



INFORME BREVE

Biomíneralización de cobre en *Candida fukuyamaensis* RCL-3



Verónica Irazusta^{a,b,*}, Lucas Michel^a y Lucía I.C. de Figueroa^{a,c}

^a PROIMI-CONICET, Tucumán, Argentina

^b INIQUI-CONICET-UNSa, Salta, Argentina

^c Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina

Recibido el 21 de diciembre de 2015; aceptado el 22 de marzo de 2016

Disponible en Internet el 26 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

Biomíneralización;
Remediación de
Cu(II);
Levaduras;
CuS

KEYWORDS

Biomíneralization;
Cu(II) remediation;
Yeast;
CuS

Resumen La levadura *Candida fukuyamaensis* RCL-3 presenta la capacidad de disminuir la concentración de cobre presente en un medio de cultivo. Observamos que la presencia de altas concentraciones de cobre cambia el color de las células de blanco/crema a marrón. La coloración desaparece cuando las células son tratadas KCN o cuando crecen en un medio sin adición de iones sulfato. Estos resultados se corresponden con la probable formación de biomínerales de CuS sobre la superficie de las células. En este informe ponemos en evidencia que la mineralización sería un mecanismo utilizado por la levadura estudiada para biorremediar el cobre.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

Biomíneralization of copper in *Candida fukuyamaensis* RCL-3

Abstract *Candida fukuyamaensis* RCL-3 yeast has the ability to decrease copper concentration in a culture medium. High copper concentrations change the cell color from white/cream to brown. The effect of color change ceases with the addition of KCN or when cells are grown in a culture medium without sulfate ions. These results could be associated with CuS bioaccumulation in the cell surface. This report revealed that mineralization would be a mechanism used by this yeast for copper bioremediation.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: irazustaveronica@gmail.com (V. Irazusta).

En un trabajo previo se aisló la levadura *Candida fukuyamaensis* RCL-3 de un canal de drenaje de una planta de filtro de cobre en la localidad de Ranchillos, Tucumán. Esta cepa fue seleccionada por poseer resistencia y/o

tolerancia a altas concentraciones de Ni(II), Cr(VI), Cd(II) y Cu(II)¹¹. La alta resistencia al Cu(II) de esta levadura autóctona fue luego demostrada en ensayos semicuantitativos y cualitativos; asimismo, fueron realizadas caracterizaciones de dicha levadura mediante estudios morfológicos y de actividades enzimáticas¹². Un estudio de publicación reciente reveló mediante herramientas proteómicas parte de las rutas metabólicas utilizadas por *C. fukuyamaensis* RCL-3 cuando es cultivada en presencia de cobre⁵.

Basándonos en el gran interés biotecnológico que presenta esta levadura para la biorremediación de Cu(II), nos planteamos como objetivo de este trabajo determinar si la biomíneralización del cobre sobre la superficie de la células es uno de los mecanismos que utiliza *C. fukuyamaensis* RCL-3 para disminuir la concentración del metal en el medio de cultivo.

Como punto de partida se realizaron curvas de crecimiento y de remoción de cobre con la cepa de interés, *C. fukuyamaensis* RCL-3, y con una cepa control: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 3205. Los resultados demuestran la capacidad que presenta la levadura autóctona de interaccionar con el metal disminuyendo un 70% del cobre inicialmente añadido (fig. 1). Sin embargo, en el caso de la cepa de levadura de colección no se observó remoción de dicho metal, el cual fue medido y tuvo una concentración de $0,52 \pm 0,12$ mM luego de 48 h de cultivo (fig. 1). Por otro lado, se pudo observar un crecimiento diferente entre ambas cepas cuando fueron cultivadas con adición de Cu(II): *S. cerevisiae* ATCC 3205 alcanzó una absorbancia (Abs_{600nm}) de $11,0 \pm 1$, mientras que *C. fukuyamaensis* RCL-3 alcanzó una Abs_{600nm} de $18,4 \pm 2$ (fig. 1). Estos resultados y los publicados anteriormente¹¹ ponen de manifiesto que la capacidad de remediar el cobre por parte de la cepa *C. fukuyamaensis* RCL-3 no afecta su crecimiento, por lo

