

COMUNICACIÓN CORTA

PIOVERDINA PARA LA EXTRACCIÓN DE METALES PESADOS EN AMBIENTES CONTAMINADOS

PYOVERDINE FOR THE EXTRACTION OF HEAVY METALS IN CONTAMINATED ENVIRONMENTS

TRABAJO PRESENTADO VII SIMA 2023



Susana Ochoa Agudelo^{a,*} (0000-0001-5369-7137)
Juan Felipe Osorio^a (0000-0002-4675-5201)
Andrés Felipe Villa Restrepo^b (0000-0001-5870-1641)

^aFacultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia
^bEscuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^{} susana.ochoa@colmayor.edu.co

Recibido: 25 de noviembre de 2023;

Aceptado: 13 de enero de 2024;

RESUMEN

Introducción: Los sideróforos son péptidos de bajo peso molecular con actividad específica para quelar iones férricos y otros metales. Las bacterias, hongos, plantas y algunos mamíferos tienen la capacidad de producir estos metabolitos, los cuales han sido ampliamente estudiados para comprender su mecanismo. Dentro de los sideróforos se encuentran diferentes grupos de metabolitos, los pioverdinas se encuentran dentro del grupo mixto las cuales al quelar el hierro interactúan con unos receptores de membrana específicos que captan nuevamente las pioverdinas, y esta ingresa a la célula con el complejo hierro-pioverdina. Este mecanismo supone una propuesta de estudio, que permita identificar una interacción del metabolito con otros metales, con el fin de plantear una alternativa para remover metales pesados a nivel ambiental, y de esta manera, minimizar efectos negativos que se puedan generar a nivel de la salud humana o ambiental. **Objetivo:** Este proyecto evalúa la producción de pioverdina, en presencia de metales pesados y su interacción con el extracto. **Metodología y resultados:** Diferentes microorganismos productores de pioverdinas, se expusieron a diferentes concentraciones de cadmio, mercurio y plomo, para evaluar la densidad celular y relacionar la capacidad de producción de pioverdina en presencia de los metales, teniendo en cuenta como control un medio sin metales. Del mejor microorganismo productor de pioverdinas, se obtuvo el extracto de pioverdina para analizar su actividad con el metal. **Conclusiones:** Los microorganismos toleran la presencia de plomo, pero no la de Cadmio y mercurio, afectando la densidad celular poblacional. La presencia del metal afecta la presencia del siderofo, evidenciando una posible interacción, sin embargo, más estudios son requeridos.

Palabras clave: Metales pesados, pioverdinas, extracción química, sideróforos, biorremediación.

ABSTRACT

Introduction: Siderophores are low molecular weight peptides with specific activity to chelate ferric ions and other metals. Bacteria, fungi, plants and some mammals have the ability to produce these metabolites, which have been widely studied to understand their mechanism. Within the siderophores there are different groups of metabolites, the pyoverdines are found within the mixed group which, when chelating iron, interact with specific membrane receptors that capture the pyoverdines again, and it enters the cell with the iron complex. -pyoverdina. This mechanism represents a study proposal that allows identifying an interaction of the metabolite with other metals, in order to propose an alternative to remove heavy metals at the environmental level, and in this way, minimize negative effects that may be generated at the level of the environment. human or environmental health. **Objective:** This project evaluates the production of pyoverdine, in the presence of heavy metals and its interaction with the extract. **Methodology and results:** Different pyoverdine-producing microorganisms were exposed to different concentrations of cadmium, mercury and lead, to evaluate cell density and relate the pyoverdine production capacity in the presence of metals, taking into account a metal-free medium as a control. From the best pyoverdine-producing microorganism, the pyoverdine extract was obtained to analyze its activity with the metal. **Conclusions:** Microorganisms tolerate the presence of lead, but not cadmium and mercury, affecting population cell density. The presence of the metal affects the presence of the siderophore, evidencing a possible interaction; however, more studies are required.

Keywords: Heavy metals, pyoverdines, chemical extraction, siderophores, bioremediation.

INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* spp. representa a un grupo de microorganismos con alto potencial para aplicaciones biotecnológicas, que gracias a su metabolismo y síntesis de metabolitos, hoy en día se considera uno de los géneros microbianos modelo, para aplicaciones en biorremediación, fitorremediación, promotor de crecimiento vegetal y productor de sustancias bioactivas con capacidad moduladora para el desarrollo de otros microorganismos (bacterias u hongos patógenos) (Dell'Anno et al., 2022; Sajeed Ali & Vidhale, 2013). Por ejemplo, diferentes especies de *Pseudomonas* han sido reportadas con capacidad biorremediadora de metales pesados, entre ellos cadmio, níquel, plomo y mercurio (Alhasawi et al., 2015; Chien et al., 2013), este proceso asociado a la presencia de enzimas, entre ellas metalotioneínas, ureasas; otros mecanismos asociados a procesos de biosorción del metal a través de la aplicación de biomasa viva o muerta para su remoción (Oves et al., 2017). La producción de sideróforos está asociada a la deficiencia de hierro en el medio (Patel et al., 2018), donde estas moléculas intervienen en la quelación de hierro; cabe resaltar que, otros estudios discuten la posibilidad que la fuente de otros metales, puede estimular su producción (Patel et al., 2018), y de esta manera, se podría aprovechar su mecanismo para la quelación de otros metales con efectos de biorremediación en aguas y/o suelos. De acuerdo con lo expuesto, el género *Pseudomonas*, productor de sideróforos tipo pioverdinas, tiene potencial para ser utilizado en la producción del metabolito con potencial biorremediador. Estudios como el de Peron et al., (2018), demuestran que la presencia de pioverdina en un medio líquido con cesio, permitió la liberación del compuesto como parte de la asistencia en un proceso de fitorremediación, donde se evidenció cinco veces más la extracción del compuesto, en presencia de pioverdina. Para el estudio de dichas moléculas, y definir la tolerancia del microorganismo al metal e identificar si la presencia de este estimula su producción, o si, por el contrario, la presencia del metabolito y el metal permite formar complejos pioverdina-metal, para facilitar su remoción, se requieren estudios, por lo cual, este trabajo se enfocó en analizar la producción y extracción de pioverdina en dos cepas de *Pseudomonas* spp., y adicionalmente, se evaluó la tolerancia de las cepas a diferentes concentraciones de metales como cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb), y su con relación con la presencia de pioverdinas en el medio.

METODOLOGÍA

Producción de sideróforos: cepas de *Pseudomonas* spp. previamente tamizada por prueba CAS en placa, fueron identificadas como productoras de sideróforos. Dichas cepas, fueron sembradas en medio MMS (medio mínimo con ácido succínico) para estimular la producción de pioverdinas. El medio MMS sin inocular, se utilizó como control negativo (Patel et al., 2018; Patil et al., 2017; Yu et al., 2017). Cada medio se inoculó con el 5 % de microorganismo en una cantidad de 10^5 células/ml, en una temperatura de 32°C, a 150 rpm durante 24 horas.

Extracción y caracterización de pioverdinas: Se recolectó el sobrenadante de cada medio, el cual se filtró (filtro de 0,22 μ m) (Vindeirinho et al., 2021). Para el sobrenadante y el extracto, la producción de sideróforo se evaluó por cuantificación de sideróforos a una DO 630nm de acuerdo a la metodología establecida por Schwyn and Neilands (1987), y se corrió un barrido por espectrofotometría (UV-Vis) para obtener un pico máximo en un rango de 240-540 nm, específicamente a 286nm y 405nm (Rehm et al., 2022; Vindeirinho et al., 2021). Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido: metanol (proporción 3:1), etanol (proporción 1:4) (Yu et al., 2017). Luego, por rotaevaporación a 60°C, se obtuvo un extracto crudo.

Exposición a metales pesados Cd – Hg -Pb: Una concentración de cepa de 10^5 células/ ml, previamente preparada en fase exponencial, se utilizó para inocular el medio MMS como inductor de la producción de pioverdinas, con diferentes concentraciones de metales pesados (Cd, Hg y Pb) correspondientes de 750ppm, 500ppm, 250ppm y 125ppm. Adicionalmente, se utilizó BHI como medio control para el desarrollo de biomasa. En ambos medios, se incluyó el medio con cepa sin adición de metal, como tratamiento control para verificar viabilidad y producción de pioverdina. Por otro lado, como controles de inocuidad se tuvieron en cuenta los medios sin cepa y sin metales. Adicionalmente, un ensayo con diferentes concentraciones de metal y la presencia de pioverdina, se tuvo en cuenta para la cuantificación del sideróforo y la detección de la pioverdina.

