

# Charakterystyka enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów bioremediacji chromianu u wybranych drobnoustrojów pro- i eukariotycznych oraz makrofitów

Streszczenie pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Dubickiej-Lisowskiej

Institut Biologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Chrom (Cr) to metal ciężki o dużym znaczeniu przemysłowym. Wykorzystywany jest między innymi w procesach galwanizacji, do produkcji stopów, przy spawaniu metali, do garbowania skór i produkcji barwników. Z powodu szerokiego zastosowania w przemyśle, metal ten łatwo może przedostawać się do środowiska naturalnego. Chrom występuje na różnych stopniach utlenienia, od  $-IV$  do  $+VI$ , lecz stabilne w środowisku są jedynie: forma metaliczna ( $Cr^0$ ) oraz formy jonowe  $Cr(III)$  i  $Cr(VI)$ , które różnią się znacznie swymi właściwościami fizykochemicznymi oraz aktywnością chemiczną i biochemiczną. Do głównych mechanizmów toksyczności komórkowej chromu zalicza się tworzenie adduktów  $Cr(III)$ -DNA, procesy oksydacji i agregacji białek oraz łatwość redukcji  $Cr(VI)$  do form pośrednich  $Cr(V)$  i  $Cr(IV)$ , wywołujących reakcje Fentona i generujących wolne rodniki, które z kolei są przyczyną uszkodzeń oksydacyjnych komórek.  $Cr(VI)$  cechuje wysoka rozpuszczalność, mobilność oraz silna toksyczność. Jako anion chromianowy, łatwo wnika do komórek wykorzystując systemy transportu ważnych metabolicznie jonów, m.in. siarczanowych oraz fosforanowych. Z kolei  $Cr(III)$  charakteryzuje się relatywnie niską toksycznością ze względu na niewielką biodostępność, chociaż po wnikięciu do komórek powoduje uszkodzenia DNA. Forma ta w środowisku jest mniej mobilna, gdyż ulega szybkim i spontanicznym procesom hydroksylacji, adsorpcji i kompleksowania. Warto podkreślić fakt, iż  $Cr(III)$  w postaci kompleksów bioorganicznych jest mikroskładnikiem wspomagającym metabolizm glukozy i lipidów oraz stymulującym funkcjonowanie insuliny.

Ze względu na wysoką toksyczność, chrom może wywoływać również szereg niekorzystnych efektów ekologicznych. Jako metal ciężki, w odróżnieniu do substancji pochodzenia organicznego, nie ulega degradacji i jest akumulowany w wodzie, glebie, osadach dennych i ściekowych oraz organizmach żywych. Istnieją gatunki roślin i mikroorganizmów zdolne do bytowania w środowiskach skażonych związkami chromu. Organizmy te wykształciły różne mechanizmy oporności, takie jak: biosorpcja, bioakumulacja połączona z biosekwestracją, zmniejszona akumulacja na skutek uszczelnienia błon komórkowych bądź aktywacji układów wyrzutu poza komórkę, a w szczególności bioredukcja  $Cr(VI)$  do  $Cr(III)$ , zachodząca na drodze enzymatycznej i nieenzymatycznej. Niektóre z tych strategii mogą być związane z syntezą specyficznych białek oraz stymulacją szeregu innych aktywnych procesów ochronnych, wpływających na końcowy efekt w postaci zwiększonej tolerancji na obecność  $Cr(VI)$ .

Przedmiotem niniejszej pracy była charakterystyka wybranych enzymatycznych i nieenzymatycznych układów przemian chromianu, ze szczególnym uwzględnieniem

systemów redukcyjnych. Skupiono się także na wyjaśnieniu reakcji na stres wywołany obecnością chromu(VI), obserwowanej na poziomie zmian w proteomie oraz wskazano organizmy przejawiające strategie bioremediacyjne najkorzystniejsze z punktu widzenia aplikacji biotechnologicznych ukierunkowanych na unieszkodliwianie toksycznych skażeń środowiskowych chromianem.

Do doświadczeń prowadzonych w ramach niniejszej pracy wybrano trzy modele badawcze, wykorzystujące organizmy bakteryjne, drożdżowe oraz roślinne. W ramach modelu I, obejmującego analizy przeprowadzane na bakteriach, określono tolerancję na Cr(VI) wybranych szczepów z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus* poprzez oznaczenie ich przeżywalności i zdolności do wzrostu hodowli w obecności różnych stężeń chromianu. U szczepów wykazujących aktywności redukcji Cr(VI)→Cr(III) dokonano charakterystyki procesu poprzez określenie lokalizacji czynnika redukującego (zewnątrz- i/lub wewnątrzkomórkowej), jak również wykazanie, czy ten kluczowy mechanizm detoksykacji zachodzi na drodze enzymatycznej czy nieenzymatycznej. Następnie określono zdolność do akumulacji Cr przez biomasę bakteryjną oraz wykonano rozdziały elektroforetyczne białek w celu uwidocznienia zmian w proteomach badanych bakterii pod wpływem Cr(VI). Ponadto, w żelach elektroforetycznych wykonano barwienie zymograficzne poszukując aktywności reduktazy chinonowej, jako ważnego enzymu, mogącego pełnić funkcję reduktazy chromianowej – enzymu odgrywającego rolę w detoksykacji Cr(VI). Ważnym osiągnięciem jest wykazanie mechanizmu enzymatycznej redukcji wewnątrzkomórkowej u dwóch z siedmiu badanych szczepów (*Pseudomonas alcaligenes* 31, *Bacillus cereus* ZB001) oraz szczególnie wydajnej akumulacji Cr(VI) u jednego ze szczepów (*Burkholderia cepacia* 33). Stwierdzono zmiany ilościowe i jakościowe w syntezie poszczególnych białek, a w analizach zymograficznych również enzymów o aktywności reduktazy chinonowej.

