

# *Identificación* *de nuevos mecanismos moleculares de* **RESISTENCIA A ARSÉNICO**

EN MICROORGANISMOS ADAPTADOS A AMBIENTES ACUÁTICOS  
ALTAMENTE CONTAMINADOS CON METALES PESADOS

Este proyecto estudió las comunidades microbianas que habitan ambientes acuáticos ácidos ( $\text{pH} \leq 3$ ) altamente contaminados con metales pesados. Mediante una aproximación de metagenómica funcional, se identificaron nuevos mecanismos moleculares de resistencia a arsénico (As). Las muestras de ADN metagenómico se obtuvieron desde agua del nacimiento del río Tinto (Huelva, España). Numerosos clones, con los fragmentos de dicho ADN, mostraron una mayor resistencia a las diferentes formas inorgánicas de As (arsenato y arsenito) y a antimonio respecto a la cepa control. El análisis de las secuencias de ADN reveló la presencia de ORFs (marcos de lectura abiertos de proteínas) que codificarían los genes que confieren el fenotipo de resistencia. Se subclonó cada ORF y se comprobó su perfil de resistencia.

Este trabajo permite por primera vez asignar a proteínas descritas una nueva función, ya que nunca antes habían sido implicadas en la resistencia a metales pesados. Sus resultados contribuyen a mejorar el conocimiento de la microbiota nativa de ambientes acuáticos extremos.

Por **VERÓNICA MORGANTE** (vmorgante@cab.inta-csic.es) y **JOSÉ EDUARDO GONZÁLEZ PASTOR** (gonzalezpje@cab.inta-csic.es). Laboratorio de Ecología Molecular, Área de Ambientes Controlados. Centro de Astrobiología. Carretera de Ajalvir km 4. Torrejón de Ardoz, 28850 Madrid.



**E**l arsénico (As) es un metaloide ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Generalmente se encuentra en pequeñas cantidades en la naturaleza. Sin embargo, su concentración puede ser mayor en determinadas zonas debido a las condiciones ambientales (depósitos geológicos, drenajes naturales de aguas ácidas, etc.) o a la actividad humana (como minería y producción industrial de láser, vidrio, pigmentos, papel, plaguicidas, etc.). El arsénico puede existir en muchas formas químicas diferentes, siendo el arsenito [As(III)] y el arseniato [As(V)] las formas inorgánicas más abundantes en el ambiente.



La investigación se ha realizado a partir de aguas ácidas y altamente contaminadas con metales pesados, localizadas en el nacimiento del río Tinto (Huelva).



Latinstock

Este metaloide es altamente tóxico para los seres vivos y bioacumulable en la cadena trófica. A su vez, el As(III) es 100 veces más tóxico que el As(V).

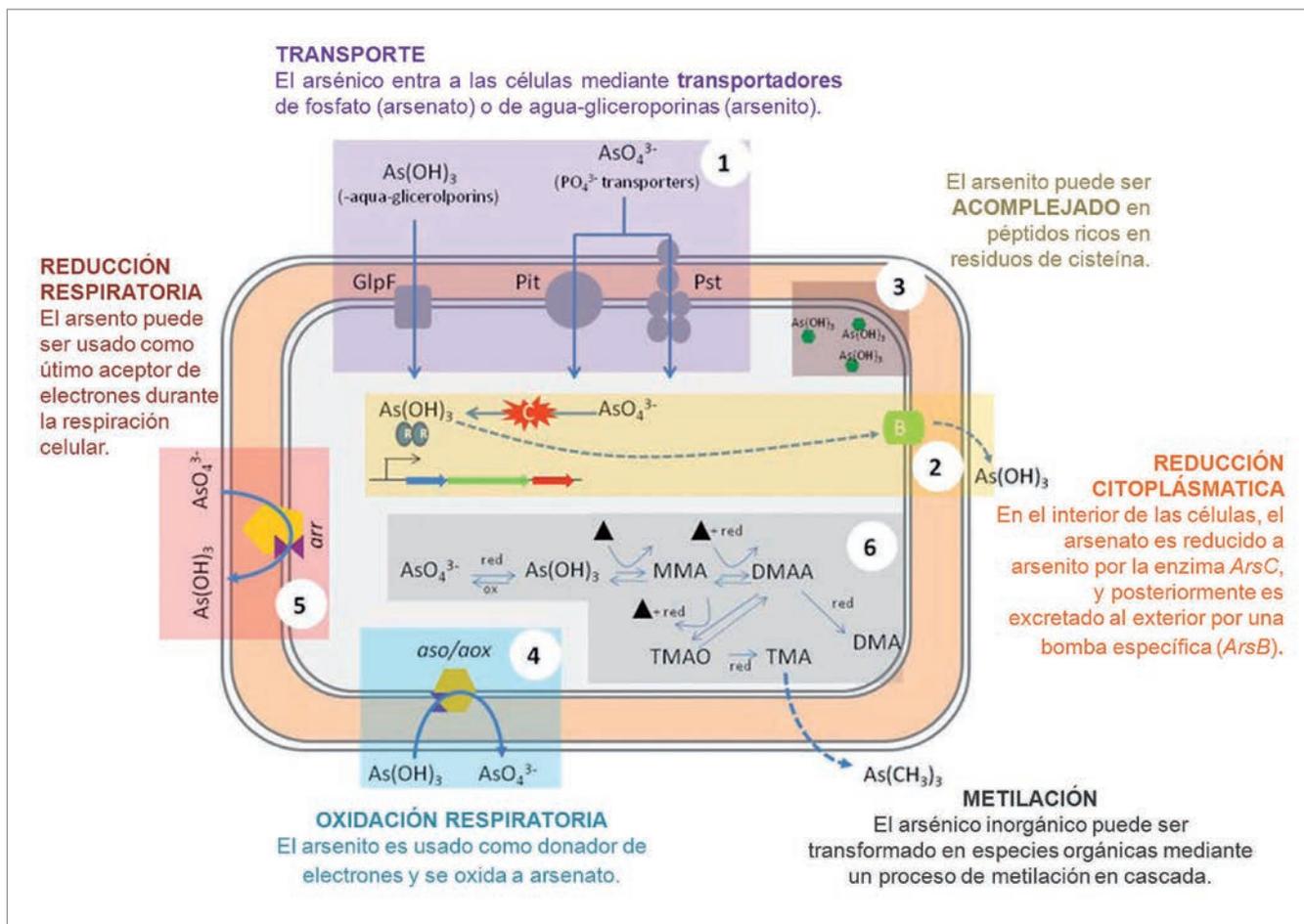
Los microorganismos tienen un rol importante en el ciclo biogeoquímico del arsénico, siendo los principales responsables de la biotransformación y movilización de este metaloide en el ambiente. Es así como las actividades enzimáticas microbianas catalizan la conversión de las especies de arsénico a formas con diferente solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y toxicidad. Si bien muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a arsénico, sor-

