
**Identificación de nuevos
mecanismos moleculares de
resistencia a arsénico
en microorganismos adaptados
a ambientes acuáticos altamente
contaminados con metales pesados**

**Verónica Morgante
y col.**

Ayudas a la investigación 2010

Investigador Principal

Verónica Morgante

Licenciada en Microbiología (2002)

Doctora en Biotecnología (2009)

Investigador Post-Doctoral en el Centro de Astrobiología (actual)

Equipo Investigador

José Eduardo González Pastor

Licenciado en Ciencias Biológicas (1990)

Doctor en Biología (1998)

Investigador Contratado en el Centro de Astrobiología (actual). Jefe de Área de Ambientes Controlados - Laboratorio de Ecología Molecular

CENTRO DE ASTROBIOLOGÍA (INTA-CSIC)

Laboratorio de Ecología Molecular - Área de Ambientes Controlados.

Carretera de Ajalvir km 4

Torrejón de Ardoz (28850)

Madrid - ESPAÑA

Fono: +34 91 520 6471

Fax: +34 91 520 1074

Índice

	Página
Abreviaturas	4
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. El arsénico en el ambiente	4
1.2. El río Tinto: un ambiente extremo de origen biológico	4
1.3. Metagenómica funcional	6
2. OBJETIVOS Y ALCANCE	6
3. MATERIALES Y METODOS	6
4. RESULTADOS	8
4.1. Construcción de la metagenoteca	8
4.2. Selección de clones con fenotipo de resistencia a arsénico	8
4.3. Análisis bioinformático del ADN metagenómico	9
4.4. Análisis funcional de la metagenoteca: validación del fenotipo de resistencia a arsénico	11
5. DISCUSIÓN	13
6. CONCLUSIONES	15
7. BIBLIOGRAFIA	15

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
As	Arsénico
As(III)	Arsenito
As(V)	Arseniato
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
IPTG	Isopropil – β – D – tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
ORFs	Open Reading Frame (marco de lectura abierto de proteínas)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente
pH	Acidez
PH	Proteínas hipotéticas
PD	Proteínas desconocidas
rpm	Revoluciones por minuto
Sb(III)	Antimonio
X-gal	5 – Bromo – 4 – cloro – 3 – indolil – D – galactopiranosido
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia.

RESUMEN

En este proyecto se estudiaron las comunidades microbianas que habitan ambientes acuáticos ácidos ($\text{pH} \leq 3$) altamente contaminados con metales pesados. Concretamente, mediante una aproximación de metagenómica funcional, se identificaron nuevos mecanismos moleculares de resistencia a arsénico (As).

Las muestras de ADN metagenómico fueron obtenidas desde agua proveniente de la zona del nacimiento del río Tinto (Huelva, España). Numerosos clones, conteniendo los fragmentos de dicho ADN, mostraron una mayor resistencia a las diferentes formas inorgánicas de As (arsenato y arsenito) y también a antimonio, respecto a la cepa control. El análisis bioinformático de las secuencias de ADN reveló la presencia de diferentes ORFs (marcos de lectura abiertos de proteínas) que codificarían los genes responsables de conferir el fenotipo de resistencia. Cada ORF fue sub-clonado y se comprobó su perfil de resistencia. Algunos de estos ORFs, han sido descritos previamente por su rol en la resistencia a metales pesados (por ejemplo: transporte, reparación del DNA, respuesta a estrés, etc.). Pero principalmente destacamos, que este trabajo ha permitido por primera vez, asignar a proteínas previamente descritas una nueva función ya que nunca antes habían sido implicadas en la resistencia a metales pesados (por ejemplo: proteínas involucradas en maduración post-transcripcional de tRNAs y biogénesis de membranas).

Los resultados de este trabajo contribuyen con un mejor conocimiento de la microbiota nativa de ambientes acuáticos extremos. El empleo de las capacidades microbianas, son relevantes para la descontaminación de

ambientes contaminados con arsénico y otros metales pesados, particularmente el agua como elemento esencial para el desarrollo de la vida.

PALABRAS CLAVES: metagenómica funcional, microorganismos, resistencia, arsénico, metales pesados, río Tinto.