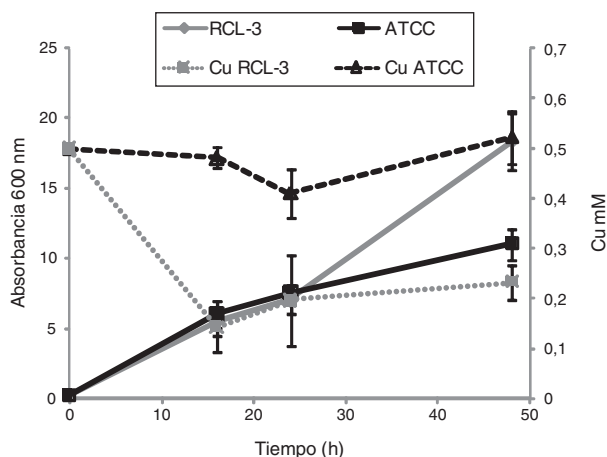


Figura 1 Efecto de 0,5mM de Cu en el crecimiento de *Candida fukuyamaensis* RCL-3 y de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32051 y concentración de cobre extracelular en el medio de cultivo a diferentes tiempos de incubación. Absorbancia a 600 nm de cultivos de *C. fukuyamaensis* RCL-3 (diamantes grises) y de *S. cerevisiae* ATCC 32051 (cuadrados negros) a 16, 24 y 48 h. Concentración de cobre en el medio de cultivo luego de 12, 24 y 48 h de incubación con *C. fukuyamaensis* RCL-3 (cuadrados grises) y con *S. cerevisiae* ATCC 32051 (triángulos negros). El experimento fue realizado por triplicado y las barras de error representan el desvío estándar.

que puede tener un gran futuro para su aplicación a gran escala.

A pesar de que diversos autores han estudiado los microorganismos y en particular las levaduras en procesos de biorremediación de metales pesados, existe

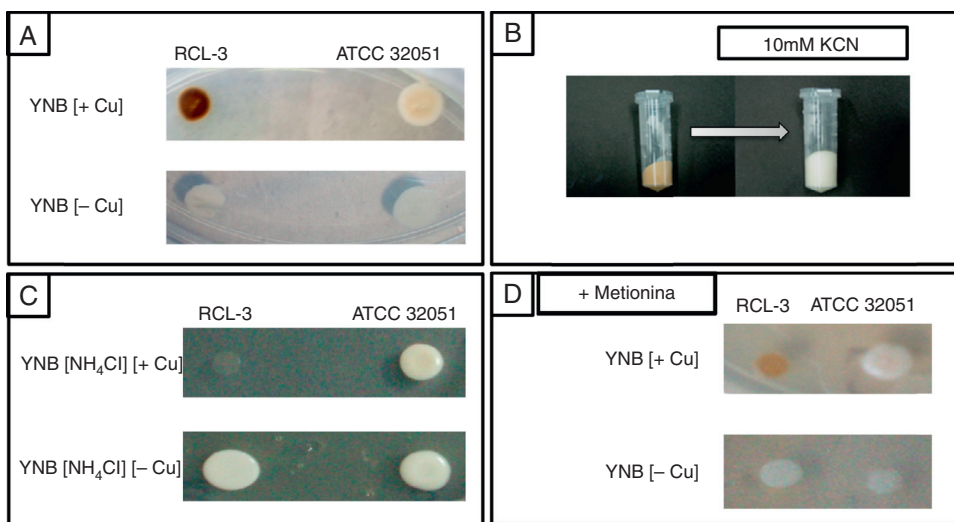


Figura 2 Crecimiento de las levaduras *Candida fukuyamaensis* RCL-3 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 32051 en presencia y ausencia de cobre en medios de cultivos sólidos y efecto del KCN sobre *C. fukuyamaensis* RCL-3. A) Crecimiento en medio YNB-glucosa con (+Cu) y sin (-Cu) cobre de *C. fukuyamaensis* RCL-3 y *S. cerevisiae* ATCC 32051 luego de 48 h a 30 °C. B) Pellet celular de *C. fukuyamaensis* RCL-3 luego de 16 h de cultivo en medio YNB-glucosa suplementado con 0,5 mM $CuSO_4$, antes y después del tratamiento con 10 mM KCN. C) Crecimiento de las levaduras *C. fukuyamaensis* RCL-3 y *S. cerevisiae* ATCC 32051 en medio de cultivo YNB-glucosa sin $(NH_4)_2SO_4$ y con NH_4Cl como fuente de nitrógeno y con (+Cu) o sin (-Cu) la adición de $CuSO_4$ luego de 48 h a 30 °C. D) Crecimiento de las levaduras *C. fukuyamaensis* RCL-3 y *S. cerevisiae* ATCC 32051 en medio de cultivo YNB-glucosa, suplementando con 1,2 mM de metionina y con (+Cu) o sin (-Cu) la adición de $CuSO_4$ luego de 48 h a 30 °C.

