

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**"IDENTIFICACIÓN DEL GEN *aoxB* EN UNA COLECCIÓN DE  
PROTEOBACTERIAS RESISTENTES A ARSÉNICO DEL RÍO MOLOLOA"**



**QFB ARMANDO QUINTERO CASTAÑEDA**

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de  
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Ambientales

Tepic, Nayarit, 4 de junio 2014

**Dr. Diego García Paredes**  
Coordinador del Programa de  
Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias  
Presente

Los que suscribimos, integrantes del comité tutorial del QFB **Armando Quintero Castañeda**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada: "**Identificación del gen *aoxB* en una colección de proteobacterias resistentes a arsénico del río Mololoa**" y determinamos que la tesis puede ser presentada por el estudiante de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Ambientales.

Atentamente

EL COMITÉ TUTORIAL

**Directora de Tesis: Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes**

**Co-Director de Tesis: Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera**

**Asesor de Tesis: Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**





CBAP/141/14

Xalisco, Nayarit; 10 de junio de 2014

**Ing. Alfredo González Jáuregui**  
**Director de Administración Escolar**  
**P r e s e n t e.**

Con base al oficio de fecha 04 de junio de 2014, enviado por los **CC. Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes, Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera, y Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza al **C. Armando Quintero Castañeda**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"Por lo Nuestro a lo Universitario"**

**Dr. J. Diego García Paredes**  
**Coordinador del Posgrado**



C.c.p.-Expediente.  
8ref.

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto "Resistencia a metales pesados y antibióticos en bacterias ambientales del río Mololoa" que se desarrolla en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la UAN, bajo el liderazgo de la Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes y contó con el apoyo económico PROMEP/103.5/07/2519 del mismo proyecto.

Parte de los experimentos se realizaron en el laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la UAN y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a buen término con mi maestría y ayudarme a entender que caminar por un sendero sinuoso hace más placentera la llegada al destino fijado.

A la doctora Verónica Mondragón por despertar en mi persona el interés por la investigación, por permitirme formar parte de su selecto equipo de trabajo y por todo su apoyo y compromiso durante el desarrollo de mi maestría.

A la doctora Leticia Mónica Sánchez por aceptarme como alumno de maestría, por su apoyo y dedicación en el proyecto de investigación y por su reiterado interés en la adopción de los valores imprescindibles en un investigador.

A los M. en C. Mónica Elizabeth Martínez y Yolotzin Apatzingán Palomino por la ayuda y orientación que me brindaron cuando más lo necesitaba.

Al doctor Jesús Bernardino Velázquez por sus enseñanzas en las asignaturas.

A los compañeros de generación, con quienes comparto la felicidad por sus logros.

A la Q.F.B. Guadalupe Pacheco y la Biólogo Geovanny Melchor por su comprensión y apoyo en los momentos más difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a mi persona en la modalidad de becas estudiantiles para alumnos de maestría (No. de beca 335089; CVU 448011).

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras de la Universidad Autónoma de Nayarit por las facilidades económicas y administrativas otorgadas para mi desempeño como alumno de maestría en ciencias. De igual manera, agradezco al personal administrativo de la dependencia citada por el apoyo brindado durante el desarrollo de mi empresa, que está por concluir.

A la dirección de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Resistencia Bacteriana para el desarrollo experimental de la presente investigación.

Al Laboratorio de Resistencia Bacteriana por permitir la realización de la mayor parte de los experimentos.

A la Unidad de Tecnología de Alimentos por facilitar el uso de instalaciones y equipo del Laboratorio de Análisis Especiales.

Al Laboratorio de Biología Molecular perteneciente al Departamento de Farmacobiología del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara por permitir mi aceptación y facilitar sus instalaciones para la realización de una estancia de investigación con la Dra. María Esther Macías Rodríguez.

## DEDICATORIA

A Aideé

Por tu paciencia y comprensión; poco te importó sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor, por lo cual puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti. Gracias por estar siempre a mi lado, Chaparra.

A mis padres y hermanos

Por el apoyo y comprensión que me brindaron durante estos años de estudio. Que Dios recompense su bondad y me los guarde muchos años.

A la memoria de un amigo

Quien se nos adelantó en el camino y no alcanzó a compartir mi gusto por este logro. De corazón le dedico este triunfo, amigo Don Luis.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<i>AttI</i>	Sitio de inserción de cassetes de genes en un integrón
<i>Acr3p</i>	Proteínas de transporte transmembranal de arsenito
<i>ArrA</i>	Enzima arsenato reductasa respiratoria
<i>AoxB</i>	Enzima arsenito oxidasa
<i>aoxB</i>	Gen codificante para la subunidad mayor de la arsenito oxidasa
<i>ars</i>	Operón de resistencia a arsénico; incluye una enzima arsenato reductasa citoplasmática y un complejo de expulsión de arsenito
EDTA	Etilendiaminotetraacetato disódico
HGT	Transferencia Genética Horizontal (HGT, por sus siglas en inglés)
<i>lacZ</i>	Gen que codifica la enzima $\beta$ -galactosidasa
H <sub>2</sub> O <sub>de</sub>	Agua destilada desionizada estéril
<i>mer</i>	Operón de resistencia a mercurio; incluye una enzima mercurio reductasa y proteínas de expulsión
pA	Oligonucleótido forward del par publicado por Hutson <i>et al.</i> , 1993 para amplificación de secuencias de rADN 16S
pH*	Oligonucleótido reverse del par publicado por Hutson <i>et al.</i> , 1993 para amplificación de secuencias de rADN 16S
$\chi^2$	Ji cuadrado



## ÍNDICE TEMÁTICO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO .....	1
1.2 CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO .....	3
1.3 REGULACIÓN .....	5
1.4 EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO .....	6
1.5 CLASIFICACIÓN Y NORMATIVA .....	8
1.6 INTERACCIÓN CON MICROORGANISMOS.....	9
1.7 LA ENZIMA ARSENITO OXIDASA .....	10
1.8 ASPECTOS MOLECULARES DE LA ENZIMA.....	12
1.9 EL OPERÓN <i>aox</i> .....	13
1.10 EL GEN <i>aoxB</i> .....	16
2. ANTECEDENTES.....	22
3. JUSTIFICACIÓN .....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVO GENERAL .....	27
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	27
6.2 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS .....	28
6.3 ESTRATEGIA DE TRABAJO.....	28
6.3.1 PRUEBAS FENOTÍPICAS Y EXTRACCIÓN DE ADN .....	29
a) pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29
b) prueba de capacidad arsenito-oxidante .....	30
c) análisis de resultados.....	30

d) extracción de ADN bacteriano.....	31
6.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	31
▪ ETAPA UNO.....	32
a) empleo de los Oligonucleótidos diseñados por Inskeep et al., 2007.....	32
b) empleo de los Oligonucleótidos diseñados por Quéméneur et al., 2008.....	33
▪ ETAPA DOS.....	34
a) búsqueda del gen <i>aoxB</i> en integrones clase I.....	34
b) selección de cepas para análisis de rADN 16S.....	36
c) análisis de secuencias de rADN.....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	37
7.2 ACTIVIDAD ARSENITO-OXIDANTE.....	39
7.3 IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>aoxB</i> .....	41
7.3.1 BÚSQUEDA DEL GEN CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DESCRITOS POR INSKEEP et al., 2007.....	41
7.3.2 BÚSQUEDA DEL GEN CON UTILIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DESCRITOS POR QUÉMÉNEUR et al., 2008.....	42
7.4 BÚSQUEDA DEL GEN <i>aoxB</i> INMERSO EN INTEGRONES CLASE I.....	46
7.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE rADN 16S.....	47
8. CONCLUSIONES.....	50
9. PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	51
10. PROSPECTIVAS.....	51
11. BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXO 1 SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS.....	63

## **ÍNDICE DE CUADROS**

<i>Cuadro 1. Principales compuestos orgánicos e inorgánicos que forma el arsénico</i>	<b>2</b>
<i>Cuadro 2. Normas y regulaciones para el arsénico inorgánico</i>	<b>5</b>
<i>Cuadro 3. Identificación y sitios de aislamiento de las especies bacterianas utilizadas en este estudio</i>	<b>28</b>
<i>Cuadro 4. Oligonucleótidos empleados en esta investigación, tamaño del fragmento esperado (cuando corresponde) y sus referencias</i>	<b>32</b>
<i>Cuadro 5. Resultados de las pruebas de CMI de arsenito y actividad arsenito-oxidante</i>	<b>38</b>
<i>Cuadro 6. Tamaños resultados de la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR del rADN 16S</i>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del arsénico.....	4
Figura 2. Estructura y ciclo catalítico de la enzima arsenito oxidasa.....	11
Figura 3. Estructura cristalina de la Arsenito Oxidasa de <i>A. faecalis</i> . .....	12
Figura 4. Contexto genético de 21 islas de arsénico.....	15
Figura 5. Filogenia de secuencias <i>aoxB</i> y <i>rADN 16S</i> .....	18
Figura 6. Comparación de las regiones amplificadas por los oligonucleótidos de <i>Inskeep et al., 2007</i> y <i>Quéméneur et al., 2008</i> .....	20
Figura 7. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de siete genes <i>aoxB</i> publicados y tentativos que muestra las regiones usadas para el diseño de oligonucleótidos.....	21
Figura 8. Ubicación geográfica del río Mololoa.....	22
Figura 9. Sitios muestreados en la búsqueda de bacterias resistentes.....	25
Figura 10. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este estudio. ...	29
Figura 11. Plantilla empleada en la técnica de CMI.....	30
Figura 12. Planteamiento de las pruebas de PCR con oligonucleótidos dirigidos a las secuencias conservadas <i>IntI1</i> y <i>qacED</i> del Integrón Clase I en combinación con los oligonucleótidos para el gen <i>aoxB</i> .....	35
Figura 13. Pruebas de CMI de arsenito realizadas a las 15 cepas de estudio.....	39
Figura 14. Resultados de pruebas de actividad arsenito-oxidante en medio sólido.....	39
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR con los oligonucleótidos de <i>Inskeep et al., 2007</i> .....	42

*Figura 16. Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en TAE de las bandas amplificadas con los oligonucleótidos de Quéméneur et al., 2008 ..... 43*

*Figura 17. Resultado del BLASTp® entre la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia de 640 pb y las secuencias reportadas en la base de datos Non-redundant protein sequences, del NCBI®..... 43*

*Figura 18. Electroforesis de los productos de PCR para la amplificación de rADN 16S..... 49*

## RESUMEN

El arsénico en altas concentraciones representa un riesgo para la salud humana y el ambiente. El río Mololoa, que atraviesa la ciudad de Tepic, Nayarit, presenta concentraciones elevadas de arsénico. Además es afectado por descargas industriales, agropecuarias, domésticas, de servicios y lixiviados del tiradero municipal a cielo abierto "El Ixtete", lo que causa un serio problema de salud pública. En estudios previos llevados a cabo en este sitio, se han aislado e identificado una serie de microorganismos con capacidad de resistencia a arsénico y metales pesados como mercurio, cromo, cadmio y a antibióticos como kanamicina, ciprofloxacino, gentamicina y beta-lactámicos. Estos hallazgos sugieren la existencia de una constante presión de selección en la zona. Ello implica que sólo las bacterias en cuyo genoma se encuentren genes de resistencia a agentes selectivos lograrán sobrevivir.

En este trabajo, se encontró que 8 de las 15 cepas estudiadas tienen la capacidad de convertir arsenito en arsenato por reacción de oxidación, lo que explica el fenotipo arsenito resistente, con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) entre 2 y 15 mM, correspondiente a las cepas C4: *E. cloacae*, C5: *Enterobacter* sp., C10: *Enterobacter* sp., C12: *K. pneumoniae*, C16: *E. aerogenes*, C20: *K. pneumoniae*, C81: *K. pneumoniae* y C95: *K. pneumoniae*. La identificación del gen *aoxB* como responsable del fenotipo arsenito-resistente con utilización de los oligonucleótidos reportados para este gen no fue posible. Probablemente, sea consecuencia de la ocurrencia de un proceso exaptativo donde los microorganismos empleen un mecanismo enzimático distinto del sistema *aox* para la oxidación de arsenito.

## SUMMARY

The presence of high concentrations of arsenic in a certain site represents a constant risk to populations living there. In Mololoa River, which flows across the city of Tepic, Nayarit, concentrations of arsenic above the average content of continental crust have been found. Along with this, pollution by sewage and landfill leachate "El Ixtete" constitutes a serious public health problem. In previous studies, arsenic-resistant microorganisms have been isolated from samples of sewage and leachate. Those organisms are also resistant to heavy metals such as mercury, chromium, cadmium and antibiotics such as kanamycin, ciprofloxacin, gentamicin and beta-lactams.

In this work, it was found that 8 of 14 studied strains have the ability to convert arsenite to arsenate by oxidation. This explains the phenotype resistant arsenite, with values of minimum concentration inhibitory (CMI) are between 2 and 15 mM ( $\text{NaAsO}_2$ ) sodium arsenite, corresponding to the strains C4: *E. cloacae*, C5: *Enterobacter* sp., C10: *Enterobacter* sp., C12: *K. pneumoniae*, C16: *E. aerogenes*, C20: *K. pneumoniae*, C81: *K. pneumoniae* y C95: *K. pneumoniae*. It was not possible to identify the *aoxB* genotype. This could be probably caused by occurrence of an exaptative process arising from different enzymatic mechanisms other than "aox".