**El empleo de las capacidades microbianas es relevante para la descontaminación de ambientes contaminados con arsénico y otros metales pesados, particularmente el agua como elemento esencial para el desarrollo de la vida**

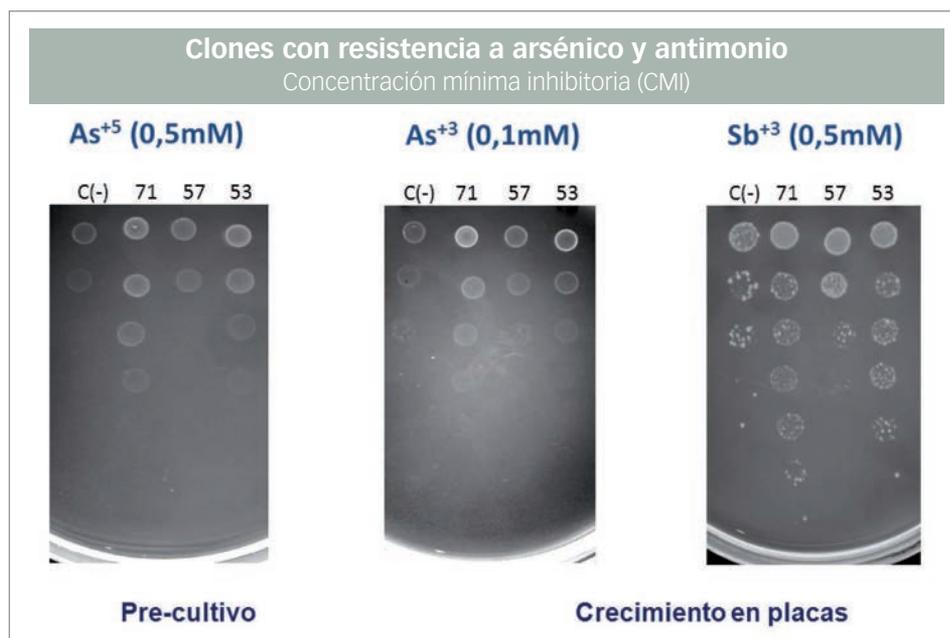
prendentemente algunos de ellos son capaces de utilizarlo, o incluso requieren de arsénico para su fisiología normal <sup>[1]</sup>. La mayoría de los mecanismos de resistencia, han sido descritos en microorganismos cultivables <sup>[2]</sup> (Figura 1).

Nuestro sistema de estudio se centra en las aguas que forman parte del nacimiento del río Tinto, localizado en Huelva (España). Debe su nombre al color de sus aguas rojas, que contienen un eleva-

do contenido de hierro (Figura 2). Las aguas estudiadas se caracterizan por una elevada acidez ( $\text{pH} \leq 2,3$ ), contienen elevadas concentraciones de sulfatos y metal(oid)es (Fe, As, Co, Ni, Cu, Pb, Mn) en su mayoría tóxicas. Particularmente, se ha detectado que la concentración de arsénico en zonas próximas a la cabecera del río asciende hasta  $18 \text{ mgL}^{-1}$  <sup>[3]</sup>. Pese a la intensa actividad minera, el río ha formado un ambiente de drenaje ácido na-



**Figura 1.** Principales mecanismos de transformación de arsénico y resistencia en bacterias. (1) El arsénico entra en la célula a través de los canales de fosfato (arsenato) o de agua-gliceroporinas (arsenito). (2) Una vez en el interior de las células, el arsenato es reducido a arsenito a través de *ArsC*, para posteriormente ser expulsado a través de *ArsB*. (4) El arsenito puede servir como donador de electrones, oxidándose a arsenato. (6) El arsenato puede utilizarse como aceptor final de electrones durante la respiración celular. (3) El arsénico inorgánico puede acomplejarse con residuos de cisteína de los péptidos o transformarse en especies orgánicas a partir de complejos con cascadas de metilación (6). Figura adaptada de Páez-Espino *et al.*, 2009 [1].



**Figura 2.** Resistencia a arsénico [As (V) y As (III)] y antimonio de clones obtenidos mediante técnica metagenómica. La resistencia fue determinada por el método de concentración mínima inhibitoria respecto de la cepa control (*E. coli* AW3110). C(-): control negativo.

tural que lleva funcionando aproximadamente 2 m.a. de antigüedad.

Particularmente, las comunidades microbianas que habitan ambientes extremos constituyen un gran reservorio genético (diversidad funcional). En la actualidad se han desarrollado nuevas tecnologías de cultivo-independiente que permiten estudiar la fracción de las comunidades microbianas que había permanecido ignorada por la microbiología mediante el tradicional uso de técnicas dependiente de cultivo.

Una de estas modernas técnicas es el estudio del ADN metagenómico, que permite la extracción y purificación del ADN (material genético) directamente desde las muestras ambientales. Mediante la metagenómica funcional, somos capaces de descubrir los genes (y mecanismos) involucrados en la habilidad de los microorganismos de adaptarse y sobrevivir a las condiciones adversas que les ofrece el medio. De esta forma, el estudio del ADN metagenómico facilita conocer aspectos interesantes de las comunidades microbianas que habitan un determinado ambiente, como, por ejemplo, genes procedentes de nuevas especies

microbianas que serían difíciles o imposibles de cultivar en el laboratorio; o identificar genes que codifican información para la síntesis de nuevos compuestos o enzimas. Es decir, obtenemos novedosas soluciones para la adaptación a condiciones extremas, y esto resulta de interés para aplicaciones biotecnológicas concretas y en biomedicina<sup>[4 y 5]</sup>.