poca información sobre cuáles son los mecanismos que estos utilizan. Nuestra hipótesis es que la precipitación-biomineralización de cobre en sulfuro de cobre (CuS) es uno de los mecanismos utilizados por la levadura *C. fukuyamaensis* RCL-3 para biorremediar el Cu(II). En trabajos previos, al determinar la distribución intracelular del cobre en *C. fukuyamaensis* RCL-3 mediante microscopía de transmisión electrónica, se evidenció la presencia de cuerpos negros tanto en el citoplasma como en la pared celular, correspondientes a depósitos de cobre¹².

Por otro lado, al cultivar *C. fukuyamaensis* RCL-3 en medio YNB-glucosa (glucosa 20 g/l, Tris pH 5, 50 mM, YNB sin aminoácidos 6,7 g/l) en presencia de 0,5 mM de CuSO₄, observamos que las células se tornaban de color más oscuro respecto de la coloración observada en las mismas levaduras crecidas sin cobre en el medio de cultivo. Este cambio en la coloración se vio exacerbado a las 16 h de cultivo. El cambio en la coloración de las colonias de *C. fukuyamaensis* RCL-3 de blancas/cremas a un intenso marrón pudo ser visualizado en medio sólido YNB-glucosa con 0,5 mM de CuSO₄, incubado a 30 °C durante 72 h (fig. 2A).

Durante los últimos años, el estudio de la biorremediación de metales tóxicos como el cobre ha recibido gran atención, no solo por su importancia científica, sino también por sus potenciales aplicaciones industriales^{9,13}. Con respecto a la bioadsorción, también denominada biomineralización, se ha demostrado que algunos microorganismos son capaces de precipitar diversos metales, entre ellos el Cu(II). Uno de los minerales capaces de ser producidos por los microorganismos es el sulfuro de cobre, el cual se deposita sobre la superficie de las células¹⁴. Este proceso de mineralización requiere de fuente de iones sulfuro y de iones cobre para la formación de los cristales de CuS⁶.

Otros investigadores observaron que la precipitación del Cu en forma de CuS resulta en una coloración marrón cuando la concentración del mineral estaba entre 0,5 y 5 mM⁷. Con el fin de demostrar que la pigmentación marrón observada en *C. fukuyamaensis* RCL-3 en presencia de cobre proviene de la mineralización y formación de CuS en la pared de las células, se realizaron ensayos de disociación del complejo CuS.

Los cristales de CuS son estables en medio ácido, pero se disocian en presencia de KCN como resultado de la formación de complejos de cianuro de cobre, lo que provoca la pérdida instantánea del color marrón en el pellet celular¹⁴. Con el objetivo de demostrar la presencia de CuS sobre la superficie celular de *C. fukuyamaensis* RCL-3, células de 16 h de cultivo con adición de 0,5 mM de CuSO₄ fueron centrifugadas para la eliminación del medio de cultivo y resuspendidas en HCl 1 N o KCN 10 mM. Como puede observarse en la figura 2B, la adición de KCN en las células de *C. fukuyamaensis* RCL-3 previamente tratadas con cobre provoca la pérdida de coloración de forma instantánea, demostrando la formación de complejos de cianuro de cobre. Con el objetivo de comprobar que la pérdida de coloración de las células no se debía a su acidificación, se realizaron tratamientos de *C. fukuyamaensis* RCL-3 con HCl como medio ácido. Se observó que la coloración marrón del pellet celular no sufrió ninguna modificación en presencia de HCl, manteniéndose el color marrón que las células habían adquirido previamente.

Otra manera de demostrar la mineralización del cobre sobre la superficie celular es a través del estudio de la fuente de los iones sulfuro que participan en la precipitación de los iones cobre durante la formación del sulfuro de cobre.