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO

El arsénico (As) es un metaloide ubicuo en el ambiente (Brown y Ross, 2002) que pertenece al grupo V de la tabla periódica de los elementos y es, por lo tanto, clasificado como un metal pesado. Se encuentra en la naturaleza en cuatro estados de oxidación (+5, +3, 0, y -3), con arsenato pentavalente [+5, As (V)], y arsenito trivalente [+3, As (III)] como las formas más comunes. El arsénico elemental muy raramente se encuentra en la naturaleza, pero se puede encontrar en forma de masas microcristalinas en Siberia, Alemania, Francia, Italia, Rumania, y los EE.UU. La mayor parte se encuentra en conjunción con azufre en minerales tales como arsenopirita (FeAsS), realgar (AsS), oropimente (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) y enargita (Cu<sub>3</sub>AsS<sub>4</sub>) (Mateos *et al.*, 2006).

Dado que se encuentra en cuatro estados de oxidación, este elemento puede formar una serie de compuestos químicos, de los cuales se resumen los principales en el cuadro 1.

Los compuestos arsenicales tienen una larga historia como agentes medicinales y venenosos. Se sabe que las sociedades humanas ya conocían el arsénico en el año 3000 a. de C. y que posiblemente fue descubierto por su presencia como subproducto en las actividades mineras. Su uso medicinal fue descrito desde el año 400 a. de C. por Hipócrates, quien recomendó la aplicación de una pasta de realgar (AsS) para tratar úlceras cutáneas. Historias de muertes por envenenamiento con arsénico han abundado en los círculos de la política. Durante el Renacimiento en Italia, los Borgias usaron arsénico para asesinar oponentes políticos (Sambu y Wilson, 2008).

**Cuadro 1. Principales compuestos orgánicos e inorgánicos que forma el arsénico.**

Nombre (Sinónimo)	Fórmula química
<b>Arsénico inorgánico, As (III)</b>	
óxido de arsénico (III), trióxido de arsénico	$As_2O_3$ ó $As_4O_6$
ácido ortoarsenioso, ácido arsenioso	$H_3AsO_3$
ácido metaarsenioso	$HAsO_2$
(Orto) arsenitos, sales del ácido ortoarsenioso	$H_2AsO_3^-$ , $HAsO_3^{2-}$ , $AsO_3^{3-}$
cloruro de arsénico (III), triclorigenato de arsénico	$AsCl_3$
sulfuro de arsénico (III), trisulfuro de arsénico	$As_2S_3$
<b>Arsénico inorgánico, As (V)</b>	
óxido de arsénico (V), pentóxido de arsénico	$As_2O_5$
ácido ortoarsénico, ácido arsénico	$H_3AsO_4$
ácido metaarsénico	$HAsO_4$
(Orto)arsenatos, sales del ácido arsénico	$H_2AsO_4^-$ , $HAsO_4^{2-}$ , $AsO_4^{3-}$
<b>Arsénico orgánico</b>	
ácido metilarsínico, ácido metanoarsónico	$CH_3AsO(OH)_2$
óxido de trimetilarsina	$(CH_3)_3AsO$
metilarsina	$CH_3AsH_2$
dimetilarsina	$(CH_3)_2AsH$
trimetilarsina	$(CH_3)_3As$
ácido arsánilico,	$H_2N-C_6H_4-AsO(OH)_2$
ácido p-aminobenceno-arsónico	
ácido 4-nitrofenilarsónico,	$O_2N-C_6H_4-AsO(OH)_2$
ácido p-nitrofenilarsónico	
arsenobetaina	$(CH_3)_3As^+CH_2COOH^-$
arsenocolina	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH^-$
dialquilocloroarsina	$R_2AsCl$
alquilocloroarsina	$RArCl_2$

Tomado de: Carbonell *et al.*, 1995.

Durante la Edad Media, las propiedades tóxicas del arsénico fueron muy utilizadas y el arsénico blanco (trióxido de arsénico) fue el veneno de elección, por su alta toxicidad. Durante la Primera Guerra Mundial, se desarrollaron y utilizaron como armas químicas los gases arsenicales, entre ellos el gas Lewisita (clorovinildicloroarsina), que es un potente agente vesicante, irritante local y tóxico sistémico. A principios de este siglo, los arsenicales orgánicos se emplearon para combatir enfermedades como la tripanosomiasis y la sífilis y, algunos compuestos de arsénico inorgánico, para el tratamiento de enfermedades cutáneas crónicas, anemia, leucemia y enfermedades pulmonares (Sambu y Wilson, 2008).

Actualmente, alrededor del 90% de todos los compuestos de arsénico producidos por el humano se utilizan como conservantes de la madera, donde el arsenato cromado de cobre es el más utilizado. El 10% restante se usa en insecticidas, fertilizantes, herbicidas, fungicidas, producción de vidrio, semiconductores y producción de aleaciones de metales; también se utiliza como ingrediente en medicamentos para el tratamiento de algunas enfermedades (por ejemplo, enfermedad del sueño y leucemia crónica mieloide) (Mateos *et al.*, 2006).

## **1.2 CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO**

Las fuentes naturales del arsénico presente en el ambiente incluyen el vulcanismo, la actividad hidrotérmica y la erosión de las rocas sedimentarias e ígneas que contienen minerales de arsénico en su composición (Figura 1). Las actividades antropogénicas, tales como la fundición de minerales, quema de combustibles fósiles y el uso de agroquímicos también representan una fuente importante de arsénico en el ambiente (Oremland y Stolz, 2003).

Este metaloide se encuentra ampliamente distribuido de forma desigual en la atmósfera terrestre, hidrósfera, suelos, sedimentos, y organismos vivos (Cullen y

Reimer, 1989). Su contenido en la corteza terrestre oscila entre 1.5 y 2 mg/kg y es el número 20 en la lista de los elementos más abundantes (N. A. S., 1977). Se encuentran altas concentraciones de arsénico en las áreas donde se presenta una actividad geotérmica notable, así como en suelos procedentes de roca madre de origen volcánico (Carbonelli *et al.*, 1995).

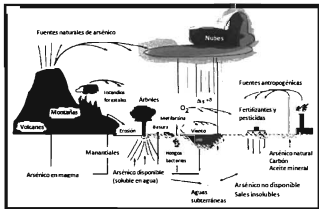


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del arsénico. Se muestra la implicación de los microorganismos en la formación de las especies químicas del arsénico. Traducido de: Jones, 2007.

Su ciclo biogeoquímico es altamente dependiente de la transformación bacteriana, la que consiste en metilar, reducir y/o oxidar el metaloide. Dichas biotransformaciones tienen un rol fundamental en la movilidad y la distribución de arsénico en el ambiente (Silver y Phung, 2005).

### 1.3 REGULACIÓN

La regulación del arsénico está a cargo de diversas dependencias (Cuadro 2). El valor límite actual de arsénico en agua potable establecido por la OMS es de 10 µg As/L (WHO, 2004). Esta concentración también fue adoptada en México como límite máximo permisible en agua de toma domiciliaria, según lo estipula la NOM-127-SSA1-1994, que establece los límites máximos permisibles en agua para uso y consumo humano.

La dosis de referencia LOAEL (nivel más bajo de efectos adversos observables) calculada para el arsénico a partir del valor de 0.17 mg/L de arsénico en el agua con una estimación de la ingestión de arsénico a través de los alimentos de 0.002 mg/día, un consumo de 4.5 litros de agua al día y un peso corporal promedio de 55 kg en las personas expuestas, es de 0.014 mg/kg-día (ATSDR, 2009).

**Cuadro 2. Normas y regulaciones para el arsénico inorgánico.**

Organismo	Énfasis	Nivel
ACGIH	Aire – lugar de trabajo	10 µg/m <sup>3</sup>
NIOSH	Aire – lugar de trabajo	2 µg/m <sup>3</sup>
OSHA	Aire – lugar de trabajo	10 µg/m <sup>3</sup>
	Aire – ambiente	No Aplica
EPA	Agua – agua de bebida	10 partes por billón
FDA	Alimentos	0.5 – 2 partes por billón

ACGIH: Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales  
 EPA: Agencia de Protección Ambiental de EE. UU.  
 FDA: Administración de Alimentos y Fármacos de EE. UU.  
 NIOSH: Instituto Nacional para la Seguridad y la Salud Ocupacional  
 OSHA: Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EE. UU.

Tomado de: ATSDR, 2009.

#### 1.4 EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

El arsénico, al igual que otros metales pesados, no puede ser destruido en el ambiente, por lo cual puede propagarse y causar efectos perjudiciales en los seres humanos, animales y otros organismos (Mateos *et al.*, 2006).

Las principales rutas de exposición al arsénico son la ingesta de alimentos y de agua de bebida, así como la inhalación de partículas. El nivel de absorción está influido por la ruta de exposición y la especie química de arsénico. Las plantas pueden absorber arsénico del suelo o de la materia depositada sobre sus hojas. Generalmente, la absorción de las formas orgánicas de arsénico es muy superior a la absorción de las inorgánicas, aunque normalmente las concentraciones en las plantas son bajas (Moreno-Grau, 2003). El arsenato y arsenito, al entrar al agua de consumo humano desde fuentes naturales, han causado envenenamientos en países de América y Asia (Nordstrom, 2002; Ravenscroft *et al.*, 2009). Además, en otros países se ha reportado contaminación por arsénico debida a actividades antropogénicas como la minería (Smedley y Kinniburgh, 2002).

El principal aporte de As a la dieta son los alimentos de origen marino, pues los crustáceos y peces marinos comestibles tienen las concentraciones más altas (0.1 a 90  $\mu\text{g/g}$ ). Sin embargo, el As presente en este tipo de alimentos es orgánico, el cual es menos tóxico. La ingestión en el agua de bebida (principalmente arsénico inorgánico) es una importante fuente de exposición, que puede llegar a ser un problema grave de salud pública. Este problema ha sido descrito en varios países, donde las concentraciones rebasan varias veces el límite máximo permitido establecido por la OMS para agua de consumo humano. El ingreso al organismo a través del aire y suelo es mucho menor, pero puede llegar a ser importante en poblaciones aledañas a las fuentes de emisión (Pimparker y Bhawe, 2010).

El arsénico resulta tóxico para la mayoría de formas de vida (Cullen y Reimer, 1989). Debido a su similitud estructural con el fosfato, el arsenato ejerce su toxicidad por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, con lo que interrumpe la síntesis de ATP. Por su parte, el arsenito forma fuertes enlaces con grupos funcionales como los grupos tiol de los residuos de cisteína e imidazol de residuos de histidina de proteínas celulares, motivo por el cual ejerce una fuerte inhibición enzimática (Oremland y Stoltz, 2003).

Ello da lugar a procesos de toxicidad aguda y crónica; la ingestión de dosis grandes provoca problemas gastrointestinales, trastornos en funciones de sistemas cardiovascular, nervioso y finalmente, muerte. También depresión de médula ósea, hemólisis, hepatomegalia, melanosis, polineuropatía y encefalopatía (Bolt, 2013).

La exposición crónica se ha relacionado con una variedad de síntomas de afectaciones dérmicas como dermatitis exfoliativa, queratosis, vitiligo y cáncer de piel, así como con neuropatía periférica, encefalopatía, bronquitis, fibrosis pulmonar, hepatoesplenomegalia, hipertensión portal, enfermedad vascular periférica "enfermedad del pie negro", aterosclerosis, cáncer y diabetes mellitus (Bolt, 2013).

Según informes de la OMS, la exposición prolongada al arsénico en el agua potable está causalmente relacionada con un mayor riesgo de cáncer en piel, pulmones, vejiga y riñones, así como con cambios de la piel (hiperqueratosis y cambios en la pigmentación). A partir de concentraciones  $\geq 50 \mu\text{g As/L}$  de agua potable se han observado relaciones de exposición-respuesta para una variedad de patologías, con un riesgo mayor de cáncer de pulmón y vejiga y de lesiones en la piel (Bolt, 2013).

## 1.5 CLASIFICACIÓN Y NORMATIVA

En el 2002, el arsénico fue clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) dentro del grupo 1 de carcinogenicidad. Esta misma descripción le atribuyó el programa nacional de toxicología de Estados Unidos (NTP, por sus siglas en inglés), y la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) lo clasificó en el grupo A, que corresponde a la clasificación de carcinógeno humano conocido. Además, bajo la autorización de la Ley del Aire Limpio, la EPA clasifica al arsénico como un contaminante aéreo peligroso, y lo define como una sustancia que puede provocar una mortalidad creciente o enfermedades serias en seres humanos que hayan estado expuestos a niveles significativos de este contaminante. En 1986, la EPA promulgó las Normas Nacionales para la Emisión de Contaminantes Peligrosos en el Aire, las cuales aplican en 3 categorías de fuentes estacionarias: fábricas de arsénico, fundidoras primarias de cobre, y fábricas de manufactura de vidrio. Sin embargo, no existe un estándar de aire ambiental para el arsénico (ATSDR, 2009).

El nivel permisible de arsénico en el agua de bebida establecido por la EPA es 10 ppb (nivel máximo contaminante), valor que igualmente la Organización Mundial de la Salud recomienda como criterio provisional para el agua de bebida. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha establecido los niveles de tolerancia de arsénico presente en los subproductos de animales que fueron tratados con medicamentos veterinarios. Estos niveles oscilan entre las 0.5 ppm en huevos y en los tejidos comestibles crudos de pollos y pavos y las 2 ppm en ciertos subproductos crudos de cerdos. Los mariscos (especialmente los moluscos y los crustáceos) tienden a concentrar el arsénico disuelto en el agua de mar. Sin embargo, éste está presente en la forma orgánica, la cual no produce efectos adversos en los consumidores humanos, además de que se excreta rápidamente del cuerpo (ATSDR, 2009).