1. INTRODUCCION

1.1. El arsénico en el ambiente

El 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, donde que el arsenito [As(III)] y arseniato [As(V)] son las formas inorgánicas más abundantes en el ambiente. 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, sorprendentemente algunos de ellos son capaces de utilizarlo, o incluso requieren de arsénico para su fisiología normal [1]. La mayoría de los mecanismos de resistencia, han sido descritos en microorganismos cultivables (Figura 1). En bacterias, la reducción de As(V) ocurre como un proceso respiratorio o como parte de un mecanismo de resistencia, mientras que la oxidación del As(III) se asocia al crecimiento quimioautótrofo o a mecanismos de desintoxicación celular [2]. El arsénico también puede ser transportado al interior de la célula (mediante mecanismos inespecíficos) donde se modifica su estado de oxidación para bajar la toxicidad, y luego es expulsado al exterior a través de mecanismos específicos (actividad enzimática). Por otra parte, las formas inorgánicas de arsénico pueden ser acomplejadas en residuos de cisteína de péptidos, o sufrir metilación formando compuestos orgánicos y volátiles.

1.2. El río Tinto: un ambiente extremo de origen biológico

Nuestro sistema de estudio se encuentra en las aguas ácidas que forman parte del nacimiento del río Tinto, localizado en Huelva, España. Debe su nombre al color de sus

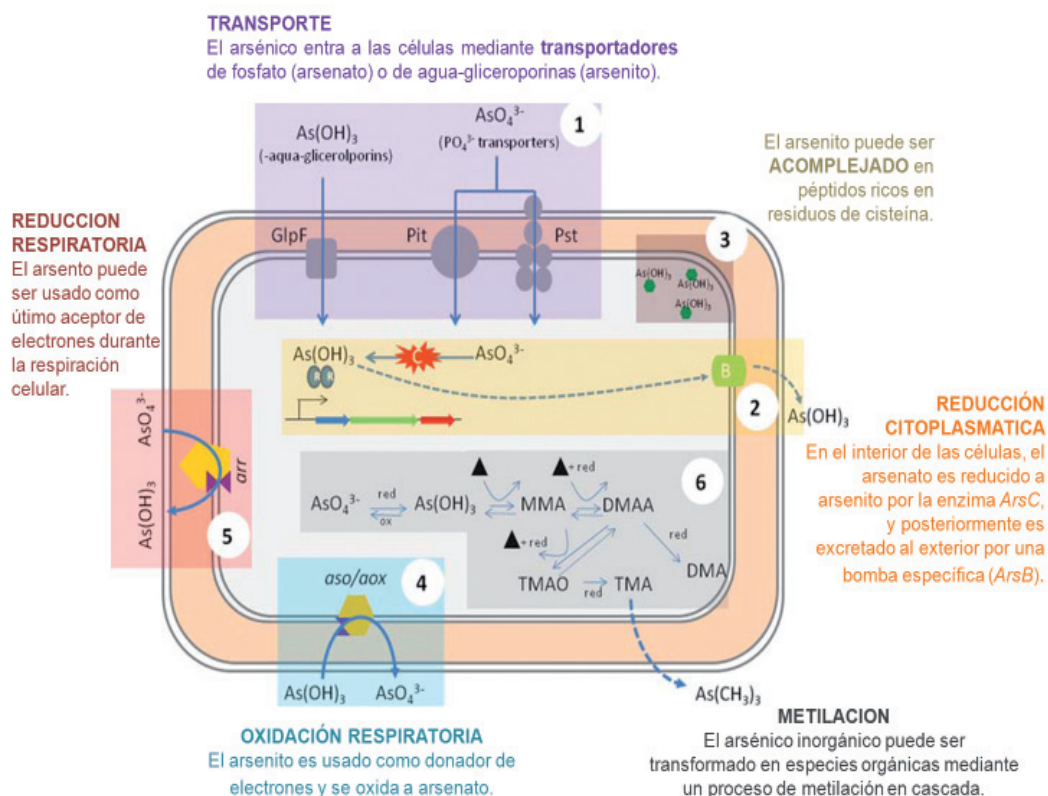


Figura 1. Principales mecanismos de transformación de arsénico y resistencia en bacterias. (1) El arsénico entra en la célula a través de los canales de fosfato (arseniato) o de agua-glicerolporinas (arsenito). (2) Una vez en el interior de las células, el arsenato es reducido a arsenito a través de *ArsC*, para posteriormente ser expulsado a través de *ArsB*. (4) El arsenito puede utilizarse 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].

aguas rojas, que contienen un elevado contenido de hierro (Figura 2). Pese a la intensa actividad minera, el río ha formado un ambiente de drenaje ácido natural que lleva funcionando aproximadamente 2 m.a. de antigüedad. Por lo general, es un río de poco caudal salvo en episodios no demasiado frecuentes de lluvias torrenciales. En gran parte de su recorrido el cauce es ancho y el agua que fluye forma una lámina somera mientras que, en otros lugares del río, se forman pozas o el camino del agua se ve retenido durante algún tiempo debido a la existencia de pequeñas presas a lo largo de su cauce (Figura 2).