## Objetivo y alcance

La presente investigación propone aplicar una aproximación de metagenómica funcional para descubrir nuevos genes de resistencia a arsénico en el metagenoma de comunidades microbianas que habitan aguas ácidas ( $\text{pH} \leq 3$ ) y altamente contaminadas con metales pesados, situadas en el nacimiento del río Tinto.

El río Tinto es un interesante, y probablemente único, modelo de medio ambiente extremo en el que las condiciones acidófilas son de origen biológico. Las aguas ácidas en interacción con microorganismos y el oxígeno contribuyen fundamentalmente a las condiciones extremas del ecosistema, ya que favorecen la

solubilidad de metales pesados presentes en los minerales de las rocas, siendo el arsénico un caso particular. El estudio metagenómico y funcional de la microbiota nativa revelará características genéticas hasta la fecha desconocidas y con un valor biotecnológico sorprendente.

Dada la gran problemática asociada a la elevada toxicidad del arsénico, sus efectos nocivos para la salud y la recurrente detección de altas concentraciones de este metaloide en aguas de consumo y reservorios subterráneos de todo el mundo, se espera que los novedosos genes identificados en este trabajo tengan un potencial uso en estrategias de biorremediación de ambientes contaminados con arsénico y en la generación de organismos más resistentes (por ejemplo, plantas).

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras y extracción de DNA metagenómico

Se tomaron muestras de aguas ácidas de la zona del nacimiento del río Tinto, en Huelva (España). El ADN metagenómico se extrajo mediante el *kit* comercial FastDna (MP Biomedicals), según las indicaciones del fabricante. El ADN purificado y de alta calidad fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Cepas bacterianas, medio de cultivos y conservación

Las cepas de *Escherichia coli* (DH10B y AW3110) se cultivaron a  $37^{\circ}\text{C}$ , en un agitador orbital a 170 rpm, empleando el medio rico Luria-Bertani (LB), según describieron Mirete *et al.*, 2007<sup>[4]</sup>. También se empleó el medio mínimo TRIS ( $\text{pH} = 7$ ), especialmente diseñado para experimentos con metales pesados<sup>[6]</sup>. En todos los casos que correspondiera, los clones obtenidos en las distintas cepas bacterianas fueron conservados en glicerol al 20% v/v y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Elaboración de la biblioteca metagenómica y búsqueda de actividades enzimáticas de resistencia a arsénico**

La librería metagenómica de agua ácida se elaboró con fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 2 a 5 kb. Para ello, se realizó una digestión parcial del DNA metagenómico extraído con enzimas de corte frecuente, como SauIII. Posteriormente, se empleó el vector pBluescript (pSKII+) y la cepa *E. coli* DH10B como huésped para la expresión de los genes ambientales, siguiendo los protocolos pre-establecidos en nuestro laboratorio<sup>[4 y 5]</sup>. Una vez construida, la biblioteca metagenómica se analizó para detectar actividades enzimáticas de resistencia. La librería se plaqueó en medio mínimo TRIS<sup>[6]</sup> para metales con concentraciones de arsénico que inhiben el crecimiento de la bacteria huésped [As(V) > 6 mM]. Se aislaron aquellos clones que mostraron resistencia a arsénico. Desde ellos se purificó el plásmido y se volvió a transformar en *E. coli* DH10B para asegurar que la resistencia es debida al fragmento de DNA insertado en el vector. El fenotipo de resistencia a arsénico se reconfirmó por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) según se describió<sup>[4]</sup>. Para estimar la resistencia a As(III) y antimonio [Sb(III)], cada inserto de ADN metagenómico que confería resistencia a As (V) fue transferido por transformación a la cepa de *E. coli* AW3110 hipersensible a arsénico, como huésped. Una vez obtenidos los nuevos clones, la resistencia se determinó por el método CMI empleando As(III) y Sb(III) a una concentración de 0.1mM, respectivamente.

### **Secuenciación de ADN**

Los clones seleccionados y con factibilidad de conferir resistencia fueron secuenciados y analizados mediante análisis informático. La secuenciación de los



El trabajo estudia las comunidades microbianas que habitan ambientes acuáticos ácidos altamente contaminados con metales pesados. En la foto, aguas contaminadas por un vertido procedente de una balsa de residuos tóxicos en Aznalcóllar (Sevilla).

fragmentos (insertos) de ADN (doble cadena) se realizó en la Unidad de Secuenciación del Centro de Astrobiología, empleando un equipo Abi 3730 XL de 48 capilares (Applied Biosystem) y el *kit* comercial Big Dye Terminator versión 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit, de acuerdo a protocolos pre-establecidos<sup>[4 y 5]</sup>. Análisis bioinformático. Las secuencias obtenidas se analizaron manualmente empleando las siguientes aplicaciones bioinformáticas: Editseq, Megalign, and Seqman correspondientes al paquete DNASTar Larsergene v8.0. Los ORFs (marcos de lectura abiertos para proteínas) fueron identificados usando otros programas diferentes: Vector NTI v9.0 (<http://www.invitrogen.com>), Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), y ORF Finder, disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador iCycler de Bio-Rad. Las enzimas que se emplearon fueron la Taq polimerasa (Promega) y Pfu Turbo DNA polimerasa (Stratagene). Las mezclas de reacción contenían MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM y dNTPs 0.2 mM. Como molde se utilizó ADN plasmídico (10 - 20 ng/μl). Los distintos oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR se añadieron a la concentración de 0.25 μM y todos fueron sintetizados por Secugen. La amplificación de fragmentos en el termociclador se realizó según protocolos estandarizados<sup>[4]</sup>. En muchas ocasiones la reacción de PCR se realizó a partir de ADN de una pequeña porción de una colonia sustituyendo al ADN genómico, en condiciones de esterilidad. Los productos amplificados, en cualquier caso, se