## 1.6 INTERACCIÓN CON MICROORGANISMOS

Las bacterias desempeñan un rol fundamental en la especiación y movilización del arsénico en el ambiente (Oremland y Stolz, 2005). Esta función resulta favorecida por su versatilidad para crecer en distintos hábitats, pueden ocupar nichos ecológicos mesófilos o termófilos (Inskip *et al.*, 2007; Quéméneur *et al.*, 2008; Quéméneur *et al.*, 2010; Rhine *et al.*, 2005), así como subterráneos subárticos (donde la temperatura fluctúa entre 4 y 10 °C) (Osborne *et al.*, 2010).

Los microorganismos se involucran en el ciclo del arsénico mediante reacciones de reducción, oxidación y metilación (Bhattacharjee y Rosen, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Oremland y Stolz, 2003). Para ello se valen de la expresión de genes específicos que les confieren capacidad de resistir concentraciones elevadas del metaloide, lo cual supone una ventaja con respecto a aquéllas que carecen de los mismos (Ehrlich, 1997).

Los mecanismos de resistencia hasta hoy descritos están codificados genéticamente en microorganismos de distintos géneros. La reducción del arsenato se ha descrito como un mecanismo de resistencia bacteriana al arsénico mediado por la presencia del operón *arsC*BAR, que implica la entrada del As(V) a la célula por la vía del fosfato. Una vez en el citoplasma es reducido a As(III) por la arsenito reductasa codificada por el gen *arsC*, y luego es bombeado fuera de la célula por proteínas codificadas por los genes *arsAB*, que se ubican en la membrana citoplasmática. Finalmente, el gen *arsR* cumple una función reguladora aunque se ha descrito que puede estar ausente en algunas bacterias reductoras (Xu y Rosen, 1997).

Otro mecanismo involucra los miembros de la familia de transportadores tipo Acr3p, que realizan una función similar a *arsB*, pero no presentan una similitud significativa en su secuencia por lo que ha sido reportado en especies

filogenéticamente más distantes que *ArsB*. *Acr3p* puede agruparse en dos subfamilias en base a sus disimilitudes filogenéticas: *Acr3pI* y *Acr3pII*. Ambas subfamilias han sido descritas en bacterias de suelo, pero no se ha establecido una correlación entre el genotipo y la resistencia a arsénico (Cai *et al.*, 2009a).

Por otra parte, se ha descrito la oxidación de arsénico principalmente como un mecanismo de detoxificación, ya que transforma el As (III) ubicado en el exterior de la membrana celular, a una especie química menos tóxica, As (V). Sin embargo, en los últimos años se han descrito bacterias quimiolitotróficas capaces de oxidar arsénico mediante un mecanismo que permite la obtención de energía. Ensayos *in vitro* indican que en el proceso se transfieren electrones obtenidos desde la oxidación del arsénico a la cadena transportadora de electrones, donde se utiliza el oxígeno como aceptor final y dióxido de carbono como fuente de carbono (Salmassi *et al.*, 2005).

## 1.7 LA ENZIMA ARSENITO OXIDASA

La arsenito oxidasa es una proteína periplásmica que se encuentra acoplada a la superficie externa de la membrana interna, está asociada funcionalmente a la cadena respiratoria (Ellis *et al.*, 2001) y ha sido descrita en una serie de aislados pertenecientes tanto a Bacteria como Archaea (Cai *et al.*, 2009b).

La oxidación del arsénico a arsenato ocurre a nivel del periplasma bacteriano, donde es catalizada por una enzima denominada arsenito oxidasa, la cual exhibe actividad arsenito oxidante en presencia de oxígeno, azurina o citocromo *c* como aceptores de electrones (Anderson *et al.*, 1992; Ahmann, 1994; Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2001).

Esta enzima es heterodimérica con una subunidad mayor de 88 kDa (~825 aminoácidos) (*AoxB*) que contiene una Mo-pterina y un grupo 3Fe-4S, y una subunidad menor de 14 kDa (~135 aminoácidos) (*AoxA*) que contiene el dominio

Rieske 2Fe-2S (Figura 2). AoxA posee un péptido TAT (Twin-Arginine Transporter) en el extremo amino terminal como señal para que la proteína heterodimérica plegada sea transportada del citoplasma al espacio periplásmico (Muller *et al.*, 2003). El cofactor Mo-pterina contiene dos pterinas orientadas una hacia arriba y otra abajo, de manera similar a lo que se ha encontrado en otros cofactores Mo-pterina de la familia de enzimas dimetilsulfóxido (DMSO) reductasas (Ellis *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

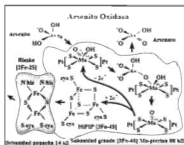


Figura 2. Estructura y ciclo catalítico propuesto para la enzima arsenito oxidasa. Los pasos son (i) unión del arsenito,  $H_2AsO_3$  a la enzima, (ii) transferencia de dos electrones al cofactor molibdeno (Mo), (iii) salida de arsenato ( $H_2AsO_4^-$ ), (iv) transferencia de los dos electrones del Mo(IV) al grupo 3Fe-4S, (v) transferencia de los dos electrones del grupo 3Fe-4S de la subunidad mayor al Rieske 2Fe-2S de la subunidad pequeña, y (vi) transferencia de los electrones del Rieske de la arsenito oxidasa al oxígeno en la cadena respiratoria. Traducido de: Mukhopadhyay *et al.*, 2002.

El ciclo catalítico propuesto de la arsenito oxidasa involucra el ingreso del arsenito al interior de la proteína a través de un orificio cónico en la superficie de la enzima (posiblemente coordinado por los residuos His-195, Glu-203, Arg-419 y His-423). Después, el arsenito entra en contacto directo por ataque nucleofílico con el molibdeno (VI) del cofactor Mo-pterina oxidado, lo que origina la transferencia de dos electrones. El arsenato es liberado a través del mismo orificio de entrada y el

molibdeno es reducido a Mo (IV). Después, los electrones se transfieren primero al grupo [3Fe-4S] situado a unos 1.5 nm de distancia del Mo, dentro de la subunidad grande Mo-pterina de la proteína, y después a un grupo [2Fe-2S] situado en la subunidad pequeña. A partir de ese sitio, los electrones se transfieren a la cadena respiratoria de la membrana interna, posiblemente primero a una azurina o un citocromo y eventualmente al oxígeno, el aceptor terminal de electrones (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2001 y Hoke *et al.*, 2004 citados en: Silver y Phung, 2005).

### 1.8 ASPECTOS MOLECULARES DE LA ENZIMA

El análisis de la subunidad mayor de la enzima arsenito oxidasa por cristalografía y de la secuencia aminoacídica han determinado que se compone de una serie de hojas beta y hélices alfa que en conjunto dan lugar a la existencia de cuatro dominios (Figura 3) (Ellis *et al.*, 2001; Quéméneur *et al.*, 2008). Los alineamientos múltiples entre secuencias obtenidas de diferentes especies bacterianas han mostrado la existencia del motivo C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>10</sub>-S que corresponde al inicio de dos de los cuatro dominios conservados.

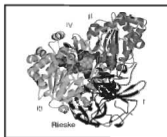


Figura 3. Estructura cristalina de la arsenito oxidasa de *A. faecalis*. Dominios I-IV de la subunidad mayor se muestran en color azul, verde, amarillo y naranja respectivamente. La subunidad menor de color rojo. Tomado de: Ellis *et al.*, 2001.

En cepas de *Ochrobactrum tritici* al igual que en cepas de *Herminiimonas arsenicoxydans*, se reportó la presencia de todos los genes anteriores dentro del operón *aox* (Branco *et al.*, 2009). Ensayos de mutagénesis con el transposón Tn5 en dicha cepa, revelaron que existen otras proteínas que participan en el control de la oxidación del arsenito, como son RpoN y DnaJ. RpoN es un factor  $\sigma^{54}$  alternativo de la ARN polimerasa y DnaJ interacciona con la chaperona DNA-K (Hsp-70-like) y regulan tanto la transcripción como la estabilidad del mRNA de *aox* o en la conformación de AoxR respectivamente (Koechler *et al.*, 2010). Por último, río abajo de todos los genes anteriores, se encuentra el gen denominado *aoxX*, el cual codifica para una proteína periplásmica de unión a oxianiones. Su expresión está determinada por arsénito, regula la expresión de los genes *aoxAB* y, por consecuencia, la actividad arsenito-oxidante (Cai *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2012).

La regulación de la expresión del operón *aox* responde a señales *quorum sensing* cuyas particularidades se desconocen (Kashyap *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013), pero podrían consistir en cambios conformacionales inducidos por arsénito, como en el caso de *Agrobacterium tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los genes de este operón se localizan en una sola copia en los genomas bacterianos, a menudo como parte de islas genéticas con otros genes de resistencia a arsénico (*ars* y *ACR3* tipos I y II), transporte de fosfato (operones *Pst1*) y transporte de fosfonato (operones *phn1*). Así mismo se ha determinado que los genes se encuentran en contextos genéticos variables (Figura 4), y con frecuencia forman parte de plásmidos (Li *et al.*, 2013).

Las islas de arsénico transferidas por plásmidos son frecuentes en  $\alpha$ -proteobacterias, a menudo en arreglos genéticos conservados, lo que habla de procesos de transferencia genética horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2013). Dentro de estas islas un elemento genético que podría desempeñar un papel importante en la distribución de genes de resistencia a compuestos de arsénico es el integrón.

Los integrones son elementos móviles de ADN que contienen un gen de integrasa (una recombinasa especializada) que les permite adquirir o intercambiar genes de resistencia a través de eventos de recombinación específica de sitio (*intI*) y un sitio de integración de cassettes (*attI*) en el que se integran los genes de resistencia (principalmente a antibióticos, aunque la resistencia a arsénico es una posibilidad fehaciente). Un cassette de genes contiene un gen de resistencia, un elemento de 59 pb y un elemento corto invertido repetido con un sitio núcleo de recombinación. Se han descrito al menos cinco clases de integrones cromosómicos y ligados a plásmidos en bacterias Gram-negativas. Los Integrones clase 1 se consideran los más comunes en los aislados clínicos y contienen los genes de resistencia a sales cuaternarias de amonio *qacED1* y resistencia a sulfonamida *sul1* en la región conservada 3' (Bass *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006).

### 1.10 EL GEN *aoxB*

De todos los genes que integran al operón *aox*, el gen *aoxB* ha sido el más estudiado, dado que en su secuencia se localiza el sitio catalítico de la enzima. Este gen consta de alrededor de 2,475 nucleótidos (Ellis *et al.*, 2001). Varias investigaciones concuerdan en que se trata de un gen cuya secuencia nucleotídica es muy variable. Las secuencias que conforman el sitio catalítico de la enzima son las únicas que guardan relación entre distintas especies, lo cual ha sido aprovechado para la búsqueda del gen gracias a la ventaja que la constancia de

esta región otorga (Inskeep *et al.*, 2007; Branco *et al.*, 2009; Escalante *et al.*, 2009; Hamamura *et al.*, 2009; Quéméneur *et al.*, 2008; van Lis *et al.*, 2012). Con base en los resultados de dichos estudios, se sabe que el gen *aoxB*: (a) se encuentra en numerosos microorganismos filogenéticamente distantes (b) se presenta en bacterias que provienen de diversos sitios geográficamente aislados con amplio rango en el nivel de la contaminación por arsénico y (c) se presenta y expresa en bacterias con actividad arsenito oxidante (Inskeep *et al.*, 2007).

El gen *aoxB* tiene las principales características de un marcador molecular: (i) Se ha encontrado en todas las bacterias aeróbicas arsenito-oxidantes estudiadas hasta ahora (*Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Thiomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., etc.). (ii) Las regiones conservadas de este gen, que corresponden al sitio catalítico de la enzima, han permitido el diseño de cebadores, y (iii) La región amplificada con dichos cebadores es suficientemente grande y cubre las variaciones genéticas dentro del gen, lo que permite la discriminación entre grupos filogenéticos. Estos datos son alentadores para el uso del gen *aoxB* como un marcador de resistencia específico funcional de los microorganismos arsenito-oxidantes aeróbicos en estudios de diversidad ambiental (Quéméneur *et al.*, 2008).

Así mismo, se ha demostrado que los análisis de relación filogenética basados en el gen *aoxB* muestran de manera general resultados similares a los obtenidos tras los análisis de secuencias de rADN 16S. Esto indica un origen común de la enzima arsenito oxidasa presente en microorganismos desde etapas evolutivas iniciales, aunque es claro también que los eventos de HGT han desempeñado un papel importante en estos procesos (Figura 5) (Quéméneur *et al.*, 2008).



Figura 5. Filogenia de secuencias *aoxB* y de rDNA 16S. Eventos putativos de HGT (enmarcados en la imagen) se han propuesto basados en la inconsistencia entre el árbol filogenético generado con secuencias aminoácidas *AoxB* y el generado con rDNA 16S (Li et al., 2013).



Las regiones conservadas del gen hicieron posible flanquear fragmentos específicos y diseñar oligonucleótidos para el estudio de la enzima (Quéméneur *et al.*, 2008).

Los oligonucleótidos utilizados por Quéméneur *et al.*, 2008 son: *aoxBM1-2F*: 5' CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA y *aoxBM3-2R*: 5' TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYTC. Estos se diseñaron a partir de nueve secuencias de proteínas AoxB de las bacterias *A. faecalis* (No. de acceso AY297781), *H. arsenicoxydans* (No. de acceso AF509588), *Thiomonas arsenivorans* (No. de acceso EU304260), *Agrobacterium tumefaciens* (No. de acceso DQ151549), *Rhizobium* sp. cepa NT26 (No. de acceso AY345225), *Chloroflexus aurantiacus* (No. de acceso NZ\_AAAH01000321), *Thermus thermophilus* (No. de acceso NC\_000854), las Archaea *Aeropyrum pernix* (No. de acceso NC\_000854) y *Sulfolobus tokodaii* (No. de acceso NC\_003106). Dichos oligonucleótidos flanquean una región de 1,100 pb en la primera mitad de la secuencia del gen *aoxB*. Ello corresponde a la secuencia desde la primera parte (aminoácidos 22 al 32 en AoxB de *H. arsenicoxydans*) del motivo CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>n</sub>S (CHFCIVGCGYH) necesario para unir el grupo [3Fe-4S] y el motivo consenso YEKGIWGN (aminoácidos 383 al 391) (figura 6) (Quéméneur *et al.*, 2008).