W modelu badawczym II określano przede wszystkim zdolność drożdży wytwarzających ryboflawinę (RF), z gatunku *Pichia guilliermondii*, do biologicznej redukcji Cr(VI). Do badań wykorzystano szczep L2, zbliżony do fenotypu dzikiego oraz trzy mutanty flawinogenne. Wraz z nadprodukcją RF, szczepy te wykazywały podwyższoną oporność w stosunku do Cr(VI). Mutanty przejawiały silną aktywność redukcji chromianu, co udowodniono za pomocą techniki spektrometrii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Stwierdzono, że mechanizm biotransformacji Cr(VI)→Cr(III) zachodził zewnątrzkomórkowo. Jednocześnie wykazano, że egzogennie podana ryboflawina zwiększa wydajność reakcji bio redukcji zarówno przez mutanty, jak i szczep L2, przy czym sama RF w roztworze nie wpływała na przemianę Cr(VI)→Cr(III). Postuluje się zatem, że prawdopodobną rolę w procesie detoksykacji Cr(VI) pełni substancja pośrednicząca w redukcji, wydzielana przez komórki drożdży do medium hodowlanego.

Do modelu III, w ramach którego badano oddziaływania roślin z Cr(VI), wybrano cztery gatunki makrofitów: *Callitriche cophocarpa* Sendtn., *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid., *Elodea canadensis* Michx. i *Lemna trisulca* L. W toku prowadzonych badań wyznaczono subletalne stężenia Cr(VI) dla poszczególnych gatunków. Następnie określano wpływ obecności chromianu na odpowiedź w postaci stresu oksydacyjnego, jak również analizowano zmiany w proteomach roślinnych za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej. W przypadku dwóch wybranych roślin, *Callitriche cophocarpa* oraz *Spirodela polyrhiza*, z zastosowaniem metody spektrometrii masowej (MS), przeprowadzono identyfikację białek różnicujących proteom roślin traktowanych Cr(VI), w odniesieniu do proteomu roślin inkubowanych w warunkach kontrolnych. Wykazano indukcję lub zwiększenie syntezy licznych białek, spośród których zidentyfikowana u hiperakumulującego makrofitu *Callitriche cophocarpa* reduktaza chinonowa (FQR1) jest najważniejszym odkryciem badawczym. Enzym ten może bowiem wspomagać zdolność *C. cophocarpa* do prowadzenia procesu fitoremediacji poprzez uczestniczenie w reakcjach bio redukcji Cr(VI), co w efekcie przypuszczalnie obniża poziom

stresu oksydacyjnego w tkankach. Dodatkowo, badane aktywności innych wybranych enzymów antyoksydacyjnych wskazały na istotną rolę tych układów w systemowej odpowiedzi roślin wodnych na stres wywołany obecnością Cr(VI).

Z uwagi na trudności w usuwaniu zanieczyszczeń chromem za pomocą tradycyjnych metod fizycznych i chemicznych, bioremediacja znajduje ostatnio uznanie jako dogodna alternatywa, umożliwiająca prowadzenie procesu w sposób wydajny, bezpieczny dla środowiska oraz efektywny pod względem ekonomicznym. Wyjaśnienie mechanizmów występujących w organizmach wykazujących oporność na chrom może być zatem punktem wyjściowym do wykorzystania ich korzystnych cech do unieczynniania skażeń na szeroką skalę. Wyselekcjonowanie organizmów o wysokim potencjale bioremediacji może poskutkować opracowaniem nowych i wprowadzeniem skutecznych, biotechnologicznych metod oczyszczania środowiska z metali ciężkich.

## Summary

Chromium (Cr) is a heavy metal of great industrial importance. Due to its wide application in industry, this metal contaminates the natural environment. Chromium is present at various oxidation states, from  $-IV$  to  $+VI$ , although only three forms occurring in the environment are stable: the metallic form Cr(0) and the ionic forms Cr (III) and Cr (VI). Ionic forms differ significantly in their physicochemical properties as well as chemical and biochemical activities. Cr(VI) is highly soluble, mobile and strongly toxic. As a chromate anion, it easily penetrates into cells using membranous systems of transport of metabolically important ions. Cr(III) is relatively low toxic due to its low bioavailability, although upon entry into cells it causes DNA damage.