La singularidad de la zona reside en sus características geológicas y en la riqueza de sus minerales (vetas de pirita, calcopirita, gossan y otros minerales complejos de azufre). Estos compuestos son muy estables, pero cuando se encuentran en contacto con el oxígeno o con el agua ofrecen a ciertos organismos los recursos necesarios para desarrollarse, formando un hábitat muy especial [3]. 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 mgL^{-1} [4]. Se trata de un sistema natural, muy heterogéneo y donde, a pesar de las condiciones extremas, se observa la proliferación de comunida-

des microbianas, entre ellas bacterias quimiolitótrofas, principalmente oxidadoras de hierro y azufre (como por ejemplo: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*).



Figura 2. Río Tinto. Cauce de agua en zonas cabeceras (nacimiento). Se observa la formación de pozas de agua con la coloración rojiza que lo caracteriza.

1.3. Metagenómica funcional

Diversos estudios realizados en los últimos años, indican que sólo un porcentaje muy pequeño de los microorganismos existentes en el ambiente (aproximadamente el 1%), se puede cultivar. Una causa de ello, es que mediante las tradicionales técnicas de cultivo cerrado limitamos los requerimientos nutricionales para su crecimiento que se encuentran exclusivamente en su medio natural. Como consecuencia, se han desarrollado nuevas tecnologías cultivo-independiente que permiten estudiar aquella fracción de las comunidades microbianas que había permanecido ignorada por la microbiología.

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. Se obtiene así toda la información genética, sin necesidad de aislar individualmente cada uno de los microorganismos nativos. El conjunto de genes de un organismo se denomina genoma, y al conjunto de genomas de una comunidad entera de microorganismos se ha denominado metagenoma. De esta forma, si la colección de genomas es almacenado en bacterias fácilmente manipulables en el laboratorio obtenemos una biblioteca metagenómica [6].

Particularmente, las comunidades microbianas que habitan ambientes extremos, constituyen un gran reservorio genético (diversidad funcional). 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 concretas aplicaciones biotecnológicas y en biomedicina [7 y 8].

2. OBJETIVO Y ALCANCE

La presente propuesta de 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

un caso particular el arsénico. 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 arsénico 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).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se tomaron muestras de aguas ácidas desde la zona del nacimiento del río Tinto (Huelva, España), según la geografía del lugar descrita [4]. Se recogieron en total 2 L de los cuales, aproximadamente 100 mL se destinaron para análisis físico-químicos del agua (pH , cuantificación de metales pesados, etc.). El resto de la muestra se destinó a su preparación para extracción de ADN. Primero se filtró en poros de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore). El agua remanente luego se centrifugó y se recogió el pellet (fracción de células microbianas). El filtro y pellet conteniendo las células microbianas se guardó a -80°C , para el posterior procesamiento acorde a protocolos de extracción de ADN metagenómico.

Cepas bacterianas, medio de cultivos y conservación

Las cepas de *E. coli* (DH10B y AW3110) se cultivaron a 37°C , respectivamente, en un agitador orbital a 170 rpm. El medio rico utilizado para cultivar todas las cepas fue Luria-Bertani (LB). Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB suplementado con Agar Noble (Difco) al 1.5 % (p/v). También se empleó el medio mínimo TRIS ($\text{pH} = 7$), especialmente diseñado para experimentos con metales pesados [5]. Cuando fue necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- β -galactopiranosido (IPTG) a una concentración entre 1 y 0.01 mM. 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°C y/o -80°C .

Extracción de DNA metagenómico

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°C .