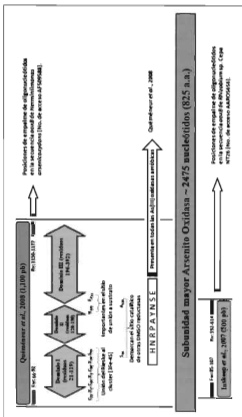


Figura 6. Comparación de las regiones amplificadas por los oligonucleótidos de Inskeep et al., 2007 y Quéméneur et al., 2008 (barras café y azul, respectivamente) con respecto a la subunidad mayor de la arsenito oxidasa (barra verde). Los primeros se sitúan en las posiciones 85-107 y 592-614 en la secuencia *aoxB* de *Rhizobium* sp. Cepsa N726 (señalados en rojo en la parte inferior) y los segundos en las posiciones 66-92 y 1150-1177 de la secuencia *aoxB* de *H. arsenicorydians* (señalados en rojo en la parte superior). Las funciones bien conocidas están señaladas con llaves en la imagen.

Inskeep y colaboradores en el 2007, reportaron un par de oligonucleótidos (*AoxBF*: GTSGGBTGYGGMTAYCABGYCTA y *aoxBR*: 5' TTGTASGCBGGNCGRTRTRGRAT) (Figura 7) que flanquean un fragmento de 500 pb en el primer cuarto del gen *aoxB* que codifica la subunidad Mo-pterina de la enzima arsenito oxidasa. Las secuencias usadas fueron las cepas: *Rhizobium* sp. Cepa NT26 (AARO5656), *Thermus thermophilus* cepa HB8 (BAD71923), *Chloroflexus aurantiacus* (ZP\_00356732), *Herminiimonas arsenicoxydans* (ULPA51) (AAN05581), *Alcaligenes faecalis* (AAQ19838), *Thiomonas* sp. Cepa VB-2002 (CAD53341) y *Agrobacterium tumefaciens* cepa 5A (ABB51928).

	80	90	100	
	..... .....	..... .....	..... .....	
<i>Rhizobium</i>	CATCGTGGT	TGGGCTATC	ACGGCTATC	
<i>Thermus</i>	CACCGTGGG	TGGGCTACA	AGGTCTAGT	
<i>Chloroflexus</i>	CATTGTGGT	TGTGGCTATC	AGGTCTACAA	
<i>Herminiimonas</i>	TATAGTGGC	TGTGGATAAC	ATGTTTACAA	
<i>Alcaligenes</i>	CATTGTGGC	TGTGGCTATC	ACGGCTACAA	
<i>Thiomonas</i>	.....-C	TGTGGCTACC	ACGGCTACAC	
<i>Agrobacterium</i>	CATCGTGGC	TGGGCTATC	ACGGCTACAC	
Primer set #1F	GTSGGB	TGYGMYTC	ABGYCTA	
	590	600	610	620
	..... .....	..... .....	..... .....	.....
<i>Rhizobium</i>	AAATCCACAA	CGGCGCGGC	TACAATTCOS	AGG
<i>Thermus</i>	GAATCCACAA	CGGCGCGGC	TACAATTCOS	AGG
<i>Chloroflexus</i>	CAATCCACAA	CGGCGCGGC	TACAATTCOS	AGG
<i>Herminiimonas</i>	CAATCCATAA	TGGGCGCGC	TACAATTCGT	AGT
<i>Alcaligenes</i>	AAATCCACAA	TGGGCGCGC	TACAATTCAG	AAT
<i>Thiomonas</i>	CAATCCATAA	CGGCGCGGC	TACAATTCOS	AAT
<i>Agrobacterium</i>	TAATCCACAA	CGGCGCGGC	TATAATTCOS	AAG
Primer set #1R	ATTGAYAA	YGGHCVGCS	TACAA	

Figura 7. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de siete genes *aoxB*, que muestra las regiones usadas por Inskeep *et al.*, 2007 para el diseño de oligonucleótidos.

## 2. ANTECEDENTES

El río Mololoa se localiza en la región hidrológica No.12 (Lerma-Santiago), cuenca F, subcuenca C y es el cuerpo de agua más importante que pasa por la ciudad de Tepic, capital del Estado de Nayarit (Figura 8). Nace en la vertiente sur y oeste del volcán Sangangüey a una altitud aproximada de 2,200 metros sobre el nivel del mar (msnm) y desemboca en el río Grande Santiago a una elevación de 265 msnm. Tiene un desarrollo de 70 km aproximadamente, ubicado entre las coordenadas geográficas 21° 33' y 21° 44' de latitud norte y 104° 54' y 104° 58' de longitud oeste (SEMARNAT, 2002).

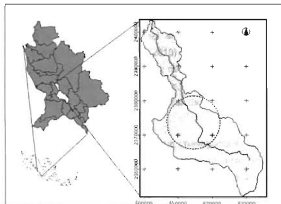


Figura 8. Ubicación geográfica del río Mololoa. Tomado de: SEMARNAT, 2002.

El agua en la subcuenca del río Mololoa presenta un deterioro general producto de la actividad antropogénica en esta zona. La Región Centro de Nayarit (7.4% de la superficie total del estado) concentra el 37.26% del total de la población en Nayarit, lo cual ocasiona un fuerte impacto en el índice de calidad del agua del río

tras su paso por la ciudad de Tepic. Esto, sumado a la insuficiencia de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, derivan en un marcado deterioro ecológico (Jáuregui *et al.*, 2007).

A su paso por la ciudad de Tepic, el río Mololoa recibe descargas de aguas residuales provenientes de la actividad municipal, descargas de tipo industrial, así como provenientes de la actividad pecuaria (Rodríguez *et al.*, 2008). Aunado a lo anterior, el río recibe las aguas de retorno agrícola de su cuenca, así como lixiviados del basurero municipal "El Ixtete" (Mondragón *et al.*, 2009), por lo que se considera que potencialmente podría ser afectado en sus aguas y sedimentos (Rodríguez *et al.*, 2008).

En la cuenca del río Mololoa se ha determinado la existencia de arsénico. Esto puede atribuirse a un aporte natural del entorno, principalmente de origen volcánico (González, 2005; Vivanco *et al.*, 2010) en concentraciones promedio de 10.81 ppm, superiores al contenido promedio de la corteza continental (1.8 ppm) (González, 2005). En consideración a lo anterior, las aportaciones de arsénico de origen antropogénico en la zona de estudio serían despreciables en comparación a las de origen natural.

Esta problemática general ha dado lugar a que investigaciones efectuadas en el sitio hayan determinado la presencia de bacterias de importancia médica y veterinaria como *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. stutzeri*, entre otras especies (Mondragón *et al.*, 2011). En estos aislados se ha detectado resistencia a arsénico y MP como mercurio, cromo, cadmio y a antibióticos como kanamicina, ciprofloxacino, gentamicina y beta-lactámicos.

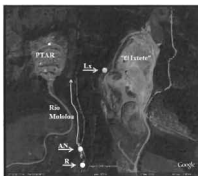
La contaminación ambiental generada por metales pesados (MP), antibióticos y otros contaminantes contribuye a la permanencia y extensión de genes de resistencia (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). Esto último puede ocurrir mediante

transferencia horizontal (como es el intercambio de plásmidos) entre bacterias no relacionadas en ambientes naturales (Kruse y Sorum, 1994). Ello da lugar a la existencia de procesos de co-selección, tales como co-resistencia (un organismo con resistencia a elementos diferentes) y resistencia cruzada (el mismo determinante genético es responsable tanto de la resistencia a antibióticos como a metales). Por lo anterior, este tipo de contaminación representa un proceso de presión selectiva persistente y generalizado que potencialmente contribuye a mantener y expandir los factores de resistencia (Baker-Austin *et al.*, 2006; Mondragón *et al.*, 2011).

En los microorganismos aislados de la zona contaminada del río Mololoa se demostró además la presencia de los genes *arsA*, *B* y *C* (Mondragón *et al.*, 2012), que cuando se expresan en un microorganismo le confieren la capacidad de sobrevivir y proliferar aún en concentraciones elevadas de arsénico (Cai *et al.*, 2009a). Algunos de ellos resultaron capaces de transferir la característica de resistencia al arsénico a cepas sensibles por medio de conjugación (Mondragón *et al.*, 2010; Mondragón *et al.*, 2011; Mondragón *et al.*, 2012), lo cual concuerda con estudios previos en cepas de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hendrick *et al.*, 1984). Con el conocimiento de este fenómeno, se explica el hecho de que se encuentren cepas bacterianas con capacidad de resistencia a metales y antibióticos en ambientes nunca antes expuestos de manera directa a estos contaminantes (Morozzi *et al.*, 1986). Incluso se ha demostrado que su presencia puede estar condicionada por los gradientes de concentración en las zonas contaminadas (Quéméneur *et al.*, 2010).

En este estudio, se trabajó con 15 cepas obtenidas en investigaciones previas realizadas en el laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit (Mondragón *et al.*, 2009, Mondragón *et al.*, 2010, Mondragón *et al.*, 2011, Mondragón *et al.*, 2012). Dichas cepas pertenecen a una colección de 300 aislados que fueron obtenidos de tres puntos distintos en la periferia del río

Mololoa. Las fuentes de colecta fueron las aguas del río (R) en las coordenadas 21°32'47.13" latitud norte y 104°53'36.35" longitud oeste, aguas negras (AN) (21°32'48.23" latitud norte y 104°53'43.04" longitud oeste) y lixiviados del basurero municipal "El Ixtete" de la ciudad de Tepic, Nayarit (Lx) (21°33'05.33" latitud norte y 104°53'30.65" longitud oeste) (Figura 9).



**Figura 9.** Sitios de muestreo. Se muestra el cauce del río Mololoa (flecha vertical). Se señalan los sitios muestreados de donde se aislaron las bacterias arsenito resistentes: AN: sitio de colecta de las aguas negras, Lx: zona de escurrimiento de lixiviados provenientes del confinamiento de basura al río, R: punto de colecta de aguas del cauce.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La presencia de arsénico en el ambiente afecta negativamente la salud humana y a los organismos que allí se encuentren. La existencia de bacterias con resistencia a arsenito y arsenato en el río Mololoa sugiere la ocurrencia de un grave problema de contaminación. Con base en esta situación, se debe visualizar la zona entera como un sistema dinámico con alta movilidad de elementos en el cual todos los organismos vivos son susceptibles de padecer los efectos adversos de estos contaminantes, lo que representa un serio problema de salud pública y ambiental. Por ello, resulta pertinente la generación de conocimiento acerca de los mecanismos biológicos por los cuales las bacterias han adquirido y desarrollado capacidad de resistencia, dado que poseen potencial para ser aplicados como biorremediadores en tareas que consideren el saneamiento y rescate del cauce. En este sentido, la presente investigación buscó la identificación y análisis del gen *arsB* en bacterias aisladas del lugar bajo la premisa de que dicho gen es responsable del fenotipo arsenito-resistente.



## 4. HIPÓTESIS

Las proteobacterias resistentes a arsénico aisladas del río Moloica poseen el gen *aoxB*, homólogo a las secuencias ya reportadas.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar las secuencias del gen *aoxB* en una colección de proteobacterias resistentes a arsénico.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Identificar la presencia del gen *aoxB* en proteobacterias arsenito-resistentes
- ▶ Secuenciar los productos amplificados por los cebadores para el gen *aoxB*
- ▶ Analizar las secuencias obtenidas con las reportadas en las bases de datos para determinar el grado de similitud

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En esta investigación se estudiaron 14 cepas de las reportadas con características fenotípicas y genotípicas de resistencia tanto a arsenato como a arsenito (Mondragón *et al.*, 2012). La identificación bacteriana de estos aislados se realizó por el sistema automatizado MicroScan® (Cuadro 3) (Mondragón *et al.*, 2009; Rodríguez, 2010).

**Cuadro 3. Identificación y sitios de aislamiento de las especies bacterianas utilizadas en este estudio.**

Cepa	Especie	Sito de aislamiento	Cepa	Especie	Sito de aislamiento
C4	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	C20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN
C5	<i>Enterobacter</i> sp.	R	C21	<i>Achromobacter ureae</i>	Lx
C8	<i>Achromobacter</i> sp.	R	C23	<i>Escherichia coli</i>	AN
C10	<i>Enterobacter</i> sp.	R	C81	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN
C12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	C95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R
C14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	C97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN
C16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	C123	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AN
C19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN			

El número de cepa es el asignado en la colección de respaldo del Laboratorio de Resistencia Bacteriana (AN: Aguas Negras, Lx: Lixiviados del basurero municipal "El Ixtete" y R: Agua corriente del río).

## 6.2 CRECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Para el crecimiento y mantenimiento de las cepas se tomaron muestras a partir del stock congelado con puntilla estéril, se crecieron en 3.0 mL de caldo Luria Bertani (LB, marca Difco®) a 37 °C con agitación constante por 18 horas y se inocularon en agar nutritivo con NaAsO<sub>2</sub> 3 mM para corroborar que se tratara de cultivos axénicos. Para su conservación se tomaron colonias aisladas, se crecieron y mantuvieron en caldo LB con 20% glicerol a -20 °C hasta su uso.

