

# BIOMINERALIZACIÓN SIMULTÁNEA DE PLOMO Y CADMIO POR *Candida krusei*

Cosío Álvarez, Paola Estefanía (1), Romero Núñez, Araceli (2), Cuéllar Cruz, Mayra (3)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [pe.cosioalvarez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [a.romeronunez@ugto.mx]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [mcellar@ugto.mx]

## Resumen

Las aplicaciones de micro- y nano- cristales producidos por sistemas biológicos son de gran interés en diversas áreas tecnológicas y ambientales. La exposición de microorganismos a metales pesados resulta en la obtención de dichos cristales, y sus aplicaciones dependerán de la estructura cristalina de los mismos. Este trabajo se encuentra centrado en el estudio de la levadura *Candida krusei* al ser expuesta de manera simultánea a iones de los metales pesados  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en diferentes relaciones. La susceptibilidad de la cepa a dichas mezclas de metales tóxicos fue evaluada y se inició la caracterización y purificación de los cristales obtenidos.

## Abstract

Micro- and nano-crystals obtained by biological pathways have been of great interest for their applications in technological and environmental fields. Heavy metal exposition to microorganisms results in the formation of such crystals, whose applications depends on their crystal structure. This work is focused on the simultaneous exposition of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  to *Candida krusei* yeast. Different Pb/Cd ratios were test and yeast susceptibility was evaluated at each ratio. Purification process and first step of crystal characterization of the obtained crystals were performed.

### Palabras clave

Nanocristales; Biomineralización; *C. kusei*; Plomo; Cadmio

## INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas metálicas son de especial interés debido a su alto potencial de uso en diversas industrias como son la de materiales, electrónica y energética. Los esfuerzos de investigación recientes se han centrado en la biosíntesis de nanomateriales metálicos utilizando microorganismos en lugar de métodos tradicionales de síntesis química. La síntesis de nanomateriales, así como el control de sus características y propiedades se han explorado para diversas aplicaciones que incluyen biosensores y sensores químicos, bioimágenes, catálisis, óptica, electrónica, suministro de fármacos y almacenamiento de energía. Por ejemplo, varios nanomateriales han sido probados como portadores especialmente controlados en sistemas de administración de fármacos para su transporte al objetivo celular o para convertir energía solar directamente en vapor para saneamiento y purificación de agua. Aunque los nanomateriales tienen un gran potencial para aplicaciones adicionales, la producción de nanopartículas, nanocompuestos y materiales a nanoescala, y el control de sus características y propiedades siguen siendo grandes desafíos en el campo de la nanotecnología. El método convencional para la síntesis de nanomateriales metálicos inorgánicos a menudo requiere el uso de solventes orgánicos o demanda una cantidad de energía. Recientemente, ha habido mucho interés en la síntesis de nanopartículas de metales inorgánicos usando métodos respetuosos con el medio ambiente mediante el uso de microorganismos como bacterias y levaduras para la biosíntesis de nanomateriales [1]. La biosíntesis *in vivo* utilizando levaduras posee particular énfasis debido a su versatilidad, tiempo de crecimiento y temperaturas de trabajo [2].

Numerosas publicaciones han revelado que algunos géneros de levadura pueden acumular diferentes metales pesados, debido a que poseen la capacidad de acumular cantidades significativas de metales altamente tóxicos. La oxidación o reducción enzimática, la sorción en la pared celular y, en algunos casos, la consiguiente quelación con péptidos o polisacáridos extracelulares, el transporte controlado de membranas celulares de metales pesados hacia o su eflujo activo de la célula son los diferentes mecanismos desarrollados por estas especies que superan los efectos tóxicos de metales pesados. Es necesario tener un control riguroso de los iones metálicos intracelulares en las células de levadura para evitar efectos negativos o letales. La toxicidad para las células resulta debido al almacenamiento excesivo de iones de metales. Las variaciones considerables en el tamaño, la ubicación de las partículas, la monodispersión y las propiedades se deben a los diferentes mecanismos empleados por las cepas de levadura de diferentes géneros para la síntesis de nanopartículas. A las levaduras generalmente se les conoce como *cristales semiconductores* o *cristales cuánticos semiconductores*. Las levaduras son principalmente conocidas por su capacidad para sintetizar nanopartículas semiconductoras, en particular sulfuro de cadmio (CdS). Estudios recientes han demostrado la capacidad de las levaduras para formar otras nanopartículas como HgS, HgCl<sub>2</sub> y PbS [2].

