

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS DE IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA EN LA RESISTENCIA A ARSÉNICO

Rodriguez Arredondo, Angela Nayeli¹, López Pérez, María Elena², Del Rincón Castro, María Cristina³

¹ [Programa de licenciatura en ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [rodrigueznayeli@hotmail.com]

² [Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [me.lopezperez@ugto.mx]

³ [Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [cdelrincon@ugto.mx]

Resumen

El objetivo de esta investigación fue identificar microorganismos resistentes a altas concentraciones de arsénico (As) y capaces de óxido-reducir las especies químicas de éste, mediante el análisis de 4 cepas de bacterias y una de hongo utilizando diferentes concentraciones de sales de arsenito y arsenato (10, 15 y 30 mM). Se extrajo DNA de buena calidad para las bacterias y el hongo, además se realizó la amplificación por PCR del gen rDNA 16S y los ITS4/ITS5 para su posterior secuenciación. Se observó que las bacterias presentaron un mejor crecimiento en arsenato y el hongo presentó un crecimiento favorable en arsenito. Dichos microorganismos fueron además capaces de reducir el arsenato a arsenito, esto se observó por medio de la reacción con nitrato de plata (AgNO₃). Así mismo, fue posible identificar posibles proteínas involucradas en la resistencia a As mediante SDS-PAGE de una dimensión, obteniéndose una diferencia en el patrón de bandeo a los 40 y 80 kDa para el hongo. Esto podría estar relacionado con proteínas tipo arsenato-reductasa y de transporte de expulsión de arsénico. El patrón de bandeo para la cepa 20 mostró una diferencia a los 13 kDa, que podría estar relacionada con una proteína de expulsión de arsénico.

Abstract

The aim of this research was identify microorganisms resistant to high concentrations of arsenic (As) and with the ability of oxide-reduce the different species of As, analyzing four strain of bacterium and one of fungus using different range of concentrations of arsenite and arsenate (10, 15 and 30 mM). It was obtained the DNA of bacterium and fungus, also the polymerase chain reaction (PCR) was done of the gene rDNA 16S and the ITS4/ITS5 for their future sequencing. It was observed in bacterium an increase in resistance in arsenate, nevertheless in fungus was observed an increase in resistance in arsenite. This microorganisms also were capable of reduce the arsenate to arsenite, analyzed for the reaction with silver nitrate (AgNO₃). The identification of possibles proteins associated with this resistance was observed in a SDS-PAGE where two bands of proteins (40 and 80 kDa) was observed for the fungus, these would be related with arsenate reductase protein and arsenite efflux membrane protein. One band of protein for the bacteria strain 20, was near of 13 kDa, it would be related with a efflux arsenite protein.

Palabras clave

Arsenito; arsenato; bacterias; hongos; reducción

INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos químicos más tóxicos y carcinogénicos, que causa mayores estragos en México y a nivel mundial es el arsénico (As), por su acumulación en agua, aire y suelo [1]. El As se encuentra con más frecuencia en su forma reducida arsenito As(III) y su forma oxidada arsenato As(V), siendo éstos los más tóxicos para los organismos vivos [2]. La oxidación química del As es lenta y los compuestos químicos empleados presentan elevados costos y además, pueden llegar a generar contaminación secundaria y ser ineficientes a bajas concentraciones de As [3]. Por lo anterior, el desarrollo de nuevas técnicas de biorremediación, basadas en la capacidad natural que tienen algunos microorganismos para incorporar contaminantes en sus procesos metabólicos y utilizarlos como fuente de energía es uno de los desafíos a los que se enfrentan los investigadores [4]. Los microorganismos que transforman el As(V) y As(III) son diversos en su filogenia y fisiología, existiendo tres sistemas enzimáticos para su transformación: arsenito oxidasa, arsenito reductasa y arsenito reductasa citoplasmática [5]. El presente trabajo, tuvo como objetivo identificar microorganismos (bacterias y hongos) resistentes a altas concentraciones de As y capaces de óxido-reducir las especies químicas de éste, así como la identificación de posibles proteínas involucradas en el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de bacterias y hongo. Las cepas de bacterias denominadas 3, 9, 20 y 51 y el hongo 44-H fueron donados por el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato.