Elaboración y validación de la biblioteca metagenómica

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 un digestión parcial del DNA me-

tagenómico extraído con enzimas de corte frecuente, como *SauIII*A. Posteriormente, se empleó el vector pBluescript (pSKII⁺) y la cepa *Escherichia coli* DH10B como huésped para la expresión de los genes ambientales, siguiendo los protocolos pre-establecidos en nuestro laboratorio [7 y 8]. En total, se obtuvieron 30.000 clones con un inserto de tamaño promedio estimado en 2.5 kb. Para validar la biblioteca se realizaron las siguientes pruebas:

- Se examinó el porcentaje de clones con inserto. En el caso del vector pSKII⁺ las colonias con inserto se pueden distinguir de las que no lo tienen por su coloración en placas con IPTG/X-gal (selección de colonias blancas-azules).
- Se estimó el tamaño medio de los insertos (analizar entre el 0.5 y 5% de los clones) mediante digestión con enzimas de restricción (RFLP).

La estrategia molecular empleada para la construcción, validación y análisis funcional de las metagenotecas de agua ácida de río Tinto se esquematiza en la Figura 2.

Búsqueda de actividades enzimáticas en las librerías metagenómicas

Una vez construidas estas librerías metagenómicas se analizaron para detectar actividades enzimáticas que proporcionen resistencia a arsénico. La librería se plaqueó en medio mínimo TRIS [5] para metales con en 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 re-confirmó por el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) según se describió [7]. 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. La cepa AW3110 se caracteriza genéticamente por la delección del operón *ars* de resistencia a arsénico (Δ *arsRBC*). 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 insertos de ADN metagenómico de los clones seleccionados y con factibilidad de conferir resistencia fueron secuenciados y analizados mediante herramientas bioinformáticas. La secuenciación de los 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 version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit, de acuerdo a protocolos pre-establecidos [7 y 8].

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>). Para la traducción a proteínas de la secuencia nucleotídica se utilizó el código genético bacteriano empleando los codones ATG, GTG, and TTG como inicio y la herramienta Translate (del Expasy Bioinformatics Resource Portal, <http://expasy.org/tools/>). Todos los ORFs detectados y superiores a 90 pb fueron traducidos y analizados mediante BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para la identificación de proteínas descritas en las bases de datos.

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 polymerase (Stratagene). Las mezclas de reacción contenían MgCl₂ 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*. El protocolo base de amplificación en el termociclador fue: (i) Desnaturalización inicial (4 min a 95°C). (ii) 25 ciclos de: desnaturalización (45 seg a 95°C), hibridación (45 seg a T_m del oligo) y extensión (a 72°C, el tiempo de extensión dependió del tamaño del fragmento a amplificar). (iii) Extensión final (7 min a 72°C). 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 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) responsables del fenotipo, se empleó la técnica de sub-clonaje, tal como se describió [8]. En una primera etapa, se debió diseñar oligos específicos (cebadores de amplificación) para cada ORFs identificado (20 ORFs en total). El diseño de oligos se realizó de manera específica, 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 sólo hibridasen en la región deseada, así como evitar interacciones entre ellos. La temperatura de hibridación (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.