Latinstock

purificaron con el sistema QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

### Identificación del gen responsable de la actividad de resistencia a arsénico

Para identificar el (o los) gen(es) responsable(s) del fenotipo, se empleó la técnica de subclonaje, tal como se describió [4 y 5]. En una primera etapa, se diseñaron oligos específicos (cebadores de amplificación) para cada ORFs identificado (20 ORFs en total), empleando numerosas herramientas bioinformáticas: Editseq (correspondiente al paquete DNASTar Larsergene v8.0), Primer 3 Input v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), Transalte (<http://expasy.org/tools/>), etc. Se verificó en todos los casos que los oligos utilizados para la reacción de PCR solo hibridasen en la región deseada, evitando interacciones entre ellos. La temperatura de hibrida-

ción ( $T_m$ ) se situó en todos los casos por encima de 55° C. Cada ORFs fue amplificado por PCR y clonado en la cepa *E. coli* DH10B. La funcionalidad del gen para conferir resistencia a arsénica se analizó por el método CMI empleando As(V) 6 mM.

## Resultados

### Construcción de la metagenoteca, búsqueda del fenotipo de resistencia y análisis bioinformático

El ADN metagenómico se extrajo desde muestras de aguas del río ( $pH \leq 2,3$ ) y se construyeron bibliotecas metagenómicas empleando el vector pBluescript SKII++, *E. coli* DH10B como huésped y un tamaño promedio de fragmentos de ADN (inserto) de ~2 a 5 kb. En total, se obtuvieron 30.000 clones con un inserto de tamaño promedio estimado en 2.5 kb.

Se seleccionaron 116 clones al azar, que mostraron el fenotipo de resistencia a As en placas de medio mínimo con As(V) [6 mM]. El tamaño promedio de los insertos y sus perfiles de restricción

se determinaron mediante análisis de restricción (RFLP) utilizando combinaciones de endonucleasas específicas (*EcoRI/XbaI* y *XhoI/XbaI*). De estos, un total de 24 clones mostraron mayor resistencia a As(V) [20 mM] respecto a su cepa control (*E. coli* DH10B), en placas de cultivo. Dicho fenotipo fue confirmado también por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI). Asimismo, los clones fueron analizados en su capacidad para resistir arsenito [As(III)] y otros metales como el antimonio [Sb(III)]. Para ello, se debió transformar la estirpe *E. coli* AW3110 (sensible a arsénico) con los respectivos insertos que conferían el fenotipo de resistencia en As(V). Los resultados de CMI demostraron que 11 de estos clones son resistentes conjuntamente a As(V), As(III) y Sb (III) (Figura 2).

Estos últimos clones <sup>(11)</sup> fueron seleccionados para continuar con la secuenciación de sus fragmentos y el análisis bioinformático con el objetivo de detectar los ORFs (marcos de lectura abiertos de proteínas) que codificarían los genes responsables de conferir el fenotipo de resistencia (Tabla 1).

**Tabla 1.** Perfil de resistencia a arsénico y antimonio de clones seleccionados. En cruces de color rojo se muestran aquellos clones capaces de mantener su resistencia a arsénico y antimonio cuando se retransformaron en la cepa hipersensible a arsénico *E. coli* AW3110.

Clones	Longitud del inserto (PB)	Resistencia			
		<i>E. coli</i> DH10B	<i>E. coli</i> AW310		
		As <sup>+5</sup> 6 (mM)	As <sup>+5</sup> 0.5 (mM)	As <sup>+3</sup> 0.1 (mM)	Sb <sup>+3</sup> 0.1 (mM)
9	2226	++	++	++	++
11	2110	+++	+++	++	+++
14	3391	+++	++	+	+
27	3672	++	+	++	++
44	1507	+++	++	++	+++
49	1242	+++	+++	+++	+++
53	172	+++	+	+	+
57	2759	+++	+	+	+
71	2004	+++	+++	+++	+++
89	6024	+++	++	+	+
95	1720	+++	++	+	+

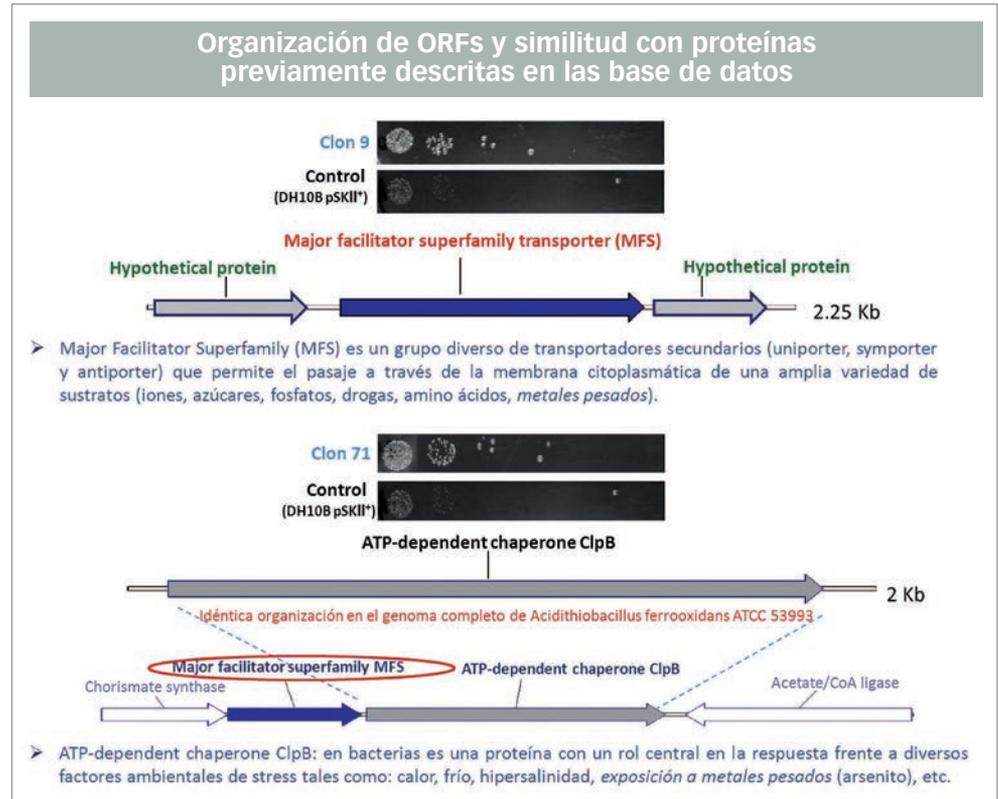
El análisis bioinformático de los fragmentos metagenómicos permitió encontrar la presencia de numerosos ORFs (que codifican para proteínas). En las figuras 3 y 4, se representa la organización genética de los diferentes ORFs detectados en clones con fenotipo de resistencia a arsénico. Algunos ORFs revelaron que:

