

EFICIENCIA DE LOS SIDEROSPOROS FÚNGICOS COMO LIGANDOS DE METALES PESADOS

M.C. Romero¹, Enso H. Reinoso¹, M.I. Urrutia² y María Moreno Kiernan³

¹ Fac. de Cs. Veterinarias, ² Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, ³ Minist. Salud. Prov. B.A. -
Cátedra de Micología Médica e Industrial, calle 60 y 119, s/ n° -
Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, ARGENTINA
(reinostonavarrette@yahoo.com.ar ; cmriar@yahoo.com.ar)

INTRODUCCIÓN

En habitats o medios deficientes en hierro las especies fúngicas sintetizan siderosporos (SP) con diversos grupos funcionales, a saber: hidroxamato (HX), rizo-ferrina, ácido rodotorúlico, ferricrisina (Neilands, 1989). Los siderosporos son compuestos de bajo peso molecular, específicos para capturar Fe³⁺, pero se observó que podían adsorber otros elementos como cadmio, cromo, torio y/o uranio (Der Helm & Winkelmann, 1994; Baker & Dickman, 1995). Estos metales pesados (HM) son liberados al medioambiente por numerosas industrias, por lo que las propiedades de los SP o sus análogos podrían emplearse en estrategias de bioremediación con el fin de afectar la movilidad de los metales en los desechos, suelos y aguas. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar el potencial de los SP fúngicos con hidroxamato para secuestrar los metales pesados (HM) cromo y cadmio, optimizar una técnica sencilla de ponderación para las especies fúngicas como agentes detoxificantes y/o indicadores de polución.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento fúngico y cultivos para producción de siderosporos.

Se tomaron muestras compuestas de sedimentos de áreas industriales en La Plata, Argentina. Tres diluciones se sembraron, por triplicado, en medio de Vogel modificado con 75 ml de la solución de antibióticos (streptomicina 5,0 g, cloranfenicol 2,5 g, amoxicilina 5,0 g, agua destilada 1,0 l), y 200 µl CrO₄K₂ (2 mM), pH 5.0. Las placas se inocularon con las diluciones seleccionadas e incubaron a 28 °C, por 21 días. Desarrollaron 14 cepas fúngicas pero sólo aquellas que crecieron en 3 repiques más en este medio selectivo, se emplearon para los ensayos futuros. Las especies fúngicas se identificaron por macro, micromorfología y formas reproductivas bajo diversas condiciones (UV, con o sin luz, 20, 28 y 35 °C, pH 5-7).

La inducción de SP se logró mediante cultivos en tubos de 25 ml con 5 ml medio de Vogel sin sulfato de amonio ferroso y con 30 mg / l de fosfato di-hidrogenado de potasio, pH 5.0, e inoculadas con una suspensión de micelio estandarizada por espectrofotometría. Una vez sellados los tubos fueron incubados a 28 °C por 14 días, en estufa y oscuridad. Luego se centrifugaron, y el sobrenadante se filtró por filtros de 0,2 µm.

Ensayos de complejación

El test cromo-azurol (CAS, Schwyn & Neilands, 1987) fue implementado para evaluar la fijación del CrO_4^{2-} a los SP fúngicos, en este test se forma un complejo coloreado que compuesto por CAS, cation-hexadecilt trimetilamonio (HDTMA) y Fe^{3+} . Se inoculan las placas con 200 μl del sobrenadante de 3 cepas seleccionadas para este ensayo, introduciendo como factor de selección 200 μl CrO_4K_2 . Cuando el Fe^{3+} se fija a otro ligando, el color del complejo cambia de azul a naranja-rosado. Dos ensayos se realizaron simultáneamente, un juego de placas con CAS- Fe^{3+} . HDTMA-agar, y el otro con CAS- CrO_4^{2-} . HDTMA-agar. Con el fin de evaluar la relación entre los ligandos y el cambio de color, se agregó 0.1-1.0 mM desferrioxamina (DFO). La decoloración se analizó mediante el programa UTHSCSA, disponible en <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>; éste convierte las imágenes de las cajas de Petri a escala de grises y en 2 perfiles, horizontal y vertical, midiendo a través del halo. El gris más fuerte corresponde al naranja-rosado, el tono más claro al azul. El tono de gris de cada punto en función de la posición de las coordenadas, se obtiene con un programa Microsoft Excel (en igual página web).

RESULTADOS

Gliocladium viride, *Gliocladium penicillodes*, micelio estéril (ME-I), *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Geotrichum* spp. y un segundo micelio estéril (ME-II) desarrollaron en el medio selectivo. *G. viride*, *G. penicilloides* y ME-I se seleccionaron para los ensayos de adsorción de HM, por su crecimiento significativo y persistente. Se destaca que en las experiencias, se introdujo como factor de selección la presencia de cromo, para reducir el espectro de especies capaces de desarrollar pero sin capacidad posterior para la fijación de metales pesados (HM).