Como se mencionó anteriormente, la gama de posibilidades para el desarrollo de cristales por métodos biológicos es amplia. Sin embargo, la respuesta de levaduras como las del género *Candida* a la exposición simultánea de distintos iones tóxicos ha sido estudiada muy someramente. El uso de este enfoque, es decir la exposición a más de un metal, podría resultar en la biosíntesis de varios materiales con diferentes estructuras cristalinas o bien en la obtención de un cristal mixto. Esto impactaría directamente al tipo de aplicación en que se requiera utilizar el material y podría ampliarse aún más su uso y especificidad. Por ello es importante llevar a cabo una investigación serial de mezclas de metales de interés

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de *C. krusei* al ser expuesta a mezclas de Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> utilizando diferentes relaciones entre ellos: Pb<sup>2+</sup>:Cd<sup>2+</sup> (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0). Se realizaron pruebas para evaluar la susceptibilidad de la cepa a cada relación de iones y se iniciaron las pruebas de purificación y caracterización de los materiales obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- *Cepas y crecimiento de colonias.*

Se utilizaron dos cepas de *Candida*, *C. dubliniensis* y *C. krusei*, las cuales se cultivaron en medio YPD (por sus siglas en inglés Yeast Peptone Dextrose) sólido en condiciones de 28°C, durante 24 h para después obtener un preinóculo en medio YPD líquido en condiciones de 28°C a 200rpm.

- *Curva de crecimiento.*

Se ajustó la densidad óptica (DO) de ambos preinóculos a una  $DO_{600nm}$  de 1.0 para iniciar la curva de crecimiento. Se utilizó un control para cada cepa en el que no se introdujo ningún metal. Se estudió por triplicado el crecimiento de ambas cepas ante la exposición a  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en relación 1:1. Cada 2 h se midió la densidad óptica durante 48 h. Cada lectura se realizó a 600 nm utilizando un espectrofotómetro *Genesys 20 Thermo Scientific*.

- *Pruebas de susceptibilidad  $Pb^{2+}$   $Cd^{2+}$*

En matraces estériles de 25 mL se expusieron células de *C. dubliniensis* o *C. krusei* ( $DO_{600nm}$  1.0) a distintas relaciones de metales  $Pb^{2+}:Cd^{2+}$  (0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0) a una concentración total de iones igual a 0.5 mM. Se dejaron 48 h en condiciones de 28°C y 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se trasladaron en tubos estériles para ser lavadas. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 6 min y se colectó el sobrenadante en condiciones de esterilidad, las cuales finalmente fueron lavadas y centrifugadas tres veces con agua desionizada a 3000 rpm durante 6 min.

- *Lisis enzimática*

Las células lavadas expuestas a concentración 0.1 y 1.0 fueron tratadas con 25 unidades/mL de Liticasa (Aldrich) y 25 unidades/mL de enzimas de lisis (Aldrich). Se dejaron incubar 2 h a 37°C y se procedió a lavar con agua destilada y centrifugar a 1000 rpm durante 5 min.

- *Microscopia electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET)*

Las células completas expuestas fueron liofilizadas para su observación en un microscopio electrónico de barrido utilizando un detector de electrones retro-dispersados. Las células sometidas a lisis enzimática fueron montadas en rejillas de cobre y observadas en microscopio electrónico de transmisión JEOL JSM 100S.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cepas y crecimiento de colonias

Se analizó el crecimiento de las cepas *C. krusei* y *C. dubliniensis* en condiciones de exposición a iones  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en relación 1:1 con una concentración total de iones de 1.0 mM y se comparó con un control. Como se observa en las curvas de crecimiento de las células de *Candida* expuestas a los iones metálicos (Imagen 1), ambas cepas son capaces de sobrevivir y reproducirse en el medio que contiene la combinación de metales plomo y cadmio. Se observa que la inhibición de crecimiento en *C. krusei* no es significativa a esta concentración ya que a pesar de ser sometida a iones metálicos el crecimiento de la cepa es muy similar tanto en células expuestas como no expuestas. Mientras en el caso de *C. dubliniensis*, aun cuando fueron capaces de duplicarse, su crecimiento se encuentra ligeramente por debajo de la cepa control. Por ello se decidió trabajar con *C. krusei* para realizar la siguiente fase de experimentación.