Extracción de DNA de bacterias. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en agua destilada. Se agregó 700 μL de tampón glucosa-Tris-EDTA (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) y 6 μL de lisozima (10 mg mL^{-1}), se incubó a 37° C por 2.5 hrs. Se añadió 10 μL de SDS al 25% y 10 μL de Proteinasa K (10 mg mL^{-1}). Se añadió un volumen de fenol/ cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, y se adicionó 700 μL de isopropanol y 350 μL de

volumen de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), se incubó a -20°C por 1 h. Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm por 7 min a 4°C y se decantó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 500 μL de etanol al 70% centrifugando a 13,000 rpm por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 30 μL de agua.

Amplificación del gen rDNA 16S de bacterias.

Se realizó la PCR con la siguiente mezcla: 16.8 μL de agua destilada, 2.5 μL de Buffer 10x (1x), 1.5 μL de Mg Cl₂ (50mM), 1 μL de dNTP's (10mM), 1 μL de oligo R (rP2), 1 μL de oligo F (fD1), 0.2 μL de Taq (5 U) y 1 μL de DNA. La desnaturalización inicial se realizó a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos empleando una temperatura de 95 °C por 40 s, un alineamiento de 55°C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Extracción del DNA del hongo 44-H.

La cepa de hongo 44-H, fue sembrada en medio Agar Dextrosa Sabouraud, cuantificando las esporas en cámara de Neubauer en un microscopio AxioLabA1 (Zeiss), posteriormente se incubaron por 7 días a 28±2 °C. El micelio del hongo fue recolectado y macerado, se adicionó 1000 μL de buffer de extracción (Tris-HCl 0.2 M, EDTA 0.025 M, SDS 0.5%, NaCl 0.25 M), se incubó a 70° C por 30 min y se adicionó 500 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, recuperando la fase acuosa. Se añadió un volumen equilibrado de fenol/cloroformo, se agitó y adicionó 3 μL de RNAasa, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, recuperando el sobrenadante y adicionando un volumen igual de isopropanol. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en etanol al 70%, se secó la pastilla y posteriormente se adicionó 20 μL de agua destilada.

Amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS4/ITS5) para el hongo 44-H.

Se realizó la PCR con la siguiente mezcla: 17.2 μL de agua destilada, 2.5 μL de Buffer 10x (1x), 1 μL de Mg Cl₂ (50 mM), 1 μL de dNTP's (10 mM), 1 μL de oligo R, 1 μL de oligo F, 0.3 μL de Taq (5 U) y 1 μL de DNA (100 ng/ μL) del hongo 44-H. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos empleando una temperatura de 94 °C por 40 s, un alineamiento de 55 °C por 40 s, una extensión de 72°C por 40 s y una temperatura de 72 °C de extensión final.

Extracción de proteína de bacterias. La bacteria 20 fue seleccionada para extraer proteínas, la cepa fue sembrada en medio extracto de suelo minero (ESC: 500 g L⁻¹ de suelo esterilizado y filtrado a 0.45 µm, 1 g L⁻¹ de extracto de levadura, 2 g L⁻¹ de glucosa) enriquecido a una concentración de 10 mM de sales de arsenito (NaAsO₂) y arsenato (HAsNa₂O₄). Posteriormente, se recuperó la pastilla y se agregó directamente 50 µL de solución de Laemmli (Tris 0.5 M, SDS al 20%, glicerol, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.02%), la muestra fue agitada e incubada en hielo, para su posterior desnaturalización y análisis en un gel discontinuo de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Finalmente se llevó a cabo la tinción con azul brillante de Coomassie (G-250) y el gel fue visualizado en un fotodocumentador Gel DocTM EZ Imagen marca BioRad.