## 6.3 ESTRATEGIA DE TRABAJO

Se realizaron pruebas fenotípicas consistentes en la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en placas de agar nutritivo, y-capacidad arsenito-oxidante con el método de AgNO<sub>3</sub> (Figura 10) (Branco *et al.*, 2009).

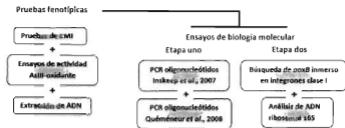


Figura 10. Esquema de la estrategia experimental utilizada en este estudio.

### 6.3.1 PRUEBAS FENOTÍPICAS Y EXTRACCIÓN DE ADN

#### a) PRUEBAS DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de un compuesto que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación (Madigan *et al.*, 2004). Mediante esta prueba se evaluó el fenotipo arsenito-resistente de las 15 cepas en estudio en términos cuantitativos.

Cada una de las cepas fue cultivada en caldo Luria Bertani (LB) adicionado con  $\text{NaAsO}_2$  3 mM a 37 °C por 18 h de incubación con agitación constante a 125 rpm (Incubator Digital Microprocessor Model 10-140E QuincyLab®). Se prepararon cajas de agar nutritivo adicionadas con arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) a las siguientes concentraciones: 0 (control), 2, 6, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 mM. Cada caja fue inoculada con 10  $\mu\text{L}$  del cultivo en caldo previamente descrito (crecido a una densidad óptica de 0.7) de cada una de las 15 cepas (diluciones previas 1:100 en LB estéril) con la ayuda de plantillas (Figura 11) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

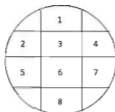


Figura 11. Plantilla empleada en la técnica de CMI. Se coloca debajo de la caja de agar nutritivo como referencia al inocular, para lo cual se aprovecha la transparencia del medio.

#### b) PRUEBA DE CAPACIDAD ARSENITO-OXIDANTE

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de las cepas de estudio para oxidar el arsenito a arsenato. Para ello, se empleó el método de  $\text{AgNO}_3$  descrito por Branco *et al.*, 2009, el cual se detalla a continuación: se sembraron las cepas en caldo nutritivo estéril con  $\text{NaAsO}_2$  3 mM y se crecieron hasta una DO de 0.7 a 37 °C a 125 rpm y se inocularon 10  $\mu\text{L}$  de cada cultivo en placas de agar nutritivo con  $\text{NaAsO}_2$  3 mM, se incubaron 24 horas a 37 °C y se embebieron de forma homogénea con 1 mL de solución 0.1 M de  $\text{AgNO}_3$ , se incubaron por otras 24 horas a 37 °C y se retiraron de la estufa para visualizar el resultado. Un color marrón reveló la presencia de arsenato, mientras un color paja indicó que el arsenito no se oxidó. Como controles se prepararon cajas con  $\text{NaAsO}_2$  3 mM y  $\text{AgNO}_3$  0.1 M sin inóculo bacteriano y cajas con  $\text{NaAsO}_2$  3 mM sin  $\text{AgNO}_3$  con inóculo.

#### c) ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de las pruebas fenotípicas fueron analizados mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y  $\chi^2$ , para lo cual se utilizó el programa stata<sup>®</sup> versión 8.1 y el analizador de datos PSPP versión 0.7.8 B20110902 de IBM<sup>®</sup>, respectivamente. Se evaluaron las variables: sitio de aislamiento y actividad arsenito-oxidante, sitio de

aislamiento y CMI, sitio de aislamiento y especie y actividad arsenito-oxidante y grado de resistencia, respectivamente. Para las evaluaciones se fijó un nivel de significancia  $P(\alpha)$  de 0.05.

#### *d) EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO*

Se realizó la extracción de ADN total bacteriano de todas las cepas por el método de choque térmico, descrito a continuación. En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se colocaron 50  $\mu$ L de agua inyectable, se agregó una asada de tres colonias aisladas y se agitó en vórtex. La muestra se mantuvo a 96 °C por diez minutos, seguido de cinco minutos a -20 °C (se repitieron ambos pasos dos veces). Posteriormente, se centrifugó durante tres minutos a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se hizo una dilución 1:10, y se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para la realización de las pruebas de PCR se trabajó con grupos de ADN de 3 cepas a la vez.

#### *6.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)*

Las cepas que mostraron fenotipo de oxidación del arsenito, se usaron en la búsqueda del gen *soxB* como respuesta genotípica del comportamiento. Con base en lo anterior, se llevaron a cabo los ensayos de biología molecular consistentes específicamente en pruebas de PCR, con una estrategia planteada en dos etapas (Figura 10). El cuadro 4 muestra los oligonucleótidos empleados para tal efecto y el tamaño de los fragmentos esperados.

Cuadro 4. Características de los oligonucleótidos empleados en esta investigación.

Oligonucleótido	Secuencia	pb	Referencia
<i>AoxBF</i>	GTSGGBTGYGGMTAYCABGYCTA	500	Inskeep et al., 2007
<i>AoxBR</i>	TTGTASGCBGGNCGRTRTRGRAT		
<i>aoxBM1-2F</i>	CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA	1,100	Quéméneur et al., 2008
<i>aoxBM3-2R</i>	TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYTC		
<i>Inf1F</i>	CCTCCCGCACGATGATC	Variable	Li et al., 2006
<i>qacED1R</i>	AAAGGCAGCAATTATGAG	Variable	Bass et al., 1999
rADN 16S pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 1.5 kpb	Hutson et al., 1993
rADN 16S pH*	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		

• ETAPA UNO

Comprendió las pruebas de PCR enfocadas a la identificación directa del gen *aoxB* mediante el uso de dos distintos pares de oligonucleótidos:

a) Empleo de los Oligonucleótidos diseñados por Inskeep et al., 2007

Se evaluó la presencia del gen *aoxB* por PCR, para lo cual se emplearon los oligonucleótidos diseñados por Inskeep et al., 2007. Cada reacción de PCR contenía en un volumen final de 25  $\mu$ L: 3  $\mu$ L de ADN de 3 cepas distintas (1 $\mu$ L

/cepa), 2.5  $\mu$ L de buffer 10X (Tris-HCl 10 mM pH 8 y KCl 50 mM), 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ L de dNTP's 2.5 mM, 0.1  $\mu$ L de Taq polimerasa Invitrogen® (5U/  $\mu$ L) y 2.5  $\mu$ L de cada iniciador en una concentración de 10 pM, ajustados a 25  $\mu$ L con agua destilada desionizada estéril (H<sub>2</sub>O<sub>de</sub>).

Las condiciones en que estas pruebas se realizaron comprendieron a) un ciclo inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C b) 9 ciclos de: 45 segundos de desnaturalización a 95 °C, 45 segundos de hibridación a 50 °C, y 50 segundos de extensión a 72 °C, seguidos de c) 25 ciclos con 45 segundos de desnaturalización a 95 °C, 45 segundos de hibridación a 46 °C y 50 segundos de extensión a 72 °C, con un paso final de d) extensión de 5 minutos a 72 °C que disminuyó a 4 °C hasta que los tubos fueron retirados del termociclador (eppendorf® AG 22331 Hamburg).

#### *b) Empleo de los Oligonucleótidos diseñados por Quémèneur et al., 2008*

Se realizaron ensayos de PCR con empleo de los oligonucleótidos diseñados por Quémèneur *et al.*, 2008. El volumen final de cada reacción (preparadas en tubos eppendorf® de 0.2 mL) fue de 25  $\mu$ L: 3  $\mu$ L de ADN de 3 cepas (1  $\mu$ L/cepa), 2.5  $\mu$ L de buffer 10X de la Taq polimerasa (Tris-HCl 10 mM pH 8 y KCl 50 mM), 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ L de dNTP's (Invitrogen®) 2.5 mM, 0.1  $\mu$ L de Taq polimerasa invitrogen® (5 U/  $\mu$ L) y 2.5  $\mu$ L de cada iniciador 10 pM, ajustados a 25  $\mu$ L con agua destilada desionizada estéril (H<sub>2</sub>O<sub>de</sub>).

Las condiciones de temperatura en que se llevaron a cabo las pruebas de PCR constaron de 4 minutos a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 52 °C y 1 minuto y diez segundos a 72 °C, seguidos de una extensión final de 72 °C por 5 minutos, para finalmente bajar a 4 °C hasta retirar los tubos del termociclador.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1 % en TAE a 100 V durante 90 min en cámara de electroforesis Thermo Scientific 240616® con

utilización de TAE 1X como buffer y el marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). Las muestras se corrieron en volúmenes de 15 µL mezclados con 1.5 µL de Nucleic Acid Sample Loading Buffer® 5X de BioRad® y visualizadas en un transiluminador de luz UV BENCHTOP UV 011810-001® con previa tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Tras su visualización la imagen del gel fue digitalizada para efectos de archivo con el equipo fotográfico propio del transiluminador. Como control de las pruebas de PCR se amplificó el gen *arsC* en el ADN de la cepa *E. coli* C23, que formó parte del grupo de prueba de este estudio y cuya posesión de genes *ars* se determinó en estudios previos (Mondragón et al., 2012).

Los amplicones generados tras la amplificación fueron cortados del gel de agarosa con ayuda de una espátula. El amplicón se purificó de acuerdo al procedimiento del High Pure PCR Product Purification Kit® de Roche® en base a las instrucciones del fabricante. La concentración de los amplicones purificados se determinó en el analizador Biotek® en la modalidad Take3® para posteriormente ser secuenciados en la unidad UBIPRO de la Escuela de Estudios Superiores de Iztacala (UNAM).

- **ETAPA DOS**

- a) **BÚSQUEDA DEL GEN *aoxB* EN INTEGRONES CLASE I**

Estas pruebas se llevaron a cabo con base en el siguiente razonamiento: si el gen *aoxB* se sitúa dentro de una secuencia integrónica, su amplificación sería posible con los oligonucleótidos dirigidos a dicho gen en combinación con los que se aparean con regiones constantes conservadas del integrón. La hipótesis anterior se esquematiza en la Figura 12:



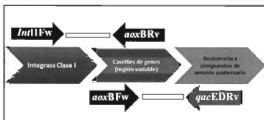


Figura 12. Planteamiento de las pruebas de PCR realizadas con los oligonucleótidos dirigidos a las secuencias conservadas *Int1* y *qacED* del Integrón Clase I en combinación con los oligonucleótidos para el gen *aoxB*.

De acuerdo al planteamiento referido se utilizaron los oligonucleótidos de Inskip *et al.*, 2007 y Quéméneur *et al.*, 2008 en combinación con los dirigidos a la integrasa tipo I y la región de resistencia a compuestos cuaternarios de amonio de secuencias integrónicas (Li *et al.*, 2006; Bass *et al.*, 1999). Lo anterior se realizó con el fin de determinar la presencia del gen como parte de la estructura de Integrónes clase I, de manera similar a lo que se ha reportado con los genes del operón *mer* (Bass *et al.*, 1999), los cuales se pueden encontrar en regiones genéticas inmediatas a Integrónes dentro de un transposón, como *Tn21* (Liebert *et al.*, 1999).

Se utilizó el oligonucleótido *Int11Fw* (Li *et al.*, 2006) y el oligonucleótido *qacED1R* descritos por Bass *et al.*, 1999 en combinación con los oligonucleótidos dirigidos al gen *aoxB*. Esto con el fin de obtener fragmentos que brindaran información acerca de la presencia del gen *aoxB*, así como de su contexto genético dentro del Integrón Clase I.

Se evaluaron distintas condiciones de temperatura de alineamiento con objeto de ampliar las probabilidades de éxito en la amplificación de algún fragmento: a) las condiciones iniciales constaron de 4 minutos de desnaturalización a 94 °C, seguidos de b) 35 ciclos de 40 segundos de desnaturalización a 94 °C, 40

segundos de alineamiento a 57 °C y 3 minutos de extensión a 72 °C, con una extensión final de c) 5 minutos a 72 °C, hasta descender a 4 °C hasta que los tubos se retiraron del termociclador. Otras condiciones constaron de un gradiente de temperatura de alineamiento desde 55 a 62 °C, además de que se realizaron pruebas con rampa, las cuales consistieron en a) una temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 minutos, seguidos de b) 5 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineamiento a 56 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C, que de ahí pasó a c) 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto de alineamiento a 58 °C y 2 minutos de extensión a 72 °C (a pesar de desconocerse el tamaño de fragmento, se fijaron 2 minutos, uno por cada mil pb), con extensión final de d) 4 minutos a 72 °C que finalmente disminuyó a 4 °C hasta retirar los tubos del termociclador.

#### **b) SELECCIÓN DE CEPAS PARA ANÁLISIS DE $r\text{ADN } 16\text{S}$**

Se seleccionaron cuatro cepas para determinar su especie mediante el análisis de sus secuencias de  $r\text{ADN } 16\text{S}$ . Las cepas seleccionadas se habían identificado previamente por MicroScan® como *E. cloacae* C4, *K. pneumoniae* C12, *E. aerogenes* C16, y *K. pneumoniae* C81. Estas presentaron actividad arsenito-oxidante y los valores más elevados de CMI de AsIII, por lo cual se aislaron en medio sólido y se les extrajo ADN total mediante el empleo del kit ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep®.