Análisis estadístico: Se realizaron dos repeticiones temporales, y cada unidad experimental tuvo tres replicas. En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedasticidad fueron calculados, por lo cual los análisis se llevaron a cabo, teniendo en cuenta diferencia estadísticamente significativas, en un nivel de confianza del 99.5% para la producción de pioverdinas, y la respuesta a la presencia del metal. Se utilizó el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de sideróforos, extracción y detección de pioverdinas. Previo al ensayo de cultivo en Erlenmeyer, las cepas P07, P38 fueron sometidas a la prueba de tamizaje CAS para identificar si eran productoras de sideróforos dentro de un pool de aislamientos microbianos de, lo cual permitió identificar su potencial producción. Transcurridas 24 horas en el ensayo de cultivo a escala erlenmeyer, las muestras se centrifugaron, y el sobrenadante pasó por un filtro de 0,22µm. La muestra fue reservada en refrigeración hasta su uso. Se realizó la medida de las unidades sideróforos, por el método universal utilizando el reactivo CAS (ver figura 1). Se evidencia que la producción de sideróforos, la capacidad de la cepa P07, fue superior en al menos 10 US, con relación a P38. Posteriormente, la extracción líquido – líquido, permitió obtener un rendimiento en peso de aproximadamente 0.13 g/100ml. En la figura 1 se logra observar el porcentaje de (Unidades sideroforas) US y los puntos detectados en las longitudes de onda relacionadas a la emisión de fluorescencia (286nm) y producción de pigmento (405nm) para cada cepa en el sobrenadante y en el extracto, cabe resaltar que estas dos últimas muestras P07E y P38E se diluyeron en 2ml de agua ultra pura su medición. Por otro lado, el pigmento visible producido por ambas cepas fue, característico, en P07 fue amarillo-verdoso, mientras que en P38 fue verde. Estas características relacionadas al pigmento, a la expresión de fluorescencia, la cuantificación del %US y la detección de los picos en el barrido, son característicos para relacionar la presencia de pioverdinas en el medio, como lo explican Rehm *et al.*, 2022; Vindeirinho *et al.*, 2021, en sus investigaciones.

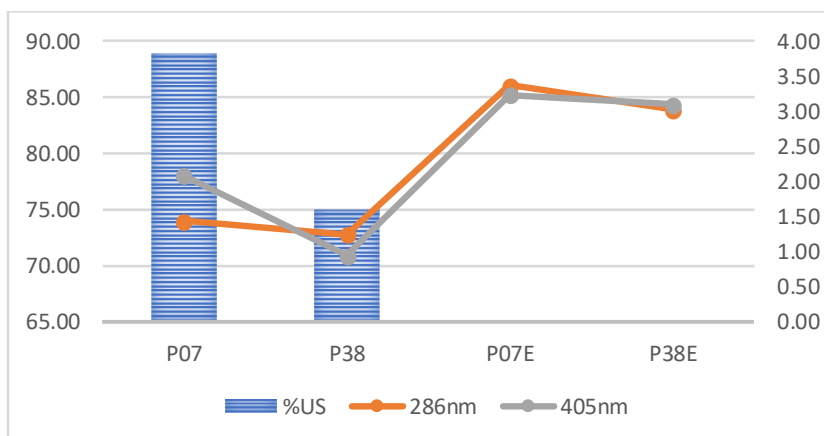


Fig. 1. Cuantificación y detección de sideróforos, utilizando reactivo CAS para calcular las Unidades Sideroforas (%US), y detección de fluorescencia y pigmento por espectrofotometría, identificando pico en 286nm y 405nm.

