

Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218

Ricardo R. Azario, Susana A. Salvarezza, Alexis Ibarra y María del C. García
Universidad Tecnológica Nacional (UTN), Facultad Regional Concepción del Uruguay,
Departamento de Materias Básicas, Grupo de Investigación de la Cáscara de arroz (GICA),
Ingeniero Pereira 676, (3260) Concepción del Uruguay, Entre Ríos- Argentina
(e-mail: garciam@frcu.utn.edu.ar)

Resumen

Se estudió el efecto de cromo (VI) y (III) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 con el fin de determinar la toxicidad de estas especies químicas. El estudio fue realizado en dos condiciones experimentales: soluciones unimetal de cromo (III o VI) y en soluciones multimetal conteniendo además plomo y cadmio. Se observa que el cromo hexavalente inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, cuando se encuentra en un rango de concentración de 25 a 100 ppm, similar al de efluentes industriales, y que dicho efecto es potenciado por la presencia de plomo, que *per se* no modifica la viabilidad bacteriana. Por otro lado, las concentraciones bajas de cromo (VI, 0.05 - 5 ppm) no alteran el crecimiento pero producen una estimulación en presencia de plomo o cadmio. La forma trivalente de cromo no modifica el crecimiento bacteriano a concentraciones bajas (25 a 100 ppm) pero causa una estimulación a concentraciones más altas (200 a 400 ppm).

Palabras clave: *Escherichia coli*, crecimiento bacteriano, cromo (III), cromo (VI), metales pesados

Effects of Hexavalent and Trivalent Chromium on the Growth of *Escherichia coli* ATCC 35218

Abstract

The effect of chromium (III) and (VI) on the growth of *Escherichia coli* ATCC 35218 was studied to determine the toxicity of these chemical species. The study was performed in two experimental conditions: single chromium solutions (III or VI) and multimetal solutions containing chromium and either lead or cadmium. Hexavalent chromium, at concentrations from 25 to 100 ppm, similar to those found in industrial effluents, inhibits the growth of *Escherichia coli*. This inhibitory effect is increased by the presence of lead, which does not modify *per se* the bacterial viability. On the other hand, low concentrations of chromium (VI, 0.05-5 ppm) do not alter bacterial growth but cause stimulation in the presence of either lead or cadmium. The trivalent form of chromium does not modify the bacterial growth at low concentrations (25 to 100 ppm) but causes stimulation at high concentrations (200 to 400 ppm).

Keywords: *Escherichia coli*, bacterial growth, chromium (III), chromium (VI), heavy metals

INTRODUCCION

El cromo (Cr), un metal pesado localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, posee numerosas aplicaciones industriales y, a menudo, causa contaminación ambiental tanto de suelos como de acuíferos (Losi et al., 1994).

El cromo, como todos los metales de transición, puede existir en numerosos estados de oxidación. Las especies más estables y frecuentes de este metal, el cromo trivalente y el cromo hexavalente, presentan propiedades químicas diferentes. El cromo (VI), considerada la especie más tóxica y carcinogénica (Codd et al., 2001), se encuentra combinado con el oxígeno formando iones cromato o dicromato (Cervantes et al., 2001). En contraste, el cromo (III) bajo la forma de óxidos, hidróxidos o sulfato, presenta menor movilidad y existe principalmente unido a la materia orgánica en ambientes acuáticos y en suelos (Cervantes et al., 2001). El cromo (VI) es un agente oxidante fuerte y, en presencia de materia orgánica, es reducido a cromo (III). Sin embargo, niveles elevados de cromo (VI) pueden superar la capacidad reductora del ambiente y persistir como contaminante.

La similitud estructural del cromato con el sulfato permite el ingreso del cromo (VI) a la bacteria a través del sistema de transporte de sulfato (Cervantes y Campos-García, 2007). A nivel intracelular, el cromo (VI) desencadena un proceso de stress oxidativo (Ackerley et al., 2006; Helbig et al., 2008a; Helbig et al., 2008b). La reducción intracelular del cromo (VI) por agentes reductores fisiológicos da lugar a intermediarios altamente reactivos, como el cromo (V) y especies reactivas del oxígeno, que son considerados los principales responsables de la toxicidad del cromo (VI) (Ramírez-Díaz et al., 2008) y de la carcinogénesis inducida por este tóxico (Codd et al., 2001; Beyersmann y Hartwig, 2008; Yao et al., 2008). En este sentido, el cromo (V) reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo cantidades significativas de radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$). Esta especie reactiva del oxígeno puede causar alteraciones directas en el ADN como así también otros efectos tóxicos (Valko et al., 2006; Wells et al., 2009).