El medio de cultivo YNB-glucosa utilizado en los ensayos aquí descritos posee (NH₄)₂SO₄ como única fuente de nitrógeno y de sulfato. Se realizaron ensayos en medio de cultivo YNB-glucosa reemplazando el (NH₄)₂SO₄, por NH₄Cl como fuente de nitrógeno, y de esta forma se eliminó toda fuente de iones sulfato. Como se observa en los cultivos sólidos de la figura 2C, la eliminación del sulfato del medio imposibilitó la formación del biomineral y, por lo tanto, no se observó coloración marrón en presencia de cobre.

La falta de coloración en las células en el medio de cultivo YNB-glucosa sin (NH₄)₂SO₄ fue observada también en medio líquido. Fue interesante descubrir que, además de perder su coloración, las colonias de *C. fukuyamaensis* RCL-3 también veían afectado su crecimiento negativamente (fig. 2C). Esto podría indicar la dificultad de estas levaduras para desarrollarse en presencia de cobre sin una fuente externa de iones sulfato. Este hecho nos lleva a hipotetizar que cuando *C. fukuyamaensis* RCL-3 está en presencia de cobre y sin iones sulfato, no presenta la capacidad de depositar cobre en forma de CuS. Esta incapacidad para la formación de minerales de cobre generaría, además, una sensibilidad al metal. Cabe destacar que la disminución en el crecimiento de las células de *C. fukuyamaensis* RCL-3 fue verificada también por densidad óptica a 600 nm, ya que se observó aproximadamente un 70% menos de crecimiento (datos no mostrados).

Tanto la coloración como el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* ATCC 32051 no se vieron afectadas en presencia de (NH₄)₂SO₄ o NH₄Cl como fuentes de nitrógeno, ni por la adición o no del metal (fig. 2C). Por lo tanto, *S. cerevisiae* ATCC 32051 permaneció con un tono blanco/crema bajo todos los tratamientos efectuados (fig. 2). Este hecho se corresponde con la falta de capacidad que presenta esta cepa de interactuar con el metal, como se demuestra en la figura 1.

Yu et al.¹⁴ reportaron resultados similares con respecto a la coloración de las células en una levadura modificada genéticamente que presentaba la capacidad de formar CuS sobre la superficie celular en presencia de cobre. Dicha levadura también demostró la atenuación del color marrón a partir del reemplazo del (NH₄)₂SO₄ por NH₄Cl como fuente de nitrógeno para la eliminación de los iones sulfato. De modo similar, los ensayos con KCN eliminaron la coloración marrón de las células que presentaban depósitos de CuS. Otras investigaciones demostraron que bacterias con capacidad de reducir el sulfato en presencia de cobre también fueron capaces de remover del medio el cobre mediante su precipitación y bioacumulación en forma de minerales del azufre^{4,8}. A partir de estudios de microscopía electrónica se pudo determinar que los biominerales formados por la bacteria *Citrobacter* spp. eran del tipo CuS y generaban un oscurecimiento de las bacterias⁸.

Por último, se cultivó *C. fukuyamaensis* RCL-3 y *S. cerevisiae* ATCC 32051 en medio YNB-glucosa suplementado con 1,2 mM de metionina. Un exceso de metionina en

presencia del metal produjo una disminución de la intensidad del color marrón de las colonias de *C. fukuyamaensis* RCL-3 (fig. 2D). Esto se debe a que un exceso de metionina es capaz de elevar los niveles de S-adenosilmetionina, un corepresor de los genes involucrados en la reducción de sulfato³. Esto dificulta la disponibilidad de iones sulfuro, a partir de los cuales se producen los cristales de CuS. Por lo tanto, la adición de metionina en el medio de cultivo disminuye la formación de CuS.

Todos los resultados expuestos con respecto a la capacidad que tiene la levadura *C. fukuyamaensis* RCL-3 de interactuar con el cobre pueden explicarse a partir de la existencia de un mecanismo de precipitación del cobre sobre la pared celular de esta levadura. Otros autores relacionaron la capacidad de detoxificación del cobre con la precipitación de CuS en la superficie de las levaduras². La precipitación del cobre sobre la superficie de los microorganismos en forma de CuS parece estar relacionada con la capacidad de resistir altas concentraciones de dicho metal. Aunque la mayoría de los estudios en este sentido fueron realizados en cepas de *S. cerevisiae* modificadas genéticamente, con deleciones o adiciones que les confieren resistencia al cobre^{2,14}, la levadura *Rhodotorula* aislada de una mina y con gran tolerancia al cobre también demostró ser capaz de producir CuS sobre la superficie de sus células¹. Por lo expuesto, la capacidad de las levaduras para precipitar el cobre en forma de CuS parece estar relacionada con su capacidad de resistir altas concentraciones del metal.