Extracción de proteína por ácido tricloroacético (TCA). El hongo 44-H fue sembrado en medio papa dextrosa (PD), enriquecido a una concentración de 10 mM de sales de arsenito y arsenato. El micelio del hongo fue recolectado y macerado a -70 °C, hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se añadió 3 mL de TCA al 10% en acetona con 0.07% (v/v) de 2-mercaptoetanol, se incubó a -20 °C por 1 h. La pastilla se recuperó a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C y se lavó con 500 µL de acetona (0.07 % (v/v)) con 2-mercaptoetanol. La pastilla fue resuspendida en un buffer de lisis (Urea 8 M, Tiurea 2 M, CHAPS 0.5%, DTT 0.1 M), el lisado se centrifugó a 13,200 rpm por 30 min, realizando una cuantificación de proteína por el método de Bradford y posteriormente se analizó en un gel SDS-PAGE con las condiciones descritas anteriormente.

Resistencia de hongos y bacterias a As y detección de óxido-reducción. Se preparó medio ESC (500 g L⁻¹ de suelo esterilizado y filtrado a 10 µm, 1 g L⁻¹ de extracto de levadura, 2 g L⁻¹ de glucosa, 18 g L⁻¹ de agar bacteriológico) enriquecido con 10, 15 y 30 mM de As(III) y As(V). Después del crecimiento de los microorganismos se detectó con nitrato de plata (AgNO₃) 0.1 M la óxido-reducción de As en el medio de cultivo. Una coloración amarilla indicó la presencia de As(III) y una coloración marrón la presencia de As(V).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas de las cepas. Las cepas de bacterias presentaron un color perla brillante, la cepa 3 presentó forma de bacilo, la 9 y 51 forma de estreptobacilo y la 20 forma filamentososa. La caracterización morfológica de la cepa de hongo 44-H, se ilustra en la imagen 1, se observó la hifa cenocítica del hongo (50 µm) y un tamaño de espora de 2 µm. Por medio de la cámara de Neubauer, se cuantificó el número de esporas presentes en la muestra, siendo de 29.15x10⁴ esporas/mL.

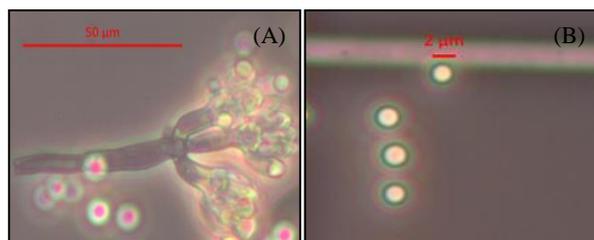


IMAGEN 1: Hifa cenocítica del hongo 44-H (A), espora del hongo 44-H (B).

Extracción de DNA y amplificación del gen rDNA 16S. En la extracción de DNA de bacterias, se visualizó una banda de 12,000 pares de bases (Imagen 2, A), correspondiente a una extracción de DNA total, con ello fue posible realizar la amplificación del gen rDNA 16S de bacterias, en la cual se obtuvieron amplicones de 1,650 pares de bases para las bacterias 3, 9 y 51. Para la bacteria 20 se obtuvo un amplicón de 850 pares de bases, la cual puede representar una inespecificidad en la amplificación y tendría que secuenciarse con la finalidad de conocer a que región del genoma pertenece dicha banda (Imagen 2, B). Se espera la secuenciación de los amplicones obtenidos para poder identificar a las bacterias por género y especie.

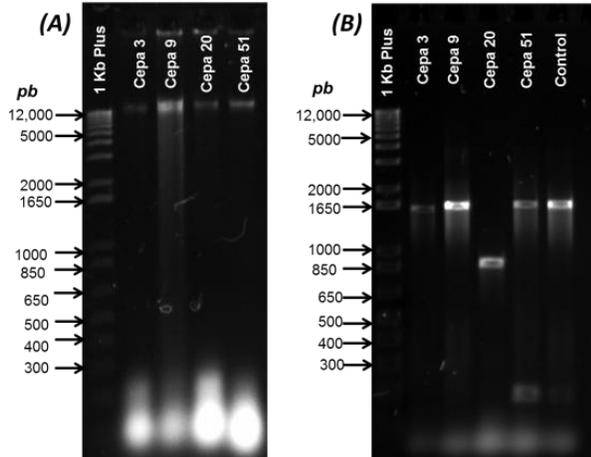


IMAGEN 2: Extracción de DNA de bacterias (A) y amplificación del gen rDNA 16S (B).