- son similares a proteínas descritas previamente con funciones relacionadas a resistencia de metales pesados en bacterias (Figura 3).
- muestran nuevas funciones asociadas a resistencia de metales pesados (Figura 4).
- nunca antes fueron descritos en las bases de datos (proteínas hipotéticas o desconocidas (Figura 3).

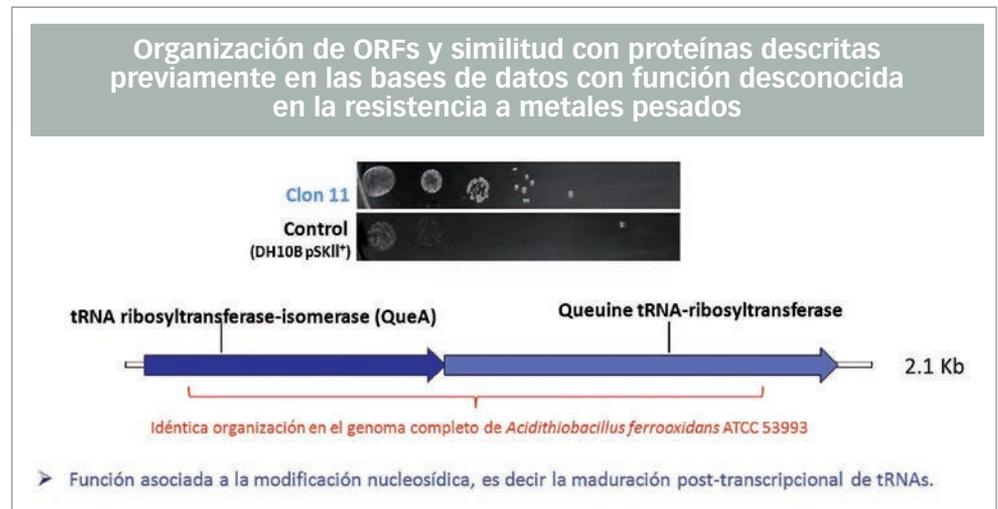
**Análisis funcional de la metagenoteca y validación del fenotipo de resistencia a arsénico**

Se procedió a la amplificación por PCR de cada ORF previamente identificado y el producto de cada PCR fue purificado desde geles de agarosa. Luego, se sub-clonaron independientemente empleando como huésped la cepa bacteriana *E. coli* DH10B según los protocolos de biología molecular pre-establecidos. Mediante esta aproximación, se obtuvieron 20 cepas transformadas de *E. coli* DH10B, las cuales fueron conservadas en glicerol a -80° C.

Posteriormente, se validó el fenotipo de resistencia a arsénico de cada ORF de manera independiente. Para ello, se empleó la metodología de concentración mínima inhibitoria previamente descrita (CMI). Los crecimientos por goteo se realizaron en placas de medio mínimo TRIS (pH=7.0) suplementadas con As(V) [6 mM]. La Figura 5 muestra como ejemplo el perfil de resistencia a As(V) de algunos de los ORFs subclonados respecto al mismo clon con inserto metagenómico completo y a los correspondientes controles (sin inserto y sin arsénico).



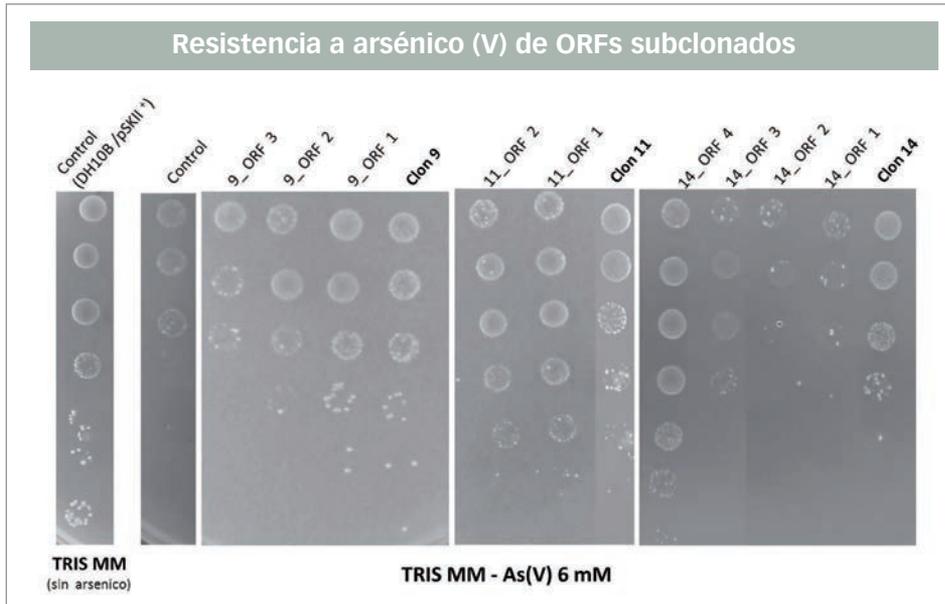
**Figura 3.** Diagrama de la organización genética de los ORFs detectados en los insertos de ADN de clones con resistencia a arsénico y antimonio. Organización genética de los ORFs en los clones 9 (A) y 71 (B), donde se observa la similitud con proteínas descritas en las bases de datos con funciones conocidas en la resistencia a metales pesados y otros genes que codifican funciones hipotéticas.