#### **c) ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN RIBOSOMAL 16S**

Se utilizaron los oligonucleótidos pA y pH\* publicados por Hutson *et al.*, 1993. La concentración final de cada reactivo fue: buffer de la Taq polimerasa (Invitrogen®) 1X,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, dNTP's mix 0.2 mM, oligo pA 0.5 mM, oligo pH 0.5 mM, Taq polimerasa (Invitrogen®) 0.03 U/ $\mu\text{L}$ , templado de ADN 1 ng/ $\mu\text{L}$  y el resto fue completado con agua inyectable para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

Las condiciones en que se llevaron a cabo las reacciones constaron de a) 95 °C por cuatro minutos seguidos de b) 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos y 72 °C por un minuto con una extensión final de c) 72 °C por 5 minutos, para finalmente disminuir a 4 °C hasta que los tubos fueron retirados. El fragmento esperado era de alrededor de 1.6 kb, y una vez obtenidos los productos amplificados se enviaron a la empresa Macrogen en Seúl, Corea del Sur para su secuenciación.

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, fueron analizados y tratados con el programa Chromas versión 2.4.1<sup>®</sup> para la depuración de extremos erróneos con base en los ferogramas recibidos. Las secuencias anotadas fueron comparadas de acuerdo al BlastN de la base de datos del NCBI en los seis marcos abiertos de lectura (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se trabajó un total de 14 proteobacterias con fenotipo resistente a arsénico. Esta característica también ha sido reportada en cepas del género *Pseudomonas*, el cual pertenece a las proteobacterias, pero se ubica en una unidad taxonómicamente distinta a las enterobacterias, la familia *Pseudomonadaceae* (Quéméneur *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2009b; Heinrich-Salmeron *et al.*, 2011). Lo anterior se corresponde con el hecho de que la inmensa mayoría de las bacterias arsénico oxidantes aisladas de sitios mesófilos pertenecen al phylum *Proteobacteria* (Quéméneur *et al.*, 2008).

### 7.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Los resultados de esta prueba mostraron que los valores de CMI de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) en las cepas de estudio se encuentran entre 2 y 15 mM (Cuadro 5); las 15 cepas crecieron en  $\text{As(III)}$  2mM, mientras que de las mismas 15 sólo doce crecieron en  $\text{As(III)}$  6mM, de las cuales nueve en  $\text{As(III)}$  10mM y seis en  $\text{As(III)}$  12mM, tres en  $\text{As(III)}$  14 mM y de estas tres, únicamente dos en  $\text{As(III)}$  15 mM. Las cepas *E. coli* C23 y *K. pneumoniae* C81 resultaron ser las más resistentes a arsenito de sodio en todo el grupo de prueba (Figura 13).

**Cuadro 5. Resultados de las pruebas de CMI de arsenito y actividad arsenito-oxidante.**

Cepa	Especie	Sitio de aislamiento	CMI de arsenito	Actividad arsenito-oxidante
C4	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	12 mM	Si
C5	<i>Enterobacter</i> sp.	R	12 mM	Si
C8	<i>Achromobacter</i> sp.	R	6 mM	No
C10	<i>Enterobacter</i> sp.	R	10 mM	Si
C12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	14 mM	Si
C14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	6 mM	No
C16	<i>Enterobacter aerogenes</i>	R	12 mM	Si
C19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	2 mM	No
C20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	10 mM	Si
C21	<i>Actinobacillus ureae</i>	Lx	2 mM	No
C23	<i>Escherichia coli</i>	AN	15 mM	No
C81	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	15 mM	Si
C95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	10 mM	Si
C97	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	2 mM	No
C123	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AN	6 mM	No

(AN: Aguas Negras; Lx: Lixiviados del basurero municipal "El Ixtete";

R: Agua corriente del río). El número de cepa es el asignado en la colección.

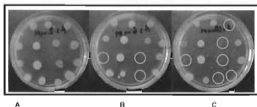


Figura 13. Pruebas de GMI de arsenito realizadas a las 15 cepas de estudio. Circulos en amarillo señalan los inóculos que dejaron de presentar crecimiento conforme aumentó la concentración de arsenito. A) 2 mM, B) 6 Mm y C) 10mM. Los ensayos se efectuaron por triplicado.

## 7.2 ACTIVIDAD ARSENITO-OXIDANTE

Las cepas con actividad arsenito-oxidante (Figura 14) fueron: *E. cloacae* C4, *Enterobacter* sp. C5, *Enterobacter* sp. C10, *K. pneumoniae* C12, *E. aerogenes* C16, *K. pneumoniae* C20, *K. pneumoniae* C81 y *K. pneumoniae* C95 (Cuadro 5).

Se realizó un análisis de Kruskal-Wallis para establecer si hay diferencia en la capacidad de resistencia entre las bacterias arsenito-oxidantes y las que no lo son. Se encontró que hay diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0177$ ) entre los grupos. Esto sugiere que pudiera haber una relación fenotípica en la cual la actividad arsenito-oxidante está implicada en la capacidad de resistencia al As(III).

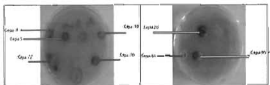


Figura 14. Cultivos con  $\text{NaAsO}_2$  y  $\text{AgNO}_3$  para evaluar actividad arsenito-oxidante. La coloración café de los inóculos indica la conversión de arsenito a arsenato.

Por otro lado, las cepas que alcanzaron un nivel de resistencia  $\geq 10$  mM (*E. cloacae* C4, *E. sp.* C5, *E. sp.* C10, *K. pneumoniae* C12, *E. aerogenes* C16, *K. pneumoniae* C20, *E. coli* C23, *K. pneumoniae* C81 y *K. pneumoniae* C95) presentaron también actividad arsenito-oxidante, con excepción de la cepa *E. coli* C23.

La implicación de la actividad arsenito-oxidante en el fenotipo arsenito-resistente observado en este estudio concuerda con los resultados descritos en *H. arsenicoxydans* cepa ULPAs1  $\Delta^{soxB}$ , la cual disminuye su capacidad de resistencia al arsénico de 5 mM a 2.66 mM debido al silenciamiento de *soxB* con un transposon reportero basado en *lacZ* (Muller *et al.*, 2003).

La capacidad de oxidar el arsénico a arsenato no es condición esencial para que se presente resistencia a elevadas concentraciones de arsénico, dado que existen cepas que no oxidan ni reducen al arsénico, ni lo convierten en arsenicales orgánicos (Phillips y Taylor, 1976). Estos comportamientos tienen lugar gracias a sistemas transmembranales expulsores de arsénico que no involucran cambio alguno del estado de oxidación, tales como los productos de la expresión de los genes A y B del operón *ars* (Dey y Rosen, 1995; Saltikov y Olson, 2002; Ordóñez *et al.*, 2005), así como los transportadores Acr3p tipo I y II (Rosen, 1999; Cai *et al.*, 2009a).

En el caso particular de la cepa *E. coli* C23, que al igual que la cepa *K. pneumoniae* C81 presentó el máximo valor de resistencia al arsénico (15 mM) pero no mostró actividad de arsenito-oxidasa, la resistencia puede atribuirse a la presencia previamente determinada de los genes *arsABC* (Mondragón *et al.*, 2012). Sin embargo, este valor máximo se encuentra por debajo al reportado por Butt y Rehman, 2011, para la cepa *K. pneumoniae* y *K. variicola* resistentes a concentraciones 26 y 24 mM de arsénico respectivamente con resultado positivo a la prueba de determinación de actividad arsenito oxidante de AgNO<sub>3</sub>.

Tras realizar las pruebas de  $\chi^2$ , no se encontró evidencia estadística significativa de que la actividad arsenito oxidante, los valores de CMI o la predominancia de alguna especie en particular tengan alguna variación conforme al sitio de aislamiento ( $\chi^2_{calculada} = 3.62 < \chi^2_{tabla} = 5.99$ ,  $\chi^2_{calculada} = 12.50 < \chi^2_{tabla} = 18.31$  y  $\chi^2_{calculada} = 21.98 < \chi^2_{tabla} = 23.68$ , respectivamente).

### 7.3 IDENTIFICACIÓN DEL GEN *noxB*

#### 7.3.1 BÚSQUEDA DEL GEN CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DESCRITOS POR INSKEEP *et al.*, 2007

Las pruebas de PCR llevadas a cabo con este par de oligonucleótidos en las condiciones descritas por Inskeep *et al.*, 2007 no resultaron en la amplificación de algún fragmento. Por ello se realizó una serie de modificaciones con la finalidad de favorecer la amplificación. Dichos cambios consistieron en la realización de pruebas con gradiente de  $MgCl_2$  y uso de DMSO al 0.5 %, variación de las temperaturas de alineamiento (48, 50, y 52 °C), además de que se llevó a cabo un gradiente de temperatura de alineamiento desde 48 hasta 62 °C.

Estas modificaciones dieron lugar a la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1,900 pb que se generó con temperaturas de alineamiento que fueron desde los 52 °C hasta los 65 °C (Figura 15) y que fue persistente aun cuando se utilizaron templados distintos de ADN. Sin embargo, cuando se sometió a reamplificación ya no se obtuvo. Esta consideración aunada a la diferencia de tamaño con el fragmento esperado, el resultado se consideró un artefacto de la PCR.

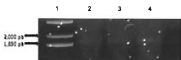


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR con ADN de la cepa 16. Carril 1: marcador de peso molecular (MPM) 1 Kb Plus DNA Ladder. Carril 2: Banda de 1.9 kb generada a 60°C. Carril 3: Banda de 1.9 kb generada a 62°C. Carril 4: Banda de 1.9 kb generada a 65°C.

### 7.3.2 BÚSQUEDA DEL GEN CON UTILIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DESCRITOS POR QUÉMÉNEUR *et al.*, 2008.

Las condiciones de PCR descritas en la metodología para este par de oligonucleótidos no dieron lugar a la amplificación de fragmento alguno. Por ello, al igual que con el par anterior de oligonucleótidos, se realizaron modificaciones en las pruebas con el fin de propiciar el alineamiento. Los cambios consistieron en la realización de curvas de  $MgCl_2$  (1, 1.25, 1.5, 2 y 2.5 mM), uso de Taq Platinum® y uso del kit Platinum® Blue PCR Super Mix, con las temperaturas de alineamiento: 48, 52, 54, 56, 58 y 62 °C.

En las pruebas de PCR donde se empleó el kit Platinum® Blue PCR Super Mix no se obtuvo bandeo alguno. En las realizadas de manera convencional a 58 °C con aumento en la cantidad de Taq Platinum® de 1 U a 2 U por cada 50  $\mu$ L de reacción en el grupo de ADN de las cepas *E. cloacae* C4, *E. sp.* C5 y *A. sp.* C8 como templado, se obtuvieron productos con tamaños de menos de 100, 470 y 670 pb aproximadamente (Figura 16A). Estas bandas fueron extraídas y purificadas del gel de agarosa mediante el empleo del kit High Pure PCR Product Purification Kit® de Roche® (Figura 16B) y posteriormente reamplificadas por PCR en las mismas condiciones, donde resultó amplificada sólo la banda de aproximadamente 670 pb (Figura 16C).



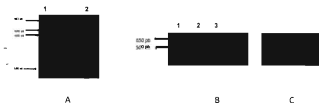


Figura 16: Corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en TAE. A: Carril 1: marcador de peso molecular (MPM) 1 Kb Plus DNA Ladder. Carril 2: Bandas de 100, 470 y 670 pb aproximadamente amplificadas con los oligonucleótidos de Quémeneur *et al.*, 2008; B: Carril 1: marcador de peso molecular (MPM) 1 Kb Plus DNA Ladder. Carril 2: Purificación del ADN de la banda de 470 pb. Carril 3: Purificación del ADN de la banda de 670 pb; C: Carril único: Reamplificación por PCR de la banda de 670 pb.

Como resultado de la secuenciación del producto amplificado por PCR de aproximadamente 670 pb se obtuvo una secuencia de 640 pb. Dicha secuencia se convirtió a secuencia de aminoácidos con el programa ClustalW y se comparó con las reportadas en la base de datos Non-redundant protein sequences del NCBI®. El porcentaje máximo de identidad fue de 80 % con un e-value de  $2 \cdot 10^{-27}$  y un coverage de 30 % para un dominio de corte/metilación N-terminal de una proteína tipo prelipina de *Enterobacter cloacae* subespecie NCTC 9394 y en menor grado con otras secuencias afines (Figura 17).

Description	Seq. score	Time	Query cover	E	bits	Accession
...[...]	111	00	30%	2e-27	87%	U01222.1
...[...]	110	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	110	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	109	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1
...[...]	108	00	30%	3e-27	87%	U01222.1

Figura 17. Resultado del BLASTp® entre la secuencia de aminoácidos obtenida de la secuencia de 640 pb y las secuencias reportadas en la base de datos Non-redundant protein sequences del NCBI. Análisis realizado con la secuencia ORF-1. El análisis de la secuencia ORF-2 indica relación con la misma proteína.

Esta secuencia (640 pb) se alineó mediante el uso del programa ClustalW2 con la secuencia reportada por Cai *et al.*, 2009b para el gen *aoxB* (subunidad Mo-pterina, 827 aa) de 2484 nucleótidos en *Achromobacter* sp. Cepa SY8 (Número de acceso NCBI: ABP63660.1. GI: 145321185) y mostró escasas regiones cortas con un mínimo grado de conservación a lo largo de los 2484 nucleótidos de la secuencia con la cual se comparó. La secuencia empleada como referencia fue elegida por su homología con la mayoría de secuencias reportadas para *aoxB*.

Dada la escasa identidad entre la secuencia obtenida y la secuencia *aoxB* usada como referencia para el alineamiento, la falta de relación estructural y metabólica de la proteína tipo prenilina con la enzima arsenito oxidasa y la diferencia de tamaño entre el fragmento obtenido (640 pb) y el esperado al emplear los oligonucleótidos descritos por Quéméneur *et al.*, 2008 (1,100 pb), se pudo afirmar que el bandedo obtenido en la PCR carecía de relación con secuencias tipo *aoxB* o relacionadas.