Proteínas de la cepa de bacteria 20. En la imagen 3, se presenta el patrón de bandeo de proteínas de la cepa 20 en medio ESC sin As (carril 2) y con 10 mM de As(V) (carril 3) a las 24 horas de crecimiento. Entre los 10 y 15 kDa se observó una banda que está presente en el carril 3 (Imagen 3) y no está presente cuando la bacteria crece sin As, podría estar relacionada con una proteína de membrana de expulsión de arsenito con un peso 13.5 kDa descrita en *Bacillus thuringiensis* (Acceso: AFU10534) [6].

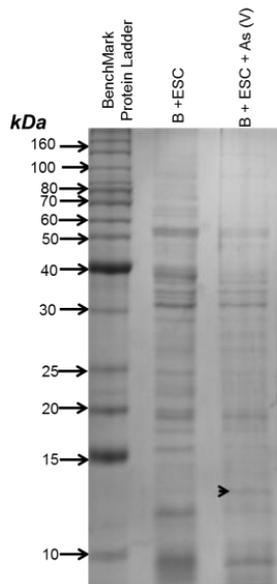


IMAGEN 3: Gel SDS-PAGE de la cepa de bacteria 20. Carril 1: marcador de proteínas. Carril 2: la cepa 20 en medio ESC sin As. Carril 3: la cepa 20 en medio ESC suplementado con 10 mM de As(V).

Extracción de DNA de hongo y amplificación de los ITS4/ITS5. En la extracción de DNA de la cepa de hongo 44-H, se visualizó una banda de 12,000 pares de bases (Imagen 4, A), correspondiente a una extracción de DNA total para el hongo purificado, con ello fue posible realizar la amplificación de los ITS4/ITS5 de dicha cepa, en la cual se obtuvieron amplicones de 650 pares de bases (Imagen 4, B).

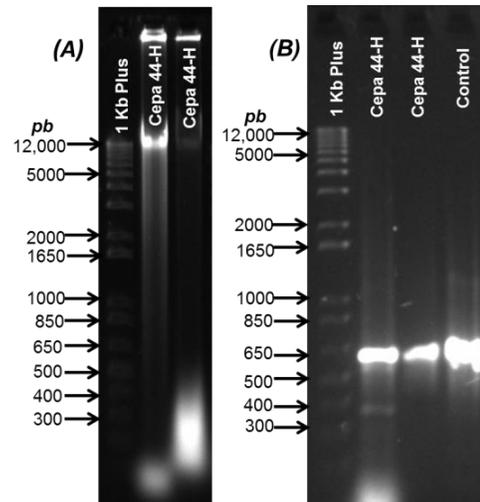


IMAGEN 4: Extracción de DNA del hongo 44-H (A) y amplificación de los ITS4/ITS5 (B).

Proteínas del hongo 44-H. En la extracción de proteína del hongo 44-H, (Imagen 5), se observaron diferencias en el patrón de bandeo cuando el hongo creció en medio enriquecido con As comparado con el medio sin As. Se observó una banda marcada a los 40 y 80 kDa en el carril 3 y 4, que no estuvo presente cuando el hongo creció sin As (Imagen 5, carril 2). La banda marcada a los 40 kDa, podría estar relacionada con una proteína arsenato reductasa reportada en el hongo *Rutstroemia* (Acceso: PQE22983) [7] con un peso molecular de 40 kDa. La banda marcada a los 80 kD, podría estar relacionada con una proteína transportadora de expulsión de arsenito perteneciente al hongo *Metarhizium acridum* con un peso molecular de 82.93 kDa (Acceso: XP_007815226) [8].