**Figura 4.** Diagrama de la organización genética de los ORFs detectados en el inserto de ADN del clon 11 con resistencia a arsénico y antimonio. La organización genética de los ORFs detectados revela similitud con proteínas descritas en las bases de datos, pero con funciones nunca antes implicadas en la resistencia a metales pesados.

En la Figura 6 se muestran los porcentajes de resistencia a arsénico (V) de todos los ORFs subclonados y la contribución de cada uno en su funcionalidad. En este aspecto, hemos observado que:

- algunos ORFs por sí solos, confieren una elevada resistencia a arsénico que es comparable a la resistencia otorgada por el inserto completo de ADN metagenómico, como



**Figura 5.** Perfil de resistencia a arsénico de los ORFs subclonados de tres clones resistentes a arsénico (clon 9; clon 11 y clon 14). La resistencia fue determinada por el método de concentración mínima inhibitoria respecto de la cepa control (*E. coli* DH10B) y los correspondientes clones con el inserto completo.

es el caso del ORF\_1 o el ORF\_2 del clon 11 y del ORF\_2 del clon 49.

- en otros clones, la resistencia a arsénico se debe a la función conjunta de al menos 2 ORFs. Por ejemplo: el ORF\_1 y ORF\_2 del clon 9; el ORF\_3 y ORF\_4 del clon 14, etc.
- algunos ORFs no serían funcionales cuando se expresan individualmente (por ejemplo ORF\_1 y ORF\_2 del clon 95), sino que la función en la resistencia a arsénico se asocia al fragmento metagenómico completo de ADN.

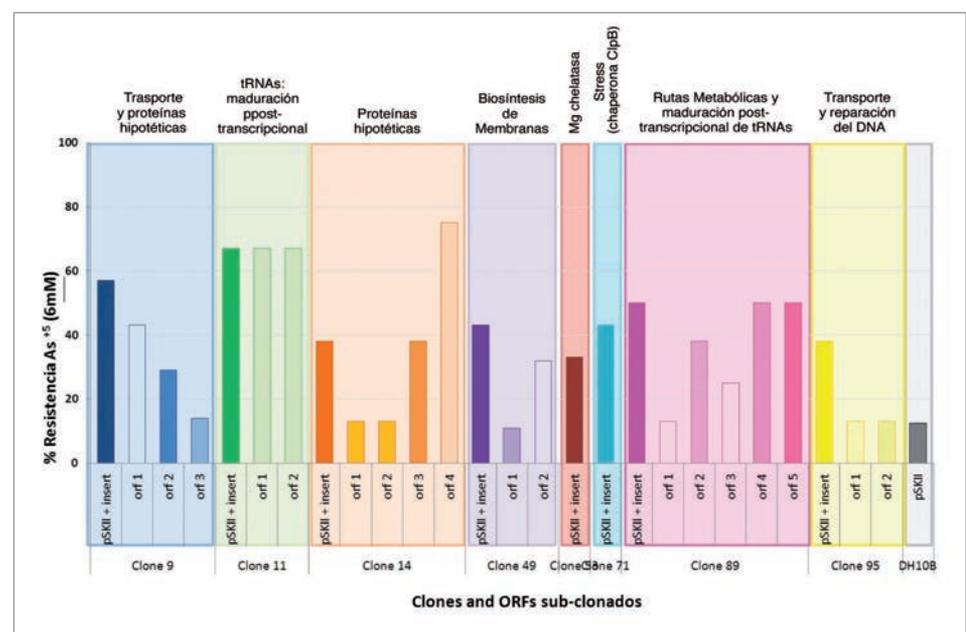
Por último, también se analizó la función global que desempeñan los genes subclonados en las bacterias, según las bases de datos (BALST, Pfam, etc.). En este aspecto, los fragmentos codificarían para proteínas que estarían involucradas en diferentes procesos celulares: transporte, biogénesis de membrana, maduración post-transcripcional, respuesta a estrés y reparación de DNA, etc. Muchos de estos procesos han sido descritos previamente por su rol en la resistencia a metales pesados (por ejemplo transporte, reparación del DNA, proteínas de estrés, etc.). Pero principalmente destacamos que este trabajo ha permitido, por pri-

mera vez, asignar a proteínas descritas una nueva función, ya que nunca antes habían sido implicadas en la resistencia a metales pesados (por ejemplo, proteínas implicadas en maduración post-transcripcional de tRNAs y biogénesis de membranas). También hemos podido deter-

minar que un alto porcentaje de los ORFs que otorgan elevada resistencia a arsénico corresponde a proteínas hipotéticas y de función desconocida.

## Discusión

Mediante este trabajo hemos identificado 20 genes diferentes obtenidos desde ADN metagenómico de un ambiente extremo: el río Tinto. Todos ellos fueron analizados en su estructura y función. La mayoría demostró estar asociado a la resistencia frente al arsénico. En términos generales, el análisis bioinformático permitió agruparlos según su función global en cinco procesos celulares diferentes: transporte, biogénesis de membrana, metabolismo energético, maduración post-transcripcional y respuesta a estrés. A esta clasificación se debe sumar una categoría adicional, que agrupa a las proteínas hipotéticas, las cuales también han demostrado una activa función en la resistencia a arsénico. Es



**Figura 6.** Contribución en la resistencia a arsénico (V) de cada ORF subclonado respecto al fragmento de ADN metagenómico completo. En cuadros de colores se distingue la función global de los genes detectados en la célula bacteriana, según las bases de datos (BLAST, Pfam, etc.).

### Muchos de los ORFs (marcos de lectura abiertos de proteínas) hallados en este trabajo resultaron ser proteínas nunca antes implicadas en la resistencia a metales pesados

decir, son proteínas que se predicen a partir de secuencias de ácidos nucleicos, pero se desconoce su función celular y no se ha demostrado su existencia mediante una evidencia experimental.