Estudios de microscopía electrónica efectuados en la cepa bajo estudio demuestran la presencia de acúmulos de cobre que se localizan cercanos a la pared celular, más específicamente en el límite entre esta última y la membrana¹². Dichas observaciones son coherentes con la formación de biomínerales en la superficie de las células. Sin embargo, para corroborar la localización del CuS en las levaduras estudiadas sería necesario un estudio más profundo que determinara la composición molecular de los depósitos formados.

Es interesante comentar que estudios recientes reportaron que los genes que participan en la biomíneralización del cobre sobre la superficie de las células también se encuentran involucrados en la homeostasis del cobre, al estabilizar diferentes ARN mensajeros¹⁰. Resulta llamativo que muchas de las proteínas observadas como sobreexpresadas en presencia de cobre en *C. fukuyamaensis* RCL-3, en el estudio proteómico fueron proteínas ribosomales⁵. Nuestros hallazgos alientan a la realización de nuevos estudios, que podrían relacionar la síntesis de proteínas ribosomales con la biomíneralización del cobre en *C. fukuyamaensis* RCL-3.

A partir del presente trabajo podemos continuar profundizando en la composición del biomíneral formado, así como también en el estudio de las rutas metabólicas, moléculas, y enzimas involucradas en la precipitación-biomíneralización del cobre en forma de CuS, con el fin de demostrar que este es uno de los principales mecanismos utilizados por la levadura autóctona *C. fukuyamaensis* RCL-3 para la remoción del cobre. Por otro lado, este es el primer trabajo que describe ensayos simples, capaces de indicar la precipitación de cobre en presencia de iones sulfato y que podrían ser reproducidos por otros investigadores utilizando diversos microorganismos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica Tecnológica, FONCYT (PICT 2013-0932), y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

Bibliografía

1. Erlich HL, Fox SI. Copper sulfide precipitation by yeasts from acid mine-waters. *Appl Microbiol.* 1967;15:135-9.
2. Foury F, Cazzalini O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997;411:373-7.
3. Giudici P, Kunkee RE. The effect of nitrogen deficiency and sulfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *Am J Enol Vitic.* 1994;45:107-12.
4. Hsu HF, Kumar M, Ma YS, Lin JG. Extent of precipitation and sorption during copper removal from synthetic wastewater in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Environ Eng Sci.* 2009;26:1087-96.
5. Irazusta V, Michel L, de Figueroa CLI. Disentangling metabolic pathways involved in copper resistance in *Candida fukuyamaensis* RCL-3 indigenous yeast. *J Basic Microbiol.* 2015.
6. Jameson E, Rowe OF, Hallberg K, Johnson DB. Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. *Hydrometallurgy.* 2010;104:488-93.
7. Lewis AE. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy.* 2010;104:222-34.
8. Qiu R, Zhao B, Liu J, Huang X, Li Q, Brewer E, Wang S, Shi N. Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area. *J Hazard Mater.* 2009;164:1310-5.
9. Salvadori MR, Ando RA, Oller do Nascimento CA, Corrêa B. Intracellular biosynthesis and removal of copper nanoparticles by dead biomass of yeast isolated from the wastewater of a mine in the Brazilian Amazonia. *PLoS ONE.* 2014;9:e87968.
10. Schenk L, Meinel DM, Strässer K, Gerber AP. La-motif-dependent mRNA association with Slf1 promotes copper detoxification in yeast. *RNA.* 2012;18:449-61.

11. Villegas LB, Amoroso MJ, Figueroa LIC. Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina. *J. Basic Microbiol.* 2005;45:381–91.
12. Villegas LB, Amoroso MJ, de Figueroa CLI. Responses of *Candida fukuyamaensis* RCL-3 and *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 to copper stress. *J. Basic Microbiol.* 2009;49:395–403.
13. Volesky B. Detoxification of metal bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy.* 2001;59:203–16.
14. Yu W, Farrell RA, Stillman DJ, Winge DR. Identification of SLF1 as a new copper homeostasis gene involved in copper sulfide mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996;16:2464–72.