Aun cuando las evidencias fenotípicas de resistencia a arsénico, arsenato y actividad arsenito-oxidante en las cepas de estudio sugieren la existencia de la enzima arsenito oxidasa, no se identificó el gen *aoxB* con los oligonucleótidos reportados para tal propósito. Sin embargo, existen reportes de cepas arsenito-oxidantes en cuyo genoma no se encontraron los genes *aoxB*, como las cepas arsenito oxidantes *Alkalitimonicola ehrlichii*-MLHE-1 y *Azoarcus* sp. DAO1 (Rhine *et al.*, 2007). En base a ello, se sugirió que la capacidad arsenito oxidante de *A. ehrlichii* se debía probablemente a la presencia de una proteína semejante a la arsenato reductasa respiratoria (ArrA) (Hoeft *et al.*, 2007). Se propone que ArrA presenta capacidad oxidadora a través de un flujo de electrones reverso, cualidad opuesta a la forma conocida. Posteriormente, Kulp *et al.*, 2008 reportó un aislado con capacidad arsenito-oxidante en ausencia del gen *aoxB* y atribuye la función oxidadora a ArrA, ya que obtuvo un amplicón con un ~68 % de identidad a la secuencia de su gen correspondiente descrito en *A. ehrlichii*.

Otra evidencia de mecanismos de oxidación ajenos a la presencia del gen *aoxB* es la reportada en *A. ehrlichii* cepa MLHE-1 por Zargar *et al.*, 2010, quien identificó un "nuevo" tipo de arsenito oxidasa con mayor relación filogenética a las enzimas arsenato reductasas respiratorias ArrAB que a las arsenito oxidasas AoxAB, cuyos genes inicialmente denominó *mig\_0216* y posteriormente *arxA*. La identificación de estos genes como una arsenito oxidasa alternativa abrió nuevas posibilidades para reexaminar por qué ciertas cepas arsenito oxidantes han eludido la detección por PCR de arsenito oxidasas tipo *aoxB* (Zargar *et al.*, 2010).

Los análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas de dicho operón confirman que pertenecen a un grupo de arsenito oxidasas distinto de AoxAB y ArrAB dentro de la misma familia de enzimas DMSO reductasas, y se cree que podrían haber estado sujetas a procesos de transferencia genética horizontal (Zargar *et al.*, 2012).

Para la oxidación del arsenito en condiciones anóxicas las bacterias han acoplado tanto la reducción como oxidación de compuestos de arsénico para su supervivencia y la conservación de energía y crecimiento (Zargar *et al.*, 2010). No obstante, el desarrollo de tales mecanismos podría estar limitado a condiciones específicas como una medida adaptativa en ese grupo de microorganismos en particular.

Resulta improbable que la falta de amplificación en las pruebas de PCR sea consecuencia de variaciones en la secuencia genética del gen *aoxB*. Aun cuando las secuencias codificantes han estado sujetas a variaciones como una respuesta a las condiciones del entorno, existe un grado variable de conservación entre diferentes especies (38.4 a 96.8 % de identidad según resultados de Quémèneur *et al.*, 2008; resultados de: Santini y Vanden Hoven, 2004, Inskeep *et al.*, 2007, Branco *et al.*, 2009, Cai *et al.*, 2009b, Clingenpeel *et al.*, 2009 y Osborne *et al.*, 2013 manejan porcentajes de identidad dentro de este rango).

La aseveración de que la falta de amplificación no obedece a variaciones en la secuencia de *aoxB* se robustece si además del grado de conservación se considera que el primer set de oligonucleótidos empleado en esta investigación (publicado por Inskeep *et al.*, 2007) fue diseñado dada la conservación de secuencias específicas de *aoxB* con diferenciación de los demás miembros de la familia DMSO reductasas, y que el segundo set utilizado (publicados por Quéménéur *et al.*, 2008) fue probado en el mismo estudio en ensayos de PCR con ADN de 10 cepas no arsenito-oxidantes, de las cuales 6 poseían una molibdoenzima de la familia DMSO.

#### 7.4 BÚSQUEDA DEL GEN *aoxB* INMERSO EN INTEGRONES CLASE I

Los pruebas de identificación del gen *aoxB* dentro del contexto genético de un Integrón Clase I cuando se utilizaron los oligonucleótidos *IntI1Fw* + *AoxBRv* no dieron lugar a la amplificación de algún fragmento de ADN relacionado a *aoxB*.

Las pruebas realizadas con el oligonucleótido *qacEDRv* (Bass *et al.*, 1999) en combinación con *aoxBFw* no amplificaron fragmento alguno, por lo cual se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento de 55, 58, 60 y 62 °C así como una rampa de temperatura con los mismos reactivos y templados de ADN y no se tuvo éxito en la amplificación de algún fragmento de ADN en las cepas de estudio.

En este sentido, el único estudio en el cual se ha determinado un marco abierto de lectura parcial para integrasa en el mismo contexto genético que el gen *aoxB* lo comprende los trabajos de Osborne *et al.*, 2013, quienes encontraron secuencias que comparten homología con integrasas de fago putativas de varias *betaproteobacterias*, aunque es poco probable que fueran funcionales (Osborne *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que en el ADN de las cepas en estudio el gen *aoxB* no se encuentra inmerso en un integrón, lo cual no implica que el gen no esté presente en su genoma.

La ausencia de amplificación podría deberse a que estos microorganismos empleen un mecanismo enzimático distinto del sistema *aox* para la oxidación de arsénito. Estudios recientes de expresión de genes en concentraciones elevadas de arsénico demuestran la posibilidad de que se lleven a cabo procesos exaptativos que involucren diferentes mecanismos con proteínas propias para lograr la resistencia bacteriana a arsénico. Ejemplos de estos procesos son: transporte (miembros de la familia de transportadores MFS), biogénesis de membrana (diacyl-glicerol-kinasa (DAGK) y fosfolípido fosfatasa (PAP)), maduración post-transcripcional de tRNAs (Queuosina), respuesta al estrés (chaperona ClpB) y reparación de ADN (ADN glucosilasa) (Morgante y González, 2013).

## 7.5 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE rADN 16S

Como ya se mencionó, de las 15 cepas utilizadas en este estudio (las cuales presentan grados variables de resistencia a AsIII y AsV), 8 mostraron capacidad arsenito oxidante. A pesar de esto, en las pruebas de PCR no se identificó el gen *aoxB* como responsable de dicha actividad. Es preciso conocer el sistema biológico por el cual se observa este comportamiento. Una opción metodológica por la cual se podría abordar esta cuestión sería la secuenciación de genoma y posterior comparación con las bases de datos de genomas completos reportados. Para ello, es necesario la determinación específica de la especie cuyo genoma será secuenciado, para, de esta forma, asegurar que el genoma anotado corresponda a especies reportadas previamente. Lo anterior para tener un punto de comparación y encontrar la o las secuencias que pudieran ser responsables de la oxidación de arsénito.

Por esta razón, se seleccionaron las cepas C4, C12, C16 y C81, por ser las que presentaron actividad arsenito-oxidante y los valores más altos de CMI de arsenito. Se analizaron sus secuencias de rADN 16S con la finalidad de llevar a cabo en investigaciones posteriores la secuenciación del genoma completo de una de ellas y buscar secuencias relacionadas al gen *aoxB* o a proteínas conocidas o nuevas con facultad de llevar a cabo la oxidación del arsenito.

El corrimiento electroforético de los productos de las pruebas de PCR con los oligonucleótidos dirigidos a secuencias de ADN ribosomal 16S se muestran en la figura 18. Las secuencias resultadas de la secuenciación de 738 y 693 pb correspondientes a las cepas C4 y C16 respectivamente presentaron un porcentaje de identidad del 99 % con *Enterobacter cloacae* cepa Z9 No. de acceso KF429496.1 y 97 % con *Enterobacter hormaechei* cepa PS53C No. de acceso JX294308.1. Esto es, ambas cepas corresponden al género *Enterobacter* (cuadro 6).

Los análisis de las secuencias para C12 y C81, mostraron una identidad del 99 y 92% respectivamente con *K. pneumoniae* (Cepas SW, No. de acceso AB641122.1) y NW115, (No. de acceso JF915362.1) (cuadro 6). Esto se logró mediante comparación con las secuencias reportadas en las bases de datos: Nucleotide collection, NCBI Genomes (Chromosome), Reference genomic sequences (refseq\_genomic), 16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archea) y Reference RNA sequences (refseq\_ma) del National Center for Biotechnology Information (NCBI®).



Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular (MPM) 100 pb. Carril 2: ADN cepa 4. Carril 3: ADN cepa 12. Carril 4: ADN cepa 16. Carril 5: ADN cepa 81. Carril 6: control negativo (-ADN). Carril 7: control positivo.

Cuadro 6. Tamaño y porcentaje de los fragmentos rADN 16S secuenciados. Se muestran los porcentajes de los fragmentos anotados, respecto a la longitud del amplicón (1,500 pb).

Cepa	Tamaño resultado de la secuenciación	% respecto al tamaño esperado	Porcentaje de identidad
<i>E. cloacae</i> C4	738	49.2	99
<i>K. pneumoniae</i> C12	976	65.0	99
<i>E. aerogenes</i> C16	693	46.2	97
<i>K. pneumoniae</i> C81	1015	67.6	92

La confirmación de especie de las cuatro cepas seleccionadas resulta de mucha utilidad para decidir el genoma a secuenciar en investigaciones posteriores. Sin embargo, el hecho de que los porcentajes de recuperación con respecto al amplicón hayan sido tan bajos es un inconveniente. Esto porque si se considera que la estrategia de amplificación produjo fragmentos de 1,500 pb (que representa un 97 % aproximadamente del total de la secuencia primaria de rARN 16S (Hutson *et al.*, 1993)) y de los mismos se recuperaron porcentajes de entre 49 y 67 %, pudieron haberse perdido fragmentos determinantes en la diferenciación de especies.

Lo anterior podría representar un importante sesgo de los resultados, por lo cual será necesario efectuar otras pruebas de amplificación de rADN 16S para tener

porcentajes de recuperación más elevados. Otra posibilidad sería utilizar los oligonucleótidos complementarios descritos por el mismo Hutson *et al.*, 1993, los cuales flanquean dos regiones traslapadas de aproximadamente 1,000 pb cada una, lo que disminuiría la posibilidad de resultados erróneos.

## 8. CONCLUSIONES

- El 60 % de las 15 cepas de estudio mostraron valores de CMI entre 10 y 15 mM de arsenito de sodio.
- Hay diferencia en cuanto a la resistencia a arsenito entre las bacterias arsenito-oxidantes y las que no lo son, el 88.8 % de las cepas cuyos valores de CMI fueron  $\geq 10$  Mm mostraron actividad arsenito-oxidante en las pruebas de nitrato de plata 0.1 M.
- Probablemente las cepas en estudio presentan un mecanismo de resistencia a arsenito alterno al sistema *ars*.
- En las cepas utilizadas en este estudio no se identificó el gen *aoxB*, por lo que el fenotipo observado puede ser resultado de un mecanismo distinto a *aoxB*.
- No se identificó el gen *aoxB* como parte de Integrones Clasé I con la metodología utilizada para este fin.
- Se confirmó la especie de las cuatro cepas evaluadas por análisis de secuencia de rADN 16S



## **9. PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN**

- Capítulo titulado "Microbial arsenite biotransformation and its potential applications in bioremediation" en: Velázquez-Fernández JB y cols., 2013. "Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects". ISBN: 978-1-62948-513-3.
- Presentación de resultados del proyecto en el Tercer Congreso Internacional de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias del 3 al 7 de octubre del 2013 en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

## **10. PROSPECTIVAS**

- *Cuantificación de la conversión de arsenito* Para tener información de la medida en la que las cepas objeto de estudio realizan la conversión de arsenito a arsenato, resultaría conveniente determinar de la velocidad del proceso, en un medio controlado, dado que el objetivo a largo plazo sería aprovechar estas características en un dispositivo que asegure la mayor eficiencia y eficacia posibles.
- *Purificación de la enzima.* Otra acción importante a considerar sería la purificación de la enzima arsenito oxidasa a partir de cultivos puros con el fin de evaluar su uso en la descontaminación de aguas en lugar de emplear microorganismos completos. Además, esta purificación permitiría su cristalización y caracterización.

- **Caracterizar molecularmente la enzima.** Ir de proteína al DNA para obtener la secuencia del gen de la arsenito oxidasa.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) Estudios de Caso en Medicina Ambiental (CSEM). La toxicidad del arsénico. Curso: WB1576. Fecha original: 1 de octubre de 2009. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/es/csem/arsenic>. Consultado el 30/03/2014.

Ahmann D, Roberts AL, Krumholz LR, Morel FM. 1994. Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*. 371:750.

Anderson GL, Williams J, Hille R. 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem*. 267:23674–23682.

Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*. 14(4):176-182.

Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(12):2925–2929.

Bhattacharjee H, Rosen B. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic. *Microbes*. 371–406.

Bolt HM. 2013. Current developments in toxicological research on arsenic. *EXCLI Journal*. 12:64.74.

Branco R, Francisco R, Chung AP, Vasconcelos P. 2009. Identification of an *ars* system that requires cytochrome *c* in the highly arsenic-resistant bacterium *Ochrobactrum tritici* SC1124. *Appl Environ Microbiol.* 75 (15): 5141-5147.

Brown K, Ross G. 2002. American Council on Science and Health. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharm.* 36:162-174.

Butt AS, Rehman A. 2011. Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from industrial effluents and their potential use in wastewater treatment. *World J Microb Biot.* 27:2435-2441.

Cai L, Liu G, Rensing C, Wang G. 2009a. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol.* 9(4).