El cultivo de las especies aisladas en medios deficientes en Fe^{3+} nos permitió

diferenciar las especies productoras de SP-HM; siendo *G. viride*, *G. penicilloides* y ME-I las cepas de producción más significativas, con 5,0, 4,3 y 4,0 μg SP-HM / ml medio, respectivamente (Fig. 1). La intensidad del color equivale a los niveles de síntesis de SP-HX (μg SP-HM / ml medio)

Fusarium spp. y *Cladosporium* spp. produjeron valores intermedios de (2,5 y 2,0 μg SP-HM / ml); mientras en los ensayos de *Geotrichum* spp. y ME-II se obtuvieron valores casi nulos, es decir que ante la deficiencia de Fe^{3+} no sintetizan SP-HM, habiendo desarrollado otro mecanismo para la captura de Fe^{3+} .

Para confirmar la valoración de SP-HM y quelación *in-vitro* se aplicó el test cromo-azurol (CAS), que transforma los colores de los complejos mencionados en tonos de grises. Para cada punto del halo se define $G_{inc} = G_{x,y} - G_{blue}$, donde $G_{x,y}$: tono de gris en el punto (x,y) a lo largo de las coordenadas, G_{blue} : tono de gris en la región azul, y G_{inc} valor del tono para cada punto multiplicado por $2nr$, donde r fue la distancia desde el centro del halo al punto en cuestión. La decoloración o variación del color (D) se obtuvo mediante la relación $D = 2nr \times G_{inc}$, o sea los datos de cada punto naranja-rosado (x_1, y_1) al punto de coloración azul (x_2, y_2). El valor D del punto de reacción se fija para cada extremo de los ejes de coordenadas, dando un total de 4 D para situarlo espacialmente dentro del halo. La variación de color se mide en unidades arbitrarias, correspondiendo 90 000 D = 50 μM DFO.

En el ensayo de CAS en presencia de Cd (Fig. 2) se observó que *G. viride* fijó concentraciones fluctuantes de Cd, 40-50 μM DFO, para variaciones de Cd de 100 a 500 ppm. *G. penicilloides* varió de 35-25 y 17 μM DFO para 100-400 y 500 ppm Cd, respectivamente. El ME-I tuvo una significativa disminución en función de los niveles crecientes de Cd, con solo 2,5 μM DFO para la concentración superior.

En los ensayos CAS las 3 cepas fúngicas ensayadas incrementaron con el nivel de cromo, es decir de 100 a 500

Fig. 1: Produccion de siderosporos (ug SP-HM / ml medio) en función de la intensidad del color para *G. viride*, *G. penicilloides* y ME-I.

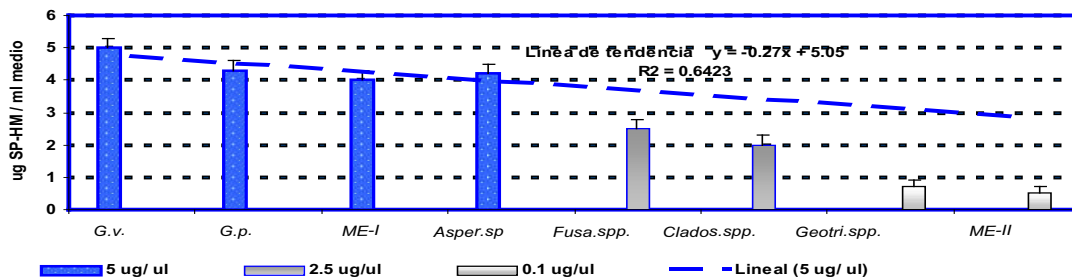


Fig. 2: Resultados del test de CAS (uM DFC) en presencia de 100 a 500 ppm Cd.