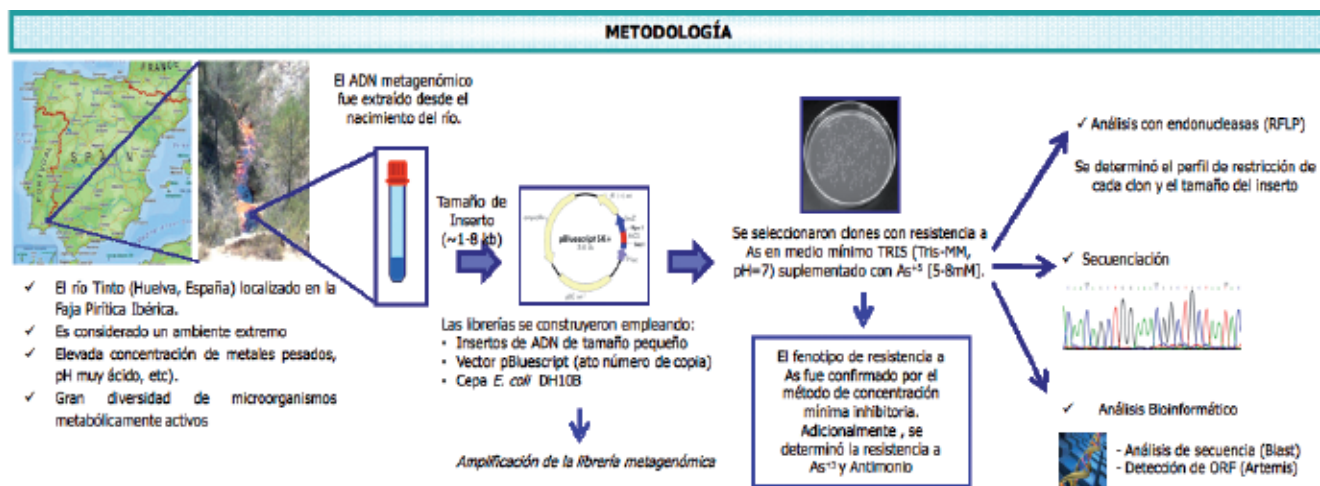


Figura 1. Estrategia metagenómica empleada para la identificación funcional de genes con resistencia a arsénico en las comunidades microbianas de aguas ácidas del Río Tinto.

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de la biblioteca metagenómica

El arsénico es un metaloide, siendo el $As(III)$ y $As(V)$ sus formas inorgánicas más abundantes en la naturaleza. Los microorganismos son los principales responsables de la biotransformación y movilización del As en el ambiente. En este trabajo, se estudiaron las comunidades microbianas de un ambiente extremo ácido (río Tinto, España) para identificar nuevos genes implicados en la resistencia arsénico. Para ello se empleó una aproximación de metagenómica funcional tal como se muestra en la (Figura 1).

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. 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*) (Figura 2).

4.2. Selección de clones con fenotipo de resistencia a arsénico

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 3).

Estos últimos clones (11) fueron seleccionados para continuar con la secuenciación de sus fragmentos y el

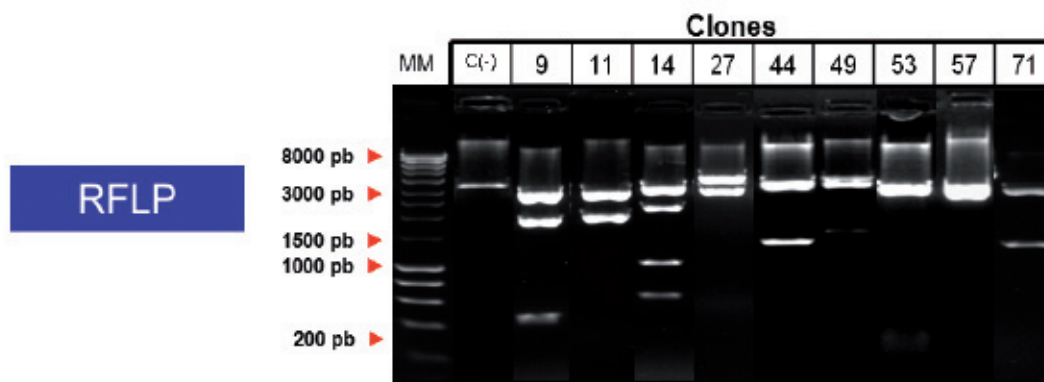


Figura 2. Perfil de restricción (RFLP) de clones con fenotipo de resistencia a arsenato [$As(v)$]. Se realizó una digestión doble con endonucleasas (*XhoI* y *XbaI*). C(-): control negativo (cepa *E. coli* DH10B); MM: marcador molecular (1kb).