La forma trivalente del cromo, a nivel intracelular, puede alterar la replicación y transcripción del ADN causando efectos mutagénicos (Beyersmann y Hartwig, 2008; Ramírez-Díaz et al., 2008). Además, el cromo (III) también puede reaccionar con grupos carboxilos y sulfhidrilos de las enzimas causando una alteración tanto en la estructura como en la actividad enzimática (Ramírez-Díaz et al., 2008).

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto del cromo (III) y cromo (VI) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 35218 con el fin de determinar la toxicidad de estas especies. El estudio fue realizado en dos condiciones experimentales: soluciones unimetal de cromo (III o VI) y en soluciones multimetales conteniendo además plomo y cadmio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usó un cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 35218) en fase exponencial, empleando como caldo de cultivo el medio infusión cerebro corazón (BHI - Britania).

El crecimiento bacteriano fue monitoreado a través de lecturas de densidad óptica a 650 nm empleando un espectrofómeto Metrolab 300 (ARGENTINA). La suspensión de células bacterianas exhiben una máxima absorbancia a 650 nm, mientras que el medio de cultivo puro conteniendo cromo (VI) presenta una máxima absorbancia a 350 nm y no absorbe a 650 nm. Por lo tanto, se descarta una interferencia en las lecturas de crecimiento bacteriano por el medio de cultivo conteniendo el tóxico.

La determinación de la inhibición del crecimiento bacteriano se realizó en un medio líquido. Se usó un tubo control que no contiene el tóxico a analizar y tubos conteniendo el tóxico en orden creciente de concentración. Los tubos fueron inoculados con un precultivo de 18 horas de forma tal de obtener una densidad óptica de 0.05 a 650 nm, y posteriormente incubados a 37°C. La velocidad de crecimiento se determinó por espectrofotometría a 650 nm durante la fase exponencial a intervalos de 1 hora durante 5 horas. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron utilizando el parámetro de densidad óptica (D.O.) en función del tiempo (h).

Se usaron las siguientes concentraciones de cromo: solución "unimetal" de cromo (VI): 0.05, 0.5, 5, 25, 50, 100 y 200 ppm; solución unimetal de cromo (III): 25, 50, 75, 100, 200, 400 ppm; solución multimetal (cromo (VI) + plomo (II) 50 ppm + cadmio (II) 50 ppm).

Los reactivos utilizados fueron dicromato de potasio (Merck); cloruro de cromo (III) (Sigma); nitrato de plomo (II) (Cicarelli); cloruro de cadmio (Merck).

Los resultados se expresan como la media \pm error standard de la media. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de un factor. Las comparaciones "a posteriori" se realizaron mediante el test de Dunnett. En todos los casos, $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de una solución unimetal de cromo (VI: 0.05 – 200 ppm) o cromo (III: 25-400 ppm), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* en fase exponencial. Bajas concentraciones de cromo hexavalente (0.05 – 5 ppm) o de cromo trivalente (25 a 100 ppm) no modificaron la curva de crecimiento del microorganismo ensayado (Fig. 1A-B) mientras que concentraciones mayores de cromo III (200 – 400 ppm) produjeron un aumento significativo del crecimiento bacteriano (Fig. 1B). Por el contrario, altas concentraciones de cromo VI (25 – 200 ppm) causaron una inhibición concentración-dependiente del crecimiento bacteriano (Fig. 1C). Los porcentajes máximos de inhibición fueron de 19.4 ± 0.9 , 48.2 ± 0.5 , 85.7 ± 0.8 , 86 ± 1.7 (n=3) para 25, 50, 100 y 200 ppm, respectivamente. La respuesta cuali y cuantitativa de un microorganismo a un determinado metal pesado depende del tóxico y de la cepa analizada. En este estudio, el cromo trivalente no produjo en el rango de concentración utilizado una disminución del crecimiento bacteriano. En contraste, la forma hexavalente de este metal causó un efecto tóxico sobre el crecimiento bacteriano. Este efecto diferencial de las especies de cromo ensayadas puede atribuirse a que el cromo (VI), como anión cromato, puede atravesar la membrana celular a través del transporte de sulfato mientras que el cromo (III) no es sustrato del mismo con lo cual el acceso al interior de la célula es limitado. Este hecho podría explicar las diferencias en la capacidad de estas dos especies del cromo de inducir la formación de especies reactivas del oxígeno y producir daño oxidativo celular (Bagchi et al., 2002; Ramirez-Diaz et al., 2008).