High chromium toxicity causes a number of adverse ecological effects. As a heavy metal, it does not undergo biodegradation and gets accumulated in water, soil and in living organisms. There are numerous species of plants and microorganisms able to live in environments contaminated with chromium compounds. These organisms have developed different mechanisms of resistance, such as: biosorption, bioaccumulation, reduced accumulation, chromate efflux as well as enzymatic and non-enzymatic bioreduction of Cr(VI) to Cr(III). Some of these strategies may be associated with the synthesis of specific proteins and stimulation of a number of other active protective processes, which all contribute to the increased tolerance towards the presence of Cr-derived compounds.

The subject of this work was to characterize and critically discuss selected enzymatic and non-enzymatic systems of chromate transformations, with particular emphasis on reduction systems. An effort was made to explain the response to stress caused by the presence of chromium (VI), observed at the level of proteome changes. This study was also focused on selection of organisms possessing efficient Cr(VI) bioremediation strategies. Such organisms are expected to be useful in biotechnological applications aimed at eliminating environmental contamination with chromate.

The experimental part of the thesis was based on three research models focusing on different groups of organisms: bacteria, yeast and aquatic plants. In the studies of bacteria, the Cr(VI) tolerance of selected strains of the genera *Pseudomonas* and *Bacillus* was determined by assessing cell survival and growth ability in the presence of various concentrations of chromate. In the strains revealing Cr(VI)→Cr(III) reduction activities, the process was characterized by determining the location of the reducing agent (extra- or intracellular). It was also analyzed whether the Cr(VI) bioreduction process was based on enzymatic or non-enzymatic mechanism. Then, the ability to accumulate Cr by bacterial biomass was determined and electrophoretic separation of proteins was performed in order to visualize proteome changes in bacteria treated with chromate. In addition, zymographic staining of the quinone reductase activity was carried out. This enzyme possibly plays an important role in Cr(VI) detoxication by producing chromate reductase activity. Among the most significant achievements of the work is the demonstration of an enzymatic mechanism involved in Cr(VI) intracellular reduction performed by *Pseudomonas alcaligenes* 31 and *Bacillus cereus* ZB001. Also, an efficient accumulation of Cr(VI) in the strain *Burkholderia cepacia* 33 was evidenced.

In the yeast research model selected non-conventional yeasts were tested, that is the riboflavin (RF) over-producers of the species *Pichia guilliermondii*. The ability to reduce Cr(VI) of the wild-type strain L2 as well as of its mutants (*rib* and *hit* series) was determined. The mutants exhibited moderate- to strong chromate reduction activities, as evidenced by the technique of low-frequency electron paramagnetic resonance spectroscopy (*L-band* EPR). It was found that the mechanism of Cr(VI)→Cr(III) bioreduction occurred extracellularly. It was also shown that exogenously administered riboflavin increased the efficiency of Cr(VI)

reduction reactions by both the mutant *rib81* and the L2 strains, while RF supplemented alone to the solution did not affect the conversion of Cr(VI)→Cr(III). Therefore, it has been postulated that the possible role in the process of Cr(VI) detoxification is played by some substance mediating reduction, secreted by yeast cells into the culture medium.

Upon studying the plant model, four species of macrophytes were selected: *Callitriche cophocarpa* Sendtn., *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid., *Elodea canadensis* Michx. and *Lemna trisulca* L. Sublethal concentrations of Cr(VI) were determined for individual species. The influence of chromate on the oxidative stress response was determined as well as changes in plant proteomes were analyzed by two-dimensional electrophoresis. In the case of two selected plants, *C. cophocarpa* and *S. polyrhiza*, the identification of differentially expressed proteins of plants treated with Cr(VI) was carried out using mass spectrometry (MS). Among the up-regulated proteins, quinone reductase, as observed in the proteome of hyperaccumulating macrophyte *C. cophocarpa*, is the novel and the most important research discovery since this enzyme probably supports the ability of *C. cophocarpa* to carry out Cr(VI) phytoremediation. In addition, the detected activities of several antioxidant enzymes (catalase, peroxidases, superoxide dismutase) indicated the important role of these enzymatic systems in the systemic response of aquatic plants to the stress caused by the presence of Cr(VI).

Due to the difficulties in removing chromium pollutants with traditional physical and chemical methods, bioremediation appears as a convenient alternative, enabling the process to be carried out in a time-efficient, environmentally safe and economically reasonable manner. The explanation of mechanisms occurring in organisms resistant to chromium may therefore be the starting point for future applications in remediation of Cr pollution. Selection of organisms with high bioremediation potential may result in the development and introduction of effective biotechnology-based methods aimed at removal of heavy metal contamination from the natural environment.