Podemos afirmar que nuestros resultados concuerdan con los descritos por Bertin *et al.*, 2011, quienes mediante aproximaciones de metagenómica y metaproteómica también identificaron numerosas proteínas pertenecientes a diversas familias (por ejemplo, transporte, respuesta a estrés, metabolismo energético, etc.) en ambientes enriquecidos en arsénico [7].

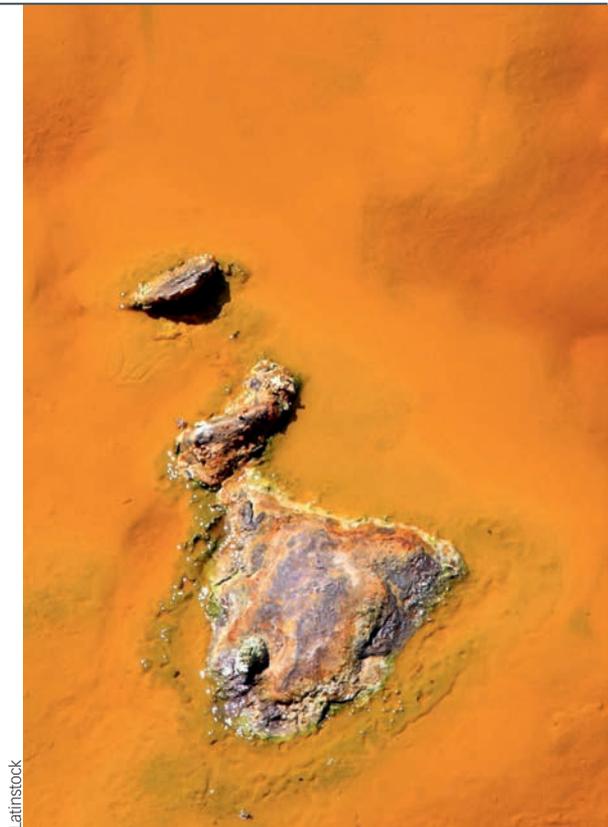
Entre los genes detectados y que estarían implicados en la resistencia a arsénico (y/o vinculados previamente a metales pesados), encontramos aquellos asociados a transporte (miembros de la familia de transportadores MFS como el ORF\_1 del clon 9 y ORF\_1 del clon 95). En cuanto a los mecanismos de transporte, se sabe que el As no juega ningún papel metabólico o nutricional en bacterias, por lo que, las células no han desarrollado ningún sistema específico para el ingreso del mismo al medio intracelular. No obstante, se demostró que el arsénico entra en las células de manera indirecta, a través de diferentes transportadores por la analogía de las especies químicas con otras moléculas. En concreto, el As(V) es un oxianión químicamente muy parecido al fosfato y entra a las células de *E. coli* mediante los sistemas Pit (transportador de fosfato) y PST (transportador específico de fosfato) [8]. En este caso del As(III), este es transportado al interior de las células a través de una rama de la superfamilia de transportadores aquaporinas (agua-glicerolporinas) como GlpF en *E. coli* [9].

Respecto a los genes asociados a res-

puesta a estrés celular (chaperona ClpB en el clon 71) y reparación de daño al ADN (ADN glycosylasa en el ORF\_2 del clon 95), estos también revelaron conferir resistencia a arsénico. Dichos genes han demostrado previamente estar involucrados en respuesta a estrés y daño celular (en procariotas y eucariotas) provocado por la exposición a altas o bajas temperaturas, metales pesados, etc., previniendo el agregado y desnaturalización de proteínas o cumpliendo una función de escisión y reparación de bases nitrogenadas dañadas por oxidación, respectivamente [10 y 11].

Estas observaciones dejan abierta la posibilidad de que otros sistemas de transporte de solutos, como los transportadores y permeasas hallados en esta investigación, así como los genes involucrados en la reparación al ADN y respuesta a estrés, y otros no identificados hasta el momento (proteínas hipotéticas), puedan ser operativos también para la entrada de As(V) y As(III) en bacterias.

Como ya se mencionó, otro grupo importante de los genes identificados en nuestro trabajo desempeña funciones celulares muy bien estudiadas hasta ahora, pero nunca antes habían sido implicados en la resistencia a arsénico ni a otros metales pesados. Tal es el caso de genes involucrados en la modificación posttranscripcional de tRNAs (ambos ORFs del clon 11 y ORF\_4 del clon 89) y en síntesis de membranas (ambos ORFs del clon 49). Respecto de la modificación posttranscripcional de tRNAs por Queuosina (Q), a pesar de haber realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no hemos encontrado investigaciones que describan el rol de los tRNAs en la resistencia a metales pesados y en particular a



Latinstock

Las aguas rojizas del río Tinto se caracterizan por un pH muy ácido, con alto contenido en metales pesados (hierro, cobre, cadmio, etc.).

arsénico, siendo nuestros resultados una evidencia inédita. Algunos investigadores, describieron el proceso de hiper-modificación por (Q) del ARN de transferencia como mecanismo de maduración posttranscripcional en células eucariotas y bacterianas [12 y 13]. En eucariotas, dicho proceso estaría implicado en la diferenciación celular, mientras que en bacterias lo estaría en la supervivencia durante algunas situaciones de estrés y pérdida de la virulencia, respectivamente [14]. Estos últimos corresponden a experimentos aislados, que hasta la fecha no conducen a interpretar de manera global el rol de la maduración de tRNAs por Q en otros procesos fisiológicos bacterianos.

Por otra parte, los fosfolípidos de membrana juegan un rol crucial en la mantención de la integridad de la membrana como barrera de protección con el medio ambiente (síntesis o degradación de fosfolípidos), en la regulación de ciertos procesos celulares (como translación de proteínas, replicación, etc.), así como en la transducción de señales (activación o inactivación de enzimas) ante situacio-

nes ambientales adversas <sup>[15]</sup>. En este complejo mecanismo homeostático están involucradas numerosas enzimas, siendo algunas de las principales la diacyl-glicerol-kinasa (DAGK) y la fosfolípido fosfatasa (PAP), responsables de regular la síntesis de fosfolípidos y la desfosforilación de los mismos, (ORF\_1 y ORF\_2 del clon 49, respectivamente). En este contexto, la homeostasis de la membrana fosfolipídica es cuidadosamente regulada en bacterias como respuesta a situaciones ambientales adversas (temperatura, osmolaridad, luz, carencia de nutrientes, pH, etc.) <sup>[16]</sup>, pero hasta la fecha no se ha determinado la función de dichas enzimas en la respuesta específica a situaciones de estrés causada por metales pesados y/o arsénico.