Detección de pioverdinas en medio con metales pesados Cd – Hg -Pb: En este ensayo, los microorganismos P07 y P38, en ninguna de las concentraciones de Cadmio presentaron densidad celular, mientras que para la concentración de mercurio de 125ppm, P38 mostró turbidez en el medio y se detectó fluorescencia. En las diferentes concentraciones de Plomo, ambos microorganismos presentaron crecimiento en el medio, esto permite identificar una tolerancia en los microorganismos de 750ppm de Plomo en el medio (ver figura 2-A). En el producto de la extracción de la pioverdina en el extracto, fue detectada por %US y por barrido, obteniendo picos similares a los de la muestra inicial. Al exponer la pioverdina con los diferentes metales, la presencia de la misma permaneció muy similar a la que se observó en el control, con respecto a los parámetros medidos, considerando que el metabolito se encuentra libre y que al menos por las técnicas utilizadas no se podría explicar si existe interacción entre el metal y la pioverdina.

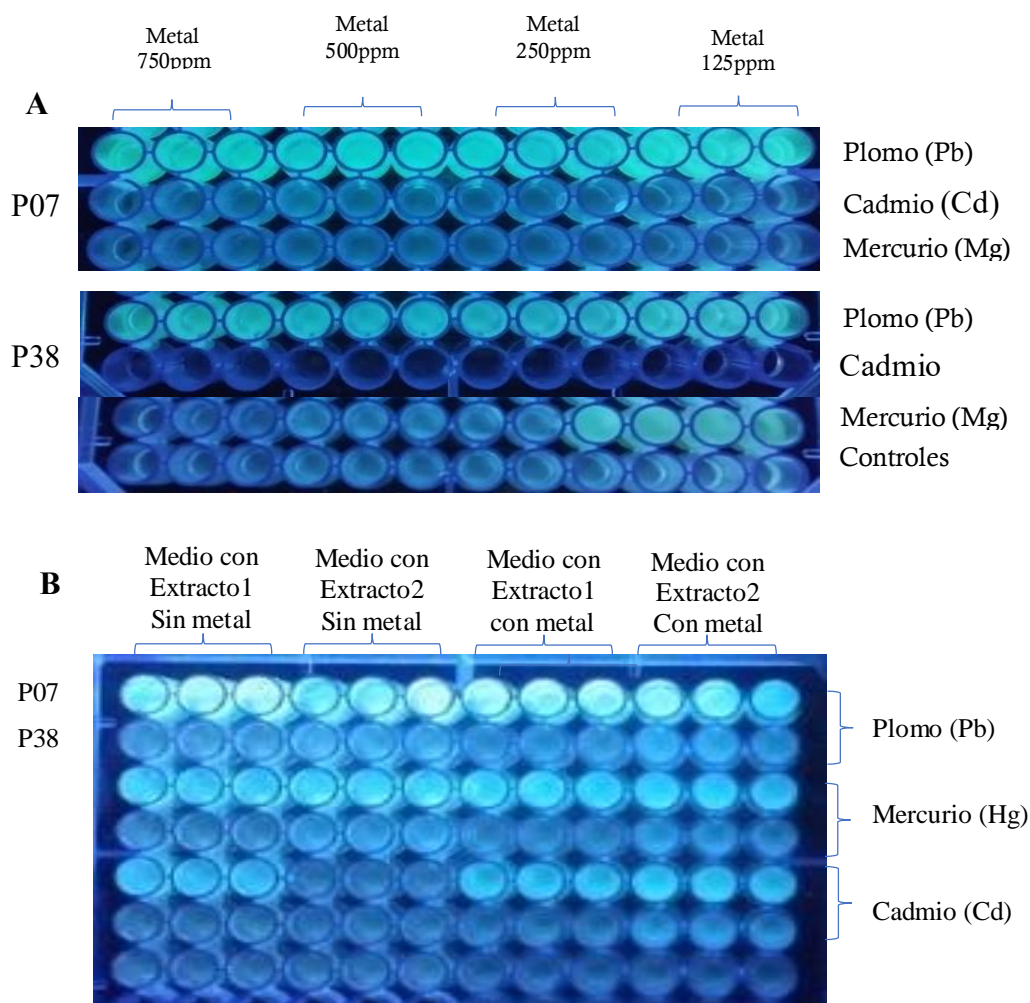


Fig. 2. Pioverdinas producidas por cepas de *Pseudomonas* A) expuestas a diferentes concentraciones de metales pesados: (Cd), Mercurio (Hg) y plomo (Pb). B) Extractos de pioverdinas expuestos a metales pesados: (Cd), Mercurio (Hg) y plomo (Pb), relación 1:1.