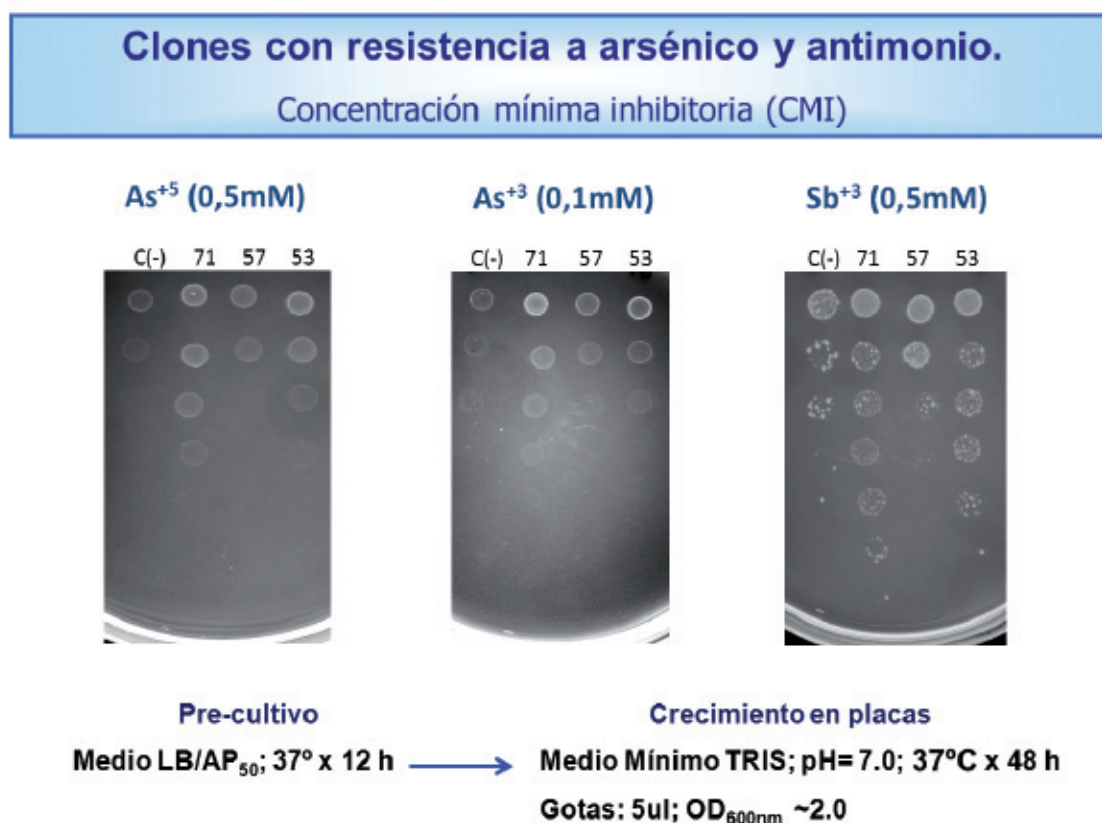


Figura 3. Resistencia a arsénico [As (V) y As (III)] y antimonio de clones obtenidos mediante técnicas metagenómica. La resistencia fue determinada por el método de concentración mínima inhibitoria respecto de la cepa control (*E. coli* AW3110). C(-): control negativo.

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 re-transformaron en la cepa hipersensible a arsénico *E. coli* AW3110.

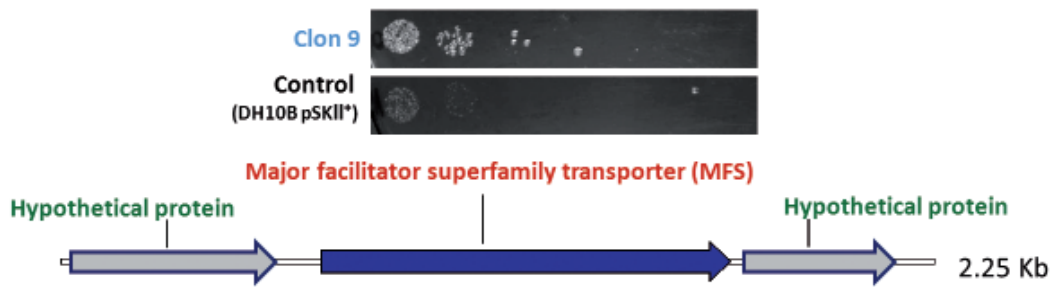
Clones	Longitud del inserto (pb)	RESISTENCIA			
		<i>E. coli</i> DH10B	<i>E. coli</i> AW3110		
		As ⁺⁵ 6 (mM)	As ⁺⁵ 0.5 (mM)	As ⁺³ 0.1 (mM)	Sb ⁺³ 0.1(mM)
9	2226	++	++	++	++
11	2110	+++	+++	++	+++
14	3391	+++	++	+	+
27	3672	++	+	++	++
44	1507	+++	++	++	+++
49	1242	+++	+++	+++	+++
53	172	+++	+	+	+
57	2759	+++	+	+	+
71	2004	+++	+++	+++	+++
89	6024	+++	++	+	+
95	1720	+++	++	+	+

4.3. Análisis bioinformático del ADN metagenómico