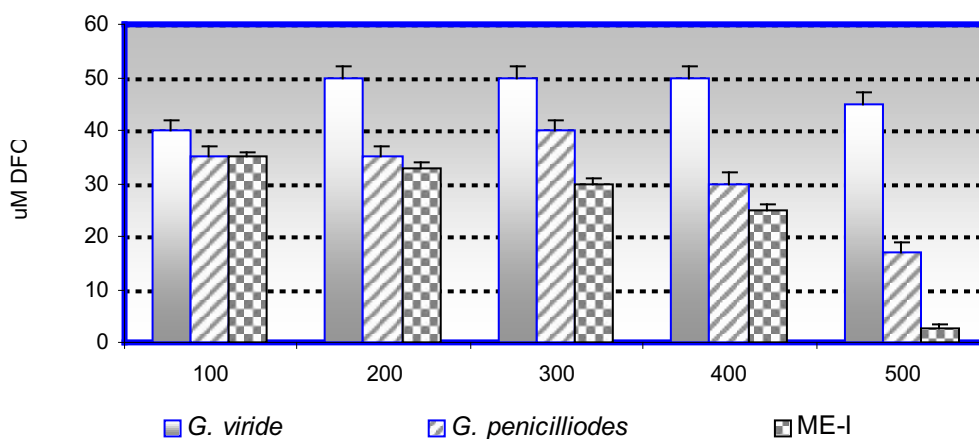
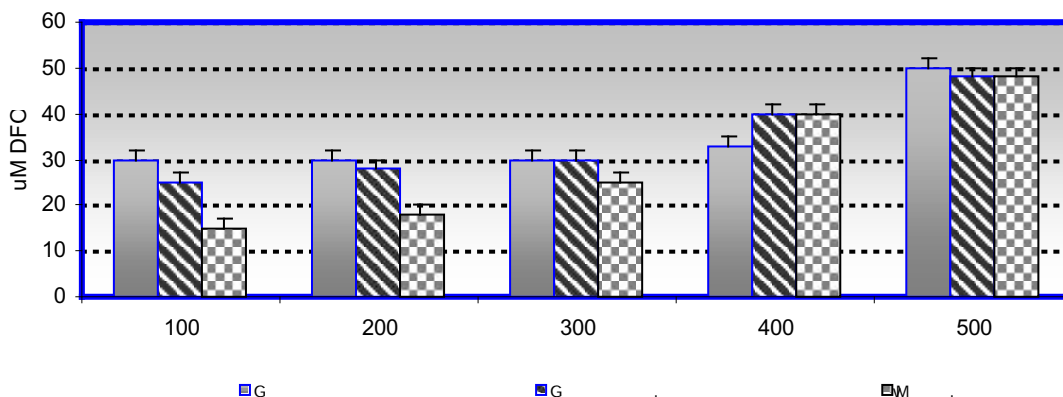


Fig. 3: Resultados del test de CAS (uM DFC) en presencia de 100 a 500 ppm Cr.



ppm Cr³⁺, con valores cercanos a los 50 µM DFO (Fig. 3). Las 2 especies de *Gliocladium* tuvieron una respuesta similar; el ME-I fijó menor concentración de cromo en presencia de 100 ppm Cr, y luego incrementó su quelación ante mayores niveles del HM, con un valor similar a las otras cepas frente a 500 ppm Cr.

En conclusion, aunque los siderosporos fúngicos han sido estudiados por diversos autores, en especial por Neilands (1952) en *Ustilago sphaerogena* y en *Saccharomyces cerevisiae* (Neilands, 1989), hasta el momento se desconoce como actúa el metal. Si el mecanismo es similar al encontrado en *Escherichia coli*, podría comportarse como co-represor o en forma divalente, es decir una proteína divalente fijadora de iones de metales pesados (Neilands, 1984).

Por otro lado el test Cas-azurool no ha sido aplicado ni estandarizada para valorar la fijación de otros metales pesados. Por lo que la hipótesis es novedosa, sugiriendo la aplicación y extensión de la técnica a otras especies fúngicas; particularmente a especies que puedan haber desarrollado resistencia a HM, como los de ambientes contaminados (Emery & Neilands, 1962). Esta metodología podría emplearse en análisis de suelos o fluidos poluídos, obteniéndose a través de ella la capacidad de las áreas naturales o modificadas por actividad antrópica de secuestrar metales pesados.

BIBLIOGRAFIA

1. Neilands J.B. 1952. A crystalline organo-iron pigment from a smut fungus, *Ustilago sphaerogena*. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 4846-4847
2. Neilands J.B. 1989. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: *Metal ions and bacteria*. Bedveridge T.J. & Doyle R.J. (eds). John Wiley & Sons, NY. pp: 141-163.
3. Neilands J.B. 1984. Methodology of siderophores. *Structures & Bonding*, 58: 1-24.
4. Emery, T.F. & Neilands J.B. 1962. Further observations concerning the periodic acid oxidation of hydroxylamine derivatives. *J. Org. Chem.* 27: 1075-1076.
5. Schwyn B. & Neilands J.B. 1987. Universal chemical assays for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.

6. Der Helm van D. & Winkelmann G. 1994. Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. In: *Metal ions in Fungi*. Neilands J.B. & Winge D.R. (eds). Mycology series. Marcel Dekker, Inc., NY . pp: 39-48.

7. Baker R. & Dickman M.B. Biological control with Fungi. In: *Soil microbial ecology, applications in agricultural and environmental management*. Metting F.B. (ed). Marcel Dekker, Inc., NY . pp: 275-305.