzimas que participan en distintos procesos celulares que utiliza eventos enzimáticos de oxidación/reducción (Ackerley y col., 2004, Ramírez y col., 2008). Interesantemente, una enzima de esta clase, codificada por el gen *yieF*, ha sido descrita en la bacteria intestinal *Escherichia coli* (Park y col., 2002; Ackerley y col., 2004). La gran

importancia de esta enzima recae en su capacidad de convertir directamente el Cromo (VI) a Cr (III) sin generar productos intermediarios indeseables como el Cr(V) (Ackerley y col., 2004).

En un estudio previo (Liu y col., 2015) se demostró que una línea celular modificada genéticamente para sobreexpresar al gen *yieF* fue capaz de incrementar su resistencia a los efectos tóxicos promovidos por el Cr(VI), lo cual resalta la potencial aplicación de esta enzima en aspectos de bioremediación y en biomedicina. Una de las cromato-reductasa más estudiadas es la proteína ChrR de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas putida*, una flavo-enzima soluble que une FMN y cataliza la reducción de Cr(VI) a Cr(III) (Park y col., 2000). ChrR, además de poseer actividad de cromato reductasa, reduce ferrocianuro y presenta una actividad de quinona reductasa, generando flavin-semiquinona durante la reducción de cromato. De esta manera, ChrR representa un mecanismo potencial de defensa antioxidante reduciendo el estrés de las células en esta bacteria ocasionado por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el radical



superóxido (González y col., 2005). Tanto ChrR (*P. putida*) como YieF (*E. coli*) han sido agrupadas en la familia “FMN Reductasas dependientes de NAD(P)H” (FMN-Red). Esta familia, comprende actualmente más de 200 proteínas que adoptan estructuras cuaternarias diméricas o tetraméricas que se distinguen por compartir un dominio proteico conteniendo residuos altamente conservados involucrados en la unión del cofactor FMN (Fig. 1).

La familia de proteínas FMN-red se puede dividir en diez grupos principales pero sólo tres de estos incluyen proteínas caracterizadas y se definen como subfamilias. La subfamilia I es el grupo más numeroso con 73 secuencias homólogas, y está presente principalmente en proteobacterias. En esta subfamilia está incluida la proteína ChrR de *P. putida* descrita anteriormente. La subfamilia II, con más de 30 proteínas homólogas, está presente principalmente en proteobacterias y plantas. La enzima YieF de *E. coli* (Ackerley y col., 2004), la FMN reductasa de *P. aeruginosa* PAO1 (Agarwal y col., 2006) y la NAD(P)H: quinona reductasa (NQR) de

Arabidopsis thaliana (Sparla y col., 1999) pertenecen a este grupo. La subfamilia III comprendida por una decena de Oxidorreductasas reportadas en bacterias del filo firmicutes, hongos y el mixomiceto *Dictyostelium discoideum*. Dos proteínas de esta familia han sido caracterizadas, la Azoreductasa de *Bacillus sp.* OY1-2 (Suzuki y col., 2001) y la proteína dimérica de *S. cerevisiae* YLR011wp (Liger y col., 2004). Ambas mostraron capacidad reductora sobre los colorantes tipo “azo” y los compuestos nitrogenados; YLR011wp mostró también poseer actividad de ferrocianuro reductasa (Liger y col., 2004).

En estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo, se demostró que la bacteria esporulante *B. subtilis* cuenta con una respuesta adaptativa al ion cromato (Santos y col., 2014). Además, se demostró que esta bacteria posee la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) (Santos y col., 2014). Estas evidencias experimentales sustentan fuertemente la hipótesis de la existencia de enzimas con actividad de cromato reductasa en *B. subtilis*. De



acuerdo con esta noción, se realizó un análisis bioinformático, el cual mostró que en el genoma de esta bacteria existen los genes *yhdA* y *ywqN* los cuáles codifican para potenciales proteínas de la familia FMN-Red. En apoyo de esta propuesta, un alineamiento de las secuencias primarias de los productos

predichos de ambos genes con las proteínas YeiF de *E. coli* y ChrR de *P. putida* demuestra un alto grado de homología entre las 4 proteínas, particularmente en el subdominio involucrado en la unión de los cofactores FMN y NADPH (Fig. 1).



Figura. 1. Alineamiento de secuencias de proteínas pertenecientes a la familia FMN-Red mediante el programa CLUSTAL WQ. BS-YwqN (YwqN de *B. subtilis*); BS-YhdA (YhdA de *B. subtilis*); EC-YeiF (YeiF de *E. coli*); PP-ChrR (ChrR de *P. putida*). En el recuadro gris se muestra un dominio altamente homólogo involucrado en la unión de los cofactores FMN y NADPH.²

CONCLUSIONES

En conclusión, la información presentada en este manuscrito sustenta la idea de que las enzimas de la familia FMN-Red se encuentran ampliamente distribuidas en organismos de los tres dominios de la vida y que estas representan potenciales determinantes de resistencia al ion cromato. La aplicación de enfoques moleculares,



fisiológicos, bioquímicos y estructurales permitirán confirmar o refutar la predicción de que proteínas como YwqN y YhdA de *B. subtilis* posean la capacidad de reducir el Cr(VI) al Cr(III) sin generar intermediarios tóxicos, demostrando así su potencial aplicación en la bioremediación de efluentes contaminados con este metal.