Se analizó el efecto del cromo hexavalente sobre el crecimiento bacteriano en presencia de plomo y cadmio, dos metales altamente tóxicos que se presentan frecuentemente con el cromo. La curva de crecimiento de *Escherichia coli* no fue alterada en forma significativa por el cadmio o el plomo (25 a 200 ppm) (Fig. 2A-B). Es importante mencionar, que existen estudios en los cuales se observa un efecto tóxico de estos metales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (Peng et al., 2007; Helbig et al., 2008a; Helbig et al., 2008b; Kalantari y Ghaffari, 2008) en un rango de concentración similar al empleado en el presente estudio.

En presencia de cadmio, plomo o ambos (25 o 50 ppm), el cromo (VI: 0.05-5 ppm) produjo un aumento significativo del crecimiento de *Escherichia coli* (Tabla 1). Por otro lado, el plomo potenció el efecto inhibitorio inducido por altas concentraciones de cromo (VI: 25 – 50 ppm) mientras que el cadmio no tuvo efecto (Tabla 1). La incubación conjunta de los tres metales en una concentración de 50 ppm produjo un porcentaje de inhibición que no difiere significativamente del obtenido cuando se ensayaron cromo y plomo conjuntamente (Tabla 1). La potenciación del efecto inhibitorio del cromo hexavalente causado por el plomo podría atribuirse a que este metal altera la integridad de la membrana celular en *Escherichia coli*. En este sentido, Peng et al. (2007) sugieren que dada la similitud entre el radio iónico y la relación carga/radio, el plomo (II) puede reemplazar al calcio (II) de los sitios de unión a los lipopolisacáridos causando una ruptura de las áreas de protección de la superficie celular.

El crecimiento bacteriano en presencia de soluciones bi- o multimetal de cromo (III) no difiere del obtenido con soluciones unimetal del mismo (datos no mostrados).