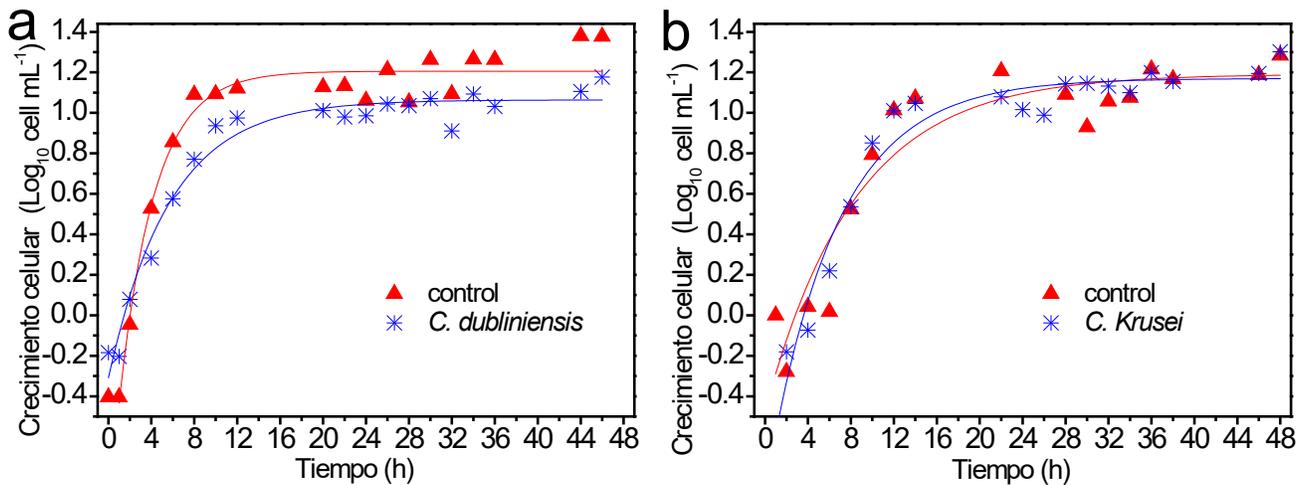


IMAGEN 1: Curvas de crecimiento de *C. dubliniensis* y *C. krusei*. Las células no expuestas a metales (control) se marcan en rojo.

### Pruebas de susceptibilidad

La exposición de *C. krusei* a distintas relaciones de iones  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  resultó en la obtención de cultivos de diferente color (Imagen 2). Este cambio en la coloración puede deberse a la obtención de cristales a base de los metales de exposición. La coloración más oscura corresponde al ensayo con Pb (relación Pb:Cd de 0.0-1.0) mientras que el cultivo más claro es el del ensayo con Cd (relación Pb:Cd de 1.0-0.0). El cambio progresivo de coloración corresponde al aumento sucesivo de la relación Pb/Cd, esto es un indicativo de la existencia de diferentes componentes en el medio.



IMAGEN 2: Pruebas de susceptibilidad de *C. krusei* en presencia de la mezcla de  $Pb^{2+}$ - $Cd^{2+}$  en las siguientes relaciones: a) 0.0-1.0, b) 0.1 - 0.9, c) 0.2 - 0.8, d) 0.4 - 0.6, e) 0.6 - 0.4, f) 0.8 - 0.2, g) + 0.9 - 0.1 y h) 1.0 - 0.0.

### Purificación y primer paso de caracterización de cristales

Después de que las células de *Candida* fueron expuestas a plomo-cadmio, el exceso de los iones metálicos fue retirado por medio de lavados exhaustivos con agua desionizada estéril. Posteriormente, las células lavadas fueron liofilizadas para facilitar su observación al MEB. Mientras para la observación por MET, las células lavadas fueron previamente lisadas con la finalidad de obtener una preparación delgada más adecuada para el haz de transmisión electrónica. Imágenes típicas de cada técnica se muestran a continuación (Imagen 3).