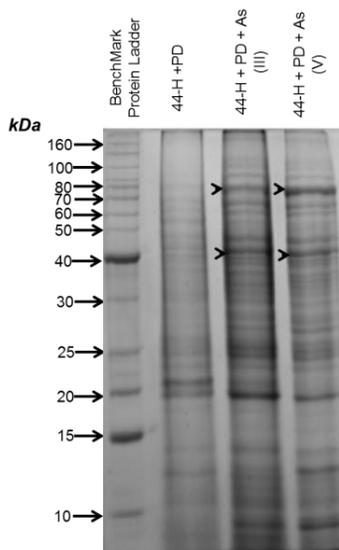


IMAGEN 5: Gel SDS-PAGE de la cepa de hongo 44-H. Carril 1: marcador de proteínas. Carril 2: la cepa 44-H en medio PD sin As. Carril 3: la cepa 44-H en medio PD suplementado con 10 mM de As(III). Carril 4: la cepa 44-H en medio PD suplementado con 10 mM de As(V).

Resistencia a As. Se observó que las bacterias presentaron un mejor crecimiento en As(V), ya que crecieron favorablemente aún en concentraciones 30 mM, mientras que en As(III), solo la cepa 20 pudo crecer a una concentración de 15 mM. En cambio el hongo 44-H, presentó un desarrollo más favorable en As(III), ya que a las 48 hrs se obtuvo un crecimiento en 15 mM de arsenito y hasta las 72 hrs en 15 mM de arsenato, sin embargo éste logró crecer en 30 mM de ambas sales.

Óxido-reducción de As. En la detección de óxido-reducción de arsénico, se presentó una reducción del As(V) a As(III) cuando la cepa de bacteria y hongo crecieron en extracto de suelo enriquecido con 15 mM y 30 mM de sales de arsenito y arsenato, indicado por la coloración amarilla.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, sugieren que los microorganismos, puede resistir altas concentraciones de arsénico, debido al crecimiento favorable en As(V) para las cepas de bacterias y en As(III) para la cepa del hongo analizado. Además, estos fueron capaces de transformar las especies químicas de As (reducir As(V) a (III)), por lo que resulta importante

comprender el sistema que involucra el metabolismo de estas bacterias y hongo, para ser empleados como biorremediaciones en agua y suelo contaminados con dicho elemento.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a la Dirección de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato por el financiamiento de esta investigación por parte del programa de verano de Investigación Científica.

REFERENCIAS

- [1] Iliná, A., J. Martínez-Hernández, E. Segura-Ceniceros, J. Villarreal-Sánchez y K. Gregorio-Jáuregui. (2009). Biosorción de arsénico en materiales derivados de maracuyá. Revista internacional de contaminación ambiental. 25: 201-216.
- [2] Tsai, S. L., S. Singh, and W. Chen. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. Current Opinion in Biotechnology.20: 659-667.
- [3] Santini, J. M., L. I. Sly, R. D. Schnagl, and J. M. Macy. (2000). A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. Applied and Environmental Microbiology.66: 92-97.
- [4] Macur, R., C. Jackson, L. Botero, T. McDermott, and W. Inskeep. (2004). Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. Environmental Science & Technology.38: 104-111.
- [5] Valenzuela, C., V. L. Campos, J. Yañez, C. A. Zarror, and M. A. Mondaca.(2009). Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, Northern Chile. Bull.Environmental Contamination and Toxicology. 82: 593-596.
- [6] Banerjee,P. and Sengupta,T.K .(2012). Characterization of arsenate tolerant property of *Bacillus thuringiensis* strain KPWP1. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/407361945>
- [7] Ricks,N.J. (2018). Arsenate reductase protein [Rutstroemia sp. NJR-2017a WRK4].Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1350373944>
- [8] Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., & Peng, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. PLoS genetics, 7(1), e1001264.