Cai L, Rensing C, Li X, Wang G. 2009b. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. *Appl Microb Biot.* 83:715-725.

Carbonell AA, Burló FM, Mataix JJ. 1995. Arsénico en el sistema suelo-planta. Significado ambiental. Madrid. Espagrafic. Pp 6-9.

Clingenpeel SR, D'Imperio S, Oduro H, Druschel GK, McDermott TR. 2009. Cloning and *in situ* expression studies of the *Hydrogenobaculum* arsenite oxidase genes. *Appl Environ Microbiol.* 75(10):3362-3365.

Cullen WR, Reimer KJ. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev.* 89:713-764.

Dey S, Rosen BP. 1995. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J Bacteriol.* 177(2): 385-389.

Ehrlich HL. 1997. Microbes and metals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 687-692.

Ellis PJ, Conrads T, Hille R, Kuhn P. 2001. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure.* 9:125-132.

Escalante G, Campos VL, Valenzuela C, Yañez J, Zaror C, Mondaca MA. 2009. Arsenic resistant bacteria isolated from arsenic contaminated river in the Atacama Desert (Chile). *Bull Environ Contam Toxicol.* 83:657-661.

González TL. 2005. Metales pesados y sus especies químicas en sedimentos del río Mololoa, Nayarit: determinación previa y posterior a una obra de dragado. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, Nayarit, México.

Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 66: 125-132.

Hamamura N, Macur RE, Korf S, Ackerman GG, Taylor WP, Kozubal W. 2009. Linking microbial oxidation of arsenic with detection and phylogenetic analysis of arsenite oxidase genes in diverse geothermal environments. *Environ Microbiol.* (11):421-431.

Heinrich-Salmeron A, Cordi A, Brochier-Armanet C, Halter D, Pagnout C, Abbaszadeh-fard E, Montaut D, Seby F, Bertin PN, Bauda P, Arse'ne-Ploetze F. 2011. Unsuspected Diversity of Arsenite-Oxidizing Bacteria as Revealed by Widespread Distribution of the *aoxB* Gene in Prokaryotes. *Appl Environ Microbiol.* 77(13):4685-4692.

Hendrick CA, Haskins WP, Vidaver AK. 1984. Conjugative plasmid in *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *Oortii* that confers resistance to arsenite, arsenate, and antimony (III). *Appl Environ Microbiol.* 48(1): 56-60.

Hoefft SE, Blum JS, Stoiz JF, Tabita FR, Witte B, King GM, Santini JM, Oremland RS. 2007. *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arseniteoxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *Int J System Evol Microbiol.* 57:504-512.

Hoke KR, Cobb N, Armstrong FA, Hille R. 2004. Electrochemical studies of arsenite oxidase: an unusual example of a highly cooperative two-electron molybdenum center. *Biochem.* 43:1667-1674.

Hutson RA, Thompson DE, Collins MD. 1993. Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Let.* 108:103-110.

Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, Warelow TP, Ward SA, Santini JM. 2007. Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ Microbiol.* 9:934-943.

Jáuregui MC, Ramírez HS, Espinosa RM, Tovar RR, Quintero HB, Rodríguez CI. 2007. Impacto de la descarga de aguas residuales en la calidad del río Mololoa (Nayarit, México) y propuesta de solución. *Rev Latinoam Rec Nat.* 3 (1): 65-73.

Jones FT. 2007. A broad view of arsenic. *Poultry Science.* 86: 2-14.

Kaushik P, Rawat N, Mathur M, Raghuvanshi P, Bhatnagar P, Swarnkar H, Flora S. 2012. Arsenic hyper-tolerance in four microbacterium species isolated from soil contaminated with textile effluent. *Toxicol Int.* 19(2): 188-194.

Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, Hassett DJ, Mc Dermott TR. 2006. Complex regulation of arsenite oxidation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 188:1081–1088.

Koehler S, Cleiss-Arnold J, Proux C, Sismeiro O, Dillies MA, Goulhen-Chollet F, Hommais F, Lièvreumont D, Arsène-Ploetze F, Coppée JY, Bertin PN. 2010. Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicyoxidans*. *BMC Microbiology*. 10(53): 1471-1484.

Kruse H, Sorum H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. *Appl Environ Microbiol*. 60:4015–4021.

Kulp TR, Hoefft SE, Asao M, Madigan MT, Hollibaugh JT, Fisher JC, Stolz JF, Culbertson CW, Miller LG, Oremland RS. 2008. Arsenic (III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science*. 321:967.

Li H, Li M, Huang Y, Rensing C, Wang G. 2013. In silico analysis of bacterial arsenic islands reveals remarkable synteny and functional relatedness between arsenate and phosphate. *Front microbiol*. 4(1).

Liebert CA, Hall RM, Summers AO. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(3): 507-522.

Liu G, Liu M, Kim E, Maaty WS, Bothner B, Lei B, Rensing C, Wang G, McDermott TR. 2012. A periplasmic arsenite-binding protein involved in regulating arsenite oxidation. *Environ Microbiol*. 14(7):1624–1634.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos, 10ª edición. Pearson – Prentice Hall, Madrid (España), 2004. Pp 58 – 59.

Mateos LM, Ordóñez E, Letek M, Gil JA. 2006. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int Microbiol.* 9, 207-215.

Mondragón VA, Pacheco GG, Rodríguez CL, Segura BC. 2009. Resistencia a antibióticos y metales pesados en bacterias aisladas de ambientes contaminados. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 40 (Número especial): 169.

Mondragón JVA, Márquez GAR, Padilla NR, Franco BB. 2010. Los ambientes contaminados favorecen la selección de microorganismos patógenos resistentes. *Ambientalia 2010. 1º Congreso de Sostenibilidad.* Coordinadora estatal de ciencias ambientales. Truyol-digital. Alcorcón, Madrid. 1:157-158.

Mondragón VA, Llamas DF, González GE, Márquez AR, Padilla R, Durán MJ, Franco B. 2011. Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ Monit Assess.* 183(1-4):329-40.

Mondragón-Jaimes VA, García-Calzada AY, López-Gaytán SB, Quintero-Castañeda A, Rodríguez-Aguilar D. 2012. Characterization of arsenic and mercury resistant bacteria from contaminated site in Nayarit, Mexico. In: Fernández-Luqueño F, López-Valdez F, Lozano-Muñiz S. (Eds.). *Biotechnol Summit*, Yucatán México. Pp 15-20 March 2012.

Moreno-Grau MD. 2003. Metales. En: Moreno-Grau, M. D. (Ed.), *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgos para la salud humana.* McGraw-Hill. Madrid (España), pp. 198-235.

Morgante V, González JE. 2013. Identificación de nuevos mecanismos moleculares de resistencia a arsénico en microorganismos adaptados a ambientes

acuáticos altamente contaminados con metales pesados. *Seguridad y medio ambiente*. 129. 44-53.

Morozzi G, Cenci G, Scardazza F, Pitzurra M. 1986. Cadmium uptake by growing cells of gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbios*. 48:27-35.

Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung L, Silver S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev*. 26: 311-325.

Muller D, Lièvremon D, Simeonova DD, Hubert JC, Lett MC. 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant *Proteobacterium*. *J Bacteriology*. 185(1):135-141.

National Academy of Sciences (N. A. S.). 1977. Arsenic. Medical and biological effects of environmental pollutants. Washington, D.C. pp. 332.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Diario Oficial de la Federación.

Nordstrom DK. 2002. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science*. 296:2143-2145.

Ordóñez E, Letek M, Valbuena N, Gil JA. 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl Environ Microbiol*. 71(10):6206.

Oremland RS, Stolz JF. 2003. The ecology of arsenic. *Science*. 300:939-944.

Oremland RS, Stolz JF. 2005. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol*. 13:45-49.



Osborne TH, Jamieson HE, Hudson KA, Nordstrom DK, Walker SR, Ward SA, Santini JM. 2010. Microbial oxidation of arsenite in a subarctic environment: diversity of arsenite oxidase genes and identification of a psychrotolerant arsenite oxidizer. *BMC Microbiology*. 10:205.

Pimparker BD, Bhave A. 2010. Arsenicosis: review of recent advances. *J Assoc Physicians India*. 58:617-24.

Phillips SE, Taylor ML. 1976. Oxidation of Arsenite to Arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microbiol*. 32(3): 392-399.

Quéméneur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Lièvremon D, Jauzein M, Bertin PN, Garrido F, Joulain C. 2008. Diversity surveys and evolutionary relationships of *arsB* genes in aerobic arsenite-oxidising bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 74:4567-4573.

Quéméneur M, Cébron A, Billard P, Battaglia-Brunet F, Garrido F, Leyval C, Joulain C. 2010. Population structure and abundance of arsenite-oxidising bacteria along an arsenic pollution gradient in waters of the Upper Isle River Basin, France. *Appl Environ Microbiol*. 76:4566-4570.

Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. 2009. Arsenic Pollution: a Global Synthesis. UK: Wiley-Blackwell.

Rhine ED, Garcia-Dominguez E, Phelps CD, Young LY. 2005. Environmental microbes can speciate and cycle arsenic. *Environ Sci Technol*. 39:9569-9573.

Rhine ED, Ni Chadhain SM, Zylstra GJ, Young LY. 2007. The arsenite oxidase genes (*aroAB*) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers. *Biochem Biophysical Res Commun*. 354:662-667.

Rodríguez I, Robledo ML, Jáuregui C, Quintero B, Ramírez S, Tovar R, Espinosa MA. 2008. Niveles de plaguicidas organoclorados en sedimentos superficiales de un tramo del río Mololoa. *Rev Lat Rec Nat.* 4 (2): 146-154.

Rodríguez L. 2010. Determinación de la resistencia a arsenito y arsenato en bacterias aisladas de lixiviados y aguas negras que impactan el río Mololoa en Nayarit. [Tesis] Universidad Autónoma de Nayarit.

Rosen BP. 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7: 207-212.

Salmassi TM, Walker JJ, Newman DK, Leadbetter JR, Pace NR, Hering JG. 2005. Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek. *Environ Microbiol.* 7(13): 1654-1668.

Saltikov CW, Olson BH. 2002. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters. *Appl Environ Microbiol.* 68(1): 280-288.

Sambu S, Wilson R. 2008. Arsenic in food and water – a brief history. *Toxicol Ind Health.* 24: 217-226

Santini JM, Vanden Hoven RN. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol.* 186(6): 1614-1619.

Sardiwal S, Santini JM, Osborne TH, Djordjevic S. 2010. Characterization of a two-component signal transduction system that controls arsenite oxidation in the chemolithoautotroph NT-26. *FEMS Microbiol Lett.* 313:20-28.

SEMARNAT, 2002. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Proyecto de rectificación y encauzamiento del río Mololoa. Reporte técnico. Tepic, Nayarit. Gobierno Federal, México, Delegación Estatal, pp. 5 y 6.

Silver S, Phung LT. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* 71:599-608.

Smedley PL, Kinniburgh DG. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem*. 17:517-568.

vanden Hoven RN, Santini JM. 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph Hydrogenophaga sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim Biophys Acta – Bioenergetics*. 1656(2-3), 148 – 155.

van Lis R, Nitschke W, Warelow TP, Capowicz L, Santini JM, Schoepp-Cothenet B. 2012. Heterologously expressed arsenite oxidase: A system to study biogenesis and structure/function relationships of the enzyme family. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbabi.2012.06.001.

Vivanco JC, Bojórquez JI, Murray RM, Nájera O, Hernández A, Flores F. 2010. Características de los principales suelos de la cuenca del río Mololoa, Tepic, Nayarit, México. *Cultivos Tropicales*. 31(1):32-40.

WHO (World Health Organization), 2004. Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. Recommendations. Third Edition, WHO, Geneva. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546387.pdf>.

Xu C, Rosen BP. 1997. Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 72:15734-15738.

Zargar K, Hoeft S, Oremland R, Saltikov CW. 2010. Identification of a novel arsenite oxidase gene, *arsA*, in the haloalkaliphilic, arsenite-oxidizing bacterium *Alkalifilmicola ehrlichii* strain MLHE-1. *J Bacteriol*. 192:3755-3762.

Zargar K, Conrad A, Bernick DL, Lowe TM, Stoic V, Hoefft S, Oremland RS, Stolz J, Saltikov CW. 2012. ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environ Microbiol.* 14(7):1635–1645.

Zhang HB, Wang LH, Zhang LH. 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 99:4638–4643.

## **ANEXO 1 SOLUCIONES Y REACTIVOS EMPLEADOS**

- Agarosa al 1 % en TAE/TBE

Pesar la cantidad necesaria de agarosa en una proporción p/v del 1% respecto al volumen final deseado. Disolver en el buffer TAE o TBE (uno u otro, depende del tamaño del fragmento), calentar hasta su completa disolución. Vaciar en el molde, previa colocación del peine para pocillos y esperar hasta la polimerización para montar el corrimiento electroforético.

- Arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ) 0.1 M

Pesar 1.2991 grs de  $\text{NaAsO}_2$  y aforar en 100 mL de agua destilada estéril.

- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 1M

Pesar 0.849 grs y aforar en 5 mL de agua destilada estéril.

- TAE 1X

Realizar la dilución de 20 mL de TAE (Tris + Ácido Acético + EDTA) 50X de BIO-RAD® en 980 mL de agua destilada estéril y homogenizar.

- TBE 1X

- Disolver 108 grs de Tris Base, 55 grs de Ácido Bórico y 40 mL de EDTA disódico (pH 8.0) en 800 mL de agua destilada estéril y aforar a un litro para obtener el buffer TBE 10X. De éste, tomar 100 mL y diluir a un litro con agua destilada estéril para llegar así al buffer TBE 1X.