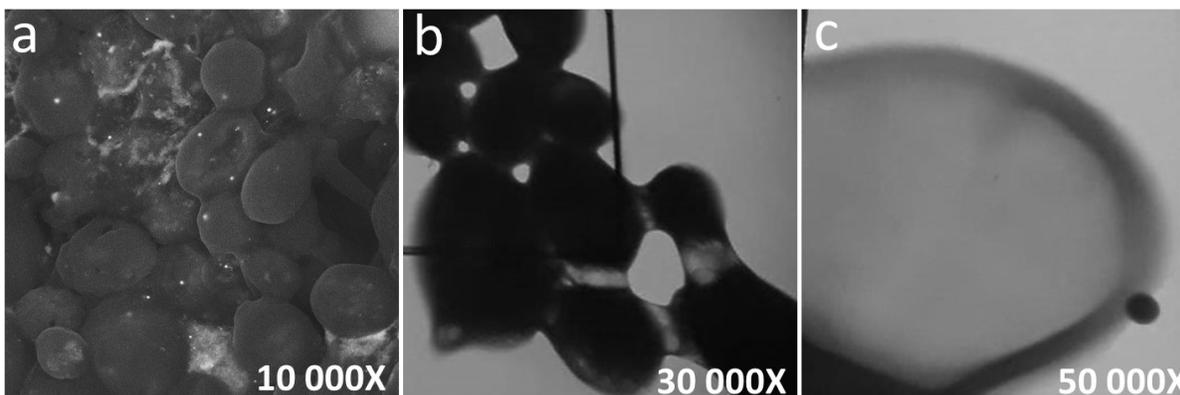


IMAGEN 3. Imágenes de células de *C. krusei* expuestas a Pb y Cd obtenidas por microscopía electrónica de barrido (a, b) y de transmisión (c).

Como se observa en la Imagen 3a, se trata de una imagen de MEB con detector de electrones retro-dispersados. Con esta técnica y detector, el tono obtenido es un indicador del tipo de composición de la superficie de la muestra. Se logra observar la morfología esférica ligeramente alargada de las levaduras así como puntos brillantes muy pequeños que corresponden a los materiales biomineralizados. Con la técnica de MET (Imagen 3b y 3c), también se puede observar la forma de las levaduras y algunos puntos más densos que en este caso corresponden a los materiales brillantes observados por MEB. Estas dos técnicas sugieren la formación de compuestos a base de Pb y Cd, sin embargo se requieren estudios estructurales más profundos para determinar el tipo de estructura cristalina de los mismos.

## CONCLUSIONES

*C. dubliniensis* es ligeramente más susceptible que *C. krusei* a la exposición simultánea de los metales pesados  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ . La exposición simultánea de *C. krusei* a diferentes relaciones de  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  resulta en la obtención de cultivos de diferentes propiedades visuales indicando la posibilidad de obtener distintos materiales de interés por vía biosintética. La estructura de los materiales obtenidos está en vías de ser determinada por técnicas cristalográficas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al departamento de Biología de la Universidad de Guanajuato por las instalaciones y las herramientas para realización de este proyecto. P.C.A. agradece a la Dra. Mayra Cuéllar Cruz por la confianza brindada y a la Dra. Araceli Romero por la guía durante el proyecto. Al Dr. Armando Obregón por su asesoría en el uso de microscopio electrónico de transmisión y al Dr. Abel Moreno por su apoyo en el uso del microscopio electrónico de barrido.

## REFERENCIAS

- [1] Park, T. J., Lee, K. G., y Lee, S. Y. (2016) Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 2, pp. 521–534.
- [2] Hulkoti, N. I., y Taranath, T. C. (2014) Biointerfaces Biosynthesis of nanoparticles using microbes — A review, *Colloids and Surfaces B*, vol. 121, pp. 474–483.
- [3] Cuéllar-Cruz M., y col., (2017) Biosynthesis of micro- and nanocrystals of Pb (II), Hg (II) and Cd (II) sulfides in four *Candida* species: a comparative study of in vivo and in vitro approaches, *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 2, pp. 405–424.