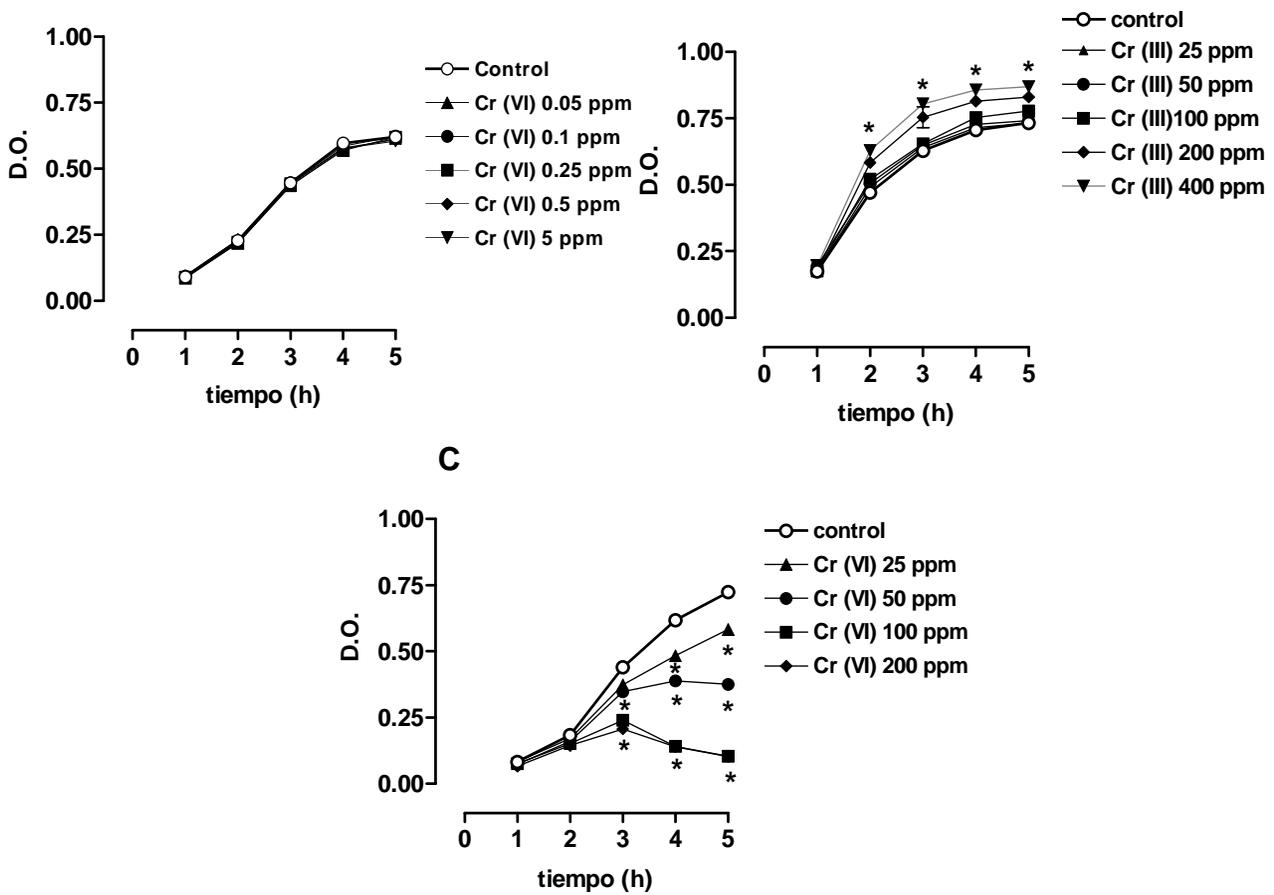


Fig. 1: Efecto del cromo sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

En la Fig. 1, las células crecieron en el medio BHI en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de cromo. Se determinó la densidad óptica (D.O) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media \pm error standard de la media (n=3). * p < 0.05 vs. el valor control correspondiente (Análisis de la varianza – test de Dunnett)

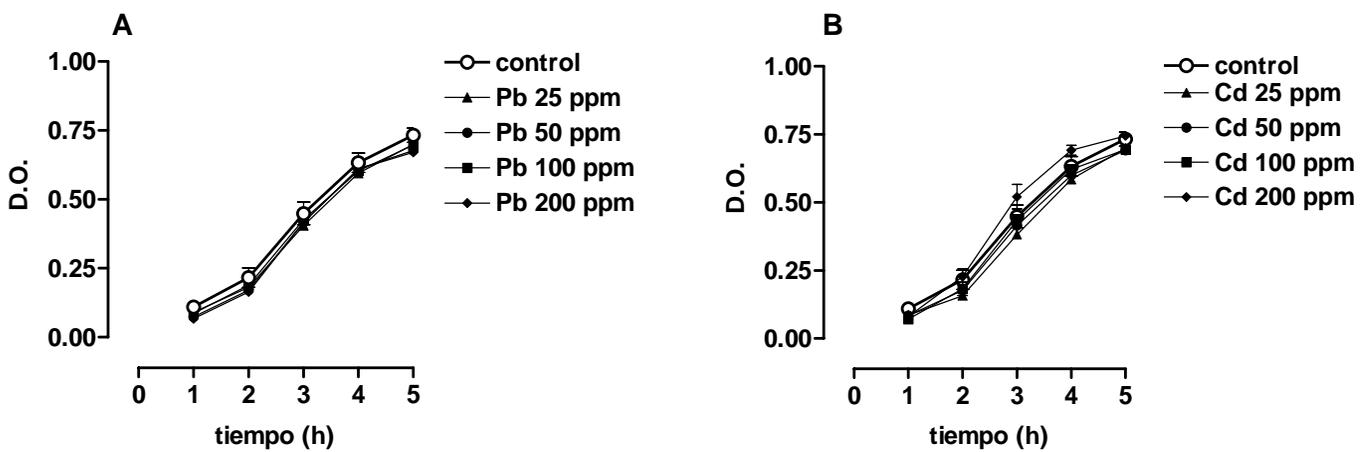


Fig. 2: Efecto del plomo (Pb) y cadmio (Cd) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*

En la Fig. 2, las células crecieron en el medio BHI en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de plomo (A) o cadmio (B). Se determinó la densidad óptica (D.O) durante la fase exponencial. Los resultados se expresan como la media \pm error standard de la media (n=3).

Tabla 1: Efecto de soluciones binarias y terciarias de cromo (VI), en combinación con plomo, cadmio o ambos, sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Concentración de Cromo (ppm)	Densidad óptica				
	0.05	0.5	5	25	50
Control (Cr, ppm)	0.569 ± 0.010	0.551 ± 0.006	0.548 ± 0.017	0.484 ± 0.009	0.388 ± 0.003
Solución Bimetal: Cr- Cd 25 ppm	0.653 ± 0.012*	0.627 ± 0.005*	0.632 ± 0.030*	ND	ND
Cr – Cd 50 ppm	0.640 ± 0.015*	0.637 ± 0.007*	0.701 ± 0.009*	0.444 ± 0.031	0.348 ± 0.020
Control (Cr, ppm)	0.649 ± 0.009	0.590 ± 0.008	0.597 ± 0.010	0.477 ± 0.007	0.381 ± 0.005
Solución Bimetal: Cr – Pb 25 ppm	0.723 ± 0.011*	0.752 ± 0.007*	0.820 ± 0.011*	ND	ND
Cr – Pb 50 ppm	0.740 ± 0.015*	0.767 ± 0.009*	0.832 ± 0.009*	0.422 ± 0.013*	0.266 ± 0.025*
Control (Cr, ppm)	0.580 ± 0.015	0.576 ± 0.011	0.560 ± 0.017	ND	0.383 ± 0.006
Solución multimetal: Cr- Cd-Pb (25 ppm)	0.701 ± 0.024*	0.662 ± 0.010*	0.649 ± 0.001*	ND	ND
Cr-Cd- Pb (50ppm)	0.723 ± 0.011*	0.705 ± 0.001*	0.798 ± 0.018*	ND	0.264 ± 0.014*