Un desafío actual para la ciencia (en la era de la metagenómica) es profundizar en el estudio de las proteínas hipotéticas <sup>[17]</sup>, siendo de suma importancia para: a) completar la información genómica y proteómica de los organismos secuenciados, b) proveer a las bases de datos bioinformáticas con información más certera, y c) descubrir nuevas estructuras y conformaciones desconocidas, así

como nuevos dominios y motivos que contribuirán al desarrollo biotecnológico y de la biomedicina (por ejemplo, marcadores genéticos, dianas farmacológicas, etc.).

En conclusión, los nuevos genes implicados en la resistencia a arsénico que han sido identificados en este trabajo plantean nuevas inquietudes para ser estudiadas en investigaciones futuras. Por ejemplo, poder identificar el mecanismo completo o realizar con ellos una aplicación concreta en biomedicina y biotecnología, específicamente en biorremediación y fitorremediación, por ejemplo, confiriendo a plantas la capacidad de adaptación y tolerancia a la contaminación por arsénico.

## Conclusiones

- Ha sido posible extraer el ADN metagenómico de comunidades bacterianas de muestras de aguas ácidas provenientes del nacimiento del río Tinto.
- Los fragmentos metagenómicos de ADN clonados desde aguas ácidas confieren resistencia a las diferentes for-

mas inorgánicas de arsénico [As(V) y As(III)] y a antimonio [Sb(III)].

- Los insertos de ADN presentes en los clones con fenotipo resistente, revelaron la presencia de numerosos ORFs (marcos de lectura abiertos) que codifican para proteínas con funciones conocidas, hipotéticas o desconocidas.
- Los ORFs que estarían involucrados en la resistencia a arsénico corresponden a proteínas que participan en diferentes procesos celulares: transporte, biogénesis de membrana, maduración post-transcripcional, estrés y reparación de DNA, etc.
- Notablemente, muchos de los ORFs hallados en este trabajo resultaron ser proteínas nunca antes implicadas en la resistencia a metales pesados.
- Los resultados de este trabajo contribuyen a un mejor conocimiento de la microbiota nativa de ambientes extremos. El empleo de las capacidades microbianas es relevante para la descontaminación de ambientes contaminados con arsénico y otros metales pesados, particularmente el agua como elemento esencial para el desarrollo de la vida. ♦

## PARA SABER MÁS

- |   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| <p>[1] Páez-Espino D., Tamames J., De Lorenzo V. y Cánovas D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. <i>Biometals</i> (2009) 22:117–130</p> <p>[2] Silver S. y Phung L.T. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 71:599–608.</p> <p>[3] López-Archilla A.I., Marín I. y Amils R. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. <i>Microbial Ecol.</i> 41: 20-35.</p> <p>[4] Mirete S., de Figueras C. y González-Pastor J.E. 2007. Novel nickel-resistance genes from the rhizosphere metagenome of acid rock drainage-adapted plants. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 73: 6001-6011.</p> | <p>[5] González-Pastor J.E. y Mirete S. 2010. Novel Metal resistance genes from microorganisms: a functional metagenomic approach. «Molecular Methods in Metagenomics», R. Daniel y W. Streit, eds. Springer Verlag, Germany.</p> <p>[6] Nies D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 51: 730-750.</p> <p>[7] Bertin P.N. <i>et al.</i> 2011. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. <i>ISME J.</i> 5: 1735–1747.</p> <p>[8] Willsky G.R. y Malamy M.H. 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in <i>Escherichia coli</i>. <i>J Bacteriol</i> 144: 366?374.</p> <p>[9] Meng Y.L., Liu Z. y Rosen B.P. 2004. As(III) and Sb(III) uptake by</p> | <p>GlpF and efflux by ArsB in <i>Escherichia coli</i>. <i>J Biol Chem</i> 279: 18334?18341.</p> <p>[10] Sanchez Y., Taulien J., Borkovich K.A. y Lindquist S.L. 1992. HSP104 is required for tolerance to many forms of stress. <i>EMBO J.</i> 11:2357–2364.</p> <p>[11] Zharkov D.O. 2008. Base excision DNA repair. <i>Cell Mol Life Sci.</i> 65(10):1544-65.</p> <p>[12] Gaur R., Björk G.R., Tuck S. y Varshney U. 2007. Diet-dependent depletion of queuosine in tRNAs in <i>Caenorhabditis elegans</i> does not lead to a developmental block. <i>J Biosci.</i> 32(4):747-54.</p> <p>[13] Reader J.S., Metzgar D., Schimmel P. y de Crécy-Lagard V. 2004. Identification of four genes necessary for biosynthesis of the modified nucleoside queuosine. <i>J.</i></p> | <p><i>Biol. Chem.</i> 279, 6280-6285</p> <p>[14] Iwata-Reuyl D. 2003. Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. <i>Bioorg Chem.</i> 31(1):24-43.</p> <p>[15] Wahl A., My L., Dumoulin R., Sturgis J. y Bouveret E. 2011. Antagonist regulation of plsB and dgkA genes of phospholipid synthesis by multiple stress responses in <i>Escherichia coli</i>. <i>Mol Microb.</i> 80(5): 1260-1275.</p> <p>[16] Cozzone J. 1997. Diversity and specificity of protein-phosphorylating systems in bacteria. <i>Folia Microbiológica.</i> 42(3):165-170</p> <p>[17] Lubec G., Afjehi-Sadat L., Yang J.W., Pradeep John J.P. 2005. Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. <i>Prog. Neurobiol</i> 77:90–127.</p> |
|---|--|---|---|