AGRADECIMIENTOS. Trabajo apoyado por CONACYT (Subsidios: 205744 and 221231) y UGTO (Subsidios: 936-2016 and 1090-2016). RRDT fue apoyada con becas del CONACyT-México y de la Universidad de Guanajuato.

Referencias

Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., and Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 873–882.

Agarwal, R., Bonnano, J.B., Burley, S.K., Swaminathan, S. (2006) Structure determination of an FMN-reductase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 using sulfur anomalous signal. *Acta Cryst. D* 62:383–391

Cervantes, C., Campos G.J., Devars, S., Gutiérrez, C.F., Loza, T.H., Torres G.J.C., Moreno S.R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 335–347.

Costa M., and Klein, C.B., (2006). Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 6: 155–163.

Cheung K.H. , Gu J.D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59: 8-15



Chourey, K., Thompson, M., Morrell, F.J, VerBerkmoes, N., Brown, S., Shah, M., Zhou, J., Doktycz, M., Hettich, R., Thompson, D. (2006). Global molecular and morphological effects of 24-hour chromium (VI) exposure on *Shewanella oneidensis* MR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6331–6344.

Gonzalez, F. C., Ackerley, F.D., Lynch, S.V., and Matin, A. (2005). ChrR, a Soluble Quinone Reductase of *Pseudomonas putida* That Defends against H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 280: 22590-22595

Kumar, K., Devi, S.S., Krishnamurthi, K., Dutta, D., and Chakrabarti, T. (2007) Decolorisation and detoxification of Direct Blue-15 by a bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* 98: 3168-3171.

Liger, D., Graille, M., Zhou, C.Z, Leulliot, N., Quevillon, Ch.S, Blondeau, K., Janin, J., Van, T. H. (2004). Crystal structure and functional characterization of yeast YLR011wp, an enzyme with NAD(P)H-FMN and ferric iron reductase activities. *J Biol Chem.* 279:34890–34897

Liu, X., Wu, G., Zhang, Y., Wu, D., Li, X., Liu, P. (2015). Chromate Reductase YieF from *Escherichia coli* enhances hexavalent chromium resistance of human HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 11892-11902

Park, C.H., Gonzalez, C.F., Ackerley, D.F., Keyhan, M., Matin, A. (2002) Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. p. 103–11. *In*: Hinchee RE, Porta A, Pellei M. (Eds). Remediation and reuse of contaminated sediments. Proceedings of the First International Conference on Remediation of Chlorinated Sediments (Venice, Italy, 10-12 October 2001), Volume S1-3. Columbus (Ohio): Battelle Press.



Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J., and Zhitkovich, A. (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry*. 42:1062–1070

Ramirez, D.M.I., Diaz, P.C., Vargas, E., Riveros, R.E., Campos, G.J., Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*. 21:321-332

Ramírez, R.N., Romero, G.E.R., Calderón, V.C., Avitia, C.I., Téllez, V.A., Pedraza R.M. (2008). Expression, characterization and synergistic interactions of *Myxobacter* Sp. AL-1 Cel9 and Cel48 glycosyl hydrolases. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 247-257.

Rawat, D., Mishra, V., and Sharma R.S. (2016). Detoxification of azo dyes in the context of environmental processes. *Chemosphere*. 155:591-605

Rojas, C.J.A., Pedraza, R.M., Ordoñez, L. G., Estrada, N.U., Barba de la Rosa, A.P., De León, R.A. (2010). Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*. 64: 170-176.

Romero, G.E.R., Trujillo, M.F., Téllez, V.A., Sampedro, J.G., Rojo D.A., García, S.J., Pedraza, R.M. (2009). Engineering and directed evolution of a Ca²⁺ binding site A-deficient AprE mutant reveal an essential contribution of the loop Leu₇₅-Leu₈₂ to enzyme activity. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009:201075

Romero, G.R.E., Esquivel, N.J.A., Ramírez, R.N., García, S.J. and Pedraza, R.M. (2004). A single Ser₈₅Ala mutation enhances the catalytic efficiency of subtilisin E from *B. subtilis* 168. *Biotechnology (ANSI)*. 3: 49-55



Santos, E.F., Gutiérrez, C.F., and Pedraza, R.M. (2014). Role of *Bacillus subtilis* Error Prevention Oxidized Guanine System (GO) in Counteracting Hexavalent Chromium-Promoted-Oxidative DNA Damage. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 5943-5502.

Sparla, F., Tedeschi, G., Pupillo, P., Trost, P. (1999). Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT₂-diaphorase. *FEBS Lett.* 463:382–386

Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., and Sivakumar, N. (2014). Microbial degradation of Azo Dyes: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 670-690

Suzuki, Y., Yoda, T., Ruhul, A., and Sugiura, W. (2001) Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus sp.* OY1–2 isolated from soil. *J Biol Chem.* 276:9059–9065

Wuana, R.A., and Okieimen, F.E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 2011, doi:10.5402/2011/402647.