En la Tabla 1, las células crecieron en el medio BHI en presencia de distintas concentraciones de cromo (VI: control) o en presencia de soluciones bimetales de cromo y cadmio o cromo y plomo, o en presencia de soluciones multimetal conteniendo cromo, cadmio y plomo. Se representa la densidad óptica (D.O.) obtenida a las 4 h después de la incubación. Los resultados se expresan como la media ± error standard de la media (n: 3). * p < 0.05 vs. el valor correspondiente a Cr (VI) (Análisis de la varianza – Test de Dunnett). ND: no determinado.

CONCLUSIONES

En las condiciones experimentales llevadas a cabo, se observa que el cromo hexavalente es tóxico para el crecimiento de *Escherichia coli*, cuando se encuentra en un rango de concentración similar al de efluentes industriales, y que dicho efecto es potenciado por la presencia de otro metal pesado como el plomo, que *per se* no modifica el crecimiento bacteriano. Por otro lado, las concentraciones bajas (dentro de los límites aceptados) de cromo (VI) no alteran el crecimiento pero producen una estimulación del mismo en presencia de plomo o cadmio. Por último, la forma trivalente de cromo no modifica el crecimiento bacteriano a concentraciones bajas pero causa una estimulación a concentraciones más altas.

REFERENCIAS

Ackerley, D.F. y otros 4 autores; *Effect of chromate stress on Escherichia coli K-12*, J. Bacteriol.: 188(9), 3371-3381 (2006).

Bagchi, D. y otros 4 autores; *Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium*, Toxicology: 180, 5-22 (2002).

- Beyersmann, D. y A. Hartwig; *Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms*, Arch. Toxicol.: 82(8): 493-512 (2008).
- Cervantes, C. y otros 6 autores; *Interactions of chromium with microorganisms and plants*, FEMS Microbiol. Rev.: 25, 335-347(2001).
- Cervantes, C. y J. Campos-García; *Reduction and efflux of chromate by bacteria*. In: Nies D.H., Silver S. (eds), *Molecular Microbiology of heavy Metals*, Springer-Verlag, Berlin 407-420 (2007).
- Codd, R., C.T. Dillon, T. Levina y P.A. Lay; *Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell*, Coord. Chem. Rev.: 216, 537-582 (2001).
- Helbig, K., C. Bleuel, G.J. Krauss y D.H. Nies; *Glutathione and transition-metal homeostasis in Escherichia coli*, J. Bacteriol.: 190(15), 5431-5438 (2008a).
- Helbig, K., C. Grosse y D.H. Nies; *Cadmium toxicity in glutathione mutants of Escherichia coli*, J. Bacteriol.: 190(15), 5439-5454 (2008b).
- Kalantari, N. y S. Ghaffari; *Evaluation of toxicity of heavy metals for Escherichia coli growth*, Iran J. Environ. Health. Sci. Eng.: 5 (3), 173-178 (2008).
- Losi, M.E., C. Amrhein y W.T.S. Frankenberger; *Environmental biochemistry of chromium*, Rev. Environ. Contam. Toxicol.: 136, 91-121 (1994).
- Peng, L. y otros 4 autores; *Study on the toxic effect of lead (II) ion on Escherichia coli*, Biol. Trace Elem. Res.: 115 (2), 195-202 (2007).
- Ramírez-Díaz, M.I. y otros 5 autores; *Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds*, Biometals: 21(3), 321-332 (2008).
- Valko, M. y otros 4 autores; *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chemo-Biological Interactions: 160, 1-40 (2006).
- Wells, P.G. y otros 8 autores; *Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer*, Toxicol. Sci.: 108(1), 4-18 (2009).
- Yao, H. y otros 4 autores; *Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis*, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.: 27 (2), 77-88 (2008).