CONCLUSIONES

La detección de picos de absorbancia tanto en luz visible como UV, permite una aproximación a la detección de pigmentos fluorescentes característicos de *Pseudomonas* productoras de sideróforos, relacionados a la identificar la presencia de pioverdinas. La detección de pioverdina en el medio, permite considerar que la presencia del metal es inductora para la producción del metabolito en algunos casos, y en otros, su disminución podría estar asociada la interacción de la molécula con el metal en el medio. Estos resultados posibilitan el planteamiento de nuevas hipótesis conducentes al estudio de la interacción del metabolito- metal, utilizando otros métodos, por ejemplo, el uso de metodologías ómicas, que permitan confirmar y concluir que la sobreexpresión positiva de genes que intervengan en la biosíntesis del metabolito, los cuales podrían ser utilizados como biomarcadores de la presencia de metales pesados. Por otro lado, la detección del metabolito en el medio en presencia del metal, es un resultado similar al observado en el medio sin metal, sin embargo, no es evidencia suficiente para explicar la formación o no de complejos pioverdina-metal, siendo la forma de atrapar la molécula, por lo tanto se sugieren más estudios que permitan aclarar si en medio con metal diferentes a hierro, la pioverdina queda sola o si podría con los metales, y de esta manera, en futuros ensayos se podría proponer como agente quelante de metales diferentes al hierro, con el fin de disminuir la concentración en aguas o suelos contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Las personas que de manera directa o indirecta hicieron parte de la gestión de recursos, tiempo, mano de obra. Al grupo de Biotransformaciones de la UdeA, y al grupo Biociencias de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, quienes, además, financian el proyecto por convocatoria interna 2019-02.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhasawi, A., Costanzi, J., Auger, C., Appanna, N. D., & Appanna, V. D. (2015). Metabolic reconfigurations aimed at the detoxification of a multi-metal stress in *Pseudomonas fluorescens* : Implications for the bioremediation of metal pollutants. *Journal of Biotechnology*, 200, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.029>
- Chien, C., Lin, B., & Wu, C. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas*. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.014>
- Dell'Anno, F., Vitale, G. A., Buonocore, C., Vitale, L., Palma Esposito, F., Coppola, D., Della Sala, G., Tedesco, P., & de Pascale, D. (2022). Novel Insights on Pyoverdine: From Biosynthesis to Biotechnological Application. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms231911507>
- El-fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., & El-bialy, H. A. (2014). ScienceDirect Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.10.007>
- Oves, M., Saghir, M., & Qari, H. A. (2017). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* *Ensifer adhaerens* for heavy metal bioaccumulation , biosorption , and phosphate solubilization under metal stress condition. 80, 540–552. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.026>
- Patel, P. R., Shaikh, S. S., & Sayyed, R. Z. (2018). Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. *Environmental Sustainability*, 1(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0005-3>
- Patil, S., Nikam, M., Patil, H., Anokhina, T., & Kochetkov, V. (2017). Bioactive pigment production by *Pseudomonas* spp . MCC 3145 : Statistical media optimization , biochemical characterization , fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Process Biochemistry*, 58(January), 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.003>
- Rehm, K., Vollenweider, V., Kümmerli, R., & Bigler, L. (2022). A comprehensive method to elucidate pyoverdines produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. by UHPLC-HR-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(8), 2671–2685. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03907-w>
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. N. (2013). Bacterial Siderophore and their Application : A review. *Int . J. Curr . Microbiol . App Sci*, 2(12), 303–312. https://www.researchgate.net/profile/Syed_Sajeed_Ali/publication/303913491_Bacterial_Siderohore_and_their_Application_A_review/links/575d34ab08aec91374ae795c.pdf
- Sasirekha, B. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6 , a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.02.003>
- Vindeirinho, J. M., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2021). Modulation of Siderophore Production by *Pseudomonas fluorescens* Through the Manipulation of the Culture Medium Composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(3), 607–618. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03349-z>
- Yu, S., Teng, C., Liang, J., Song, T., Dong, L., Bai, X., Jin, Y., & Qu, J. (2017). Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbiology*, 55(11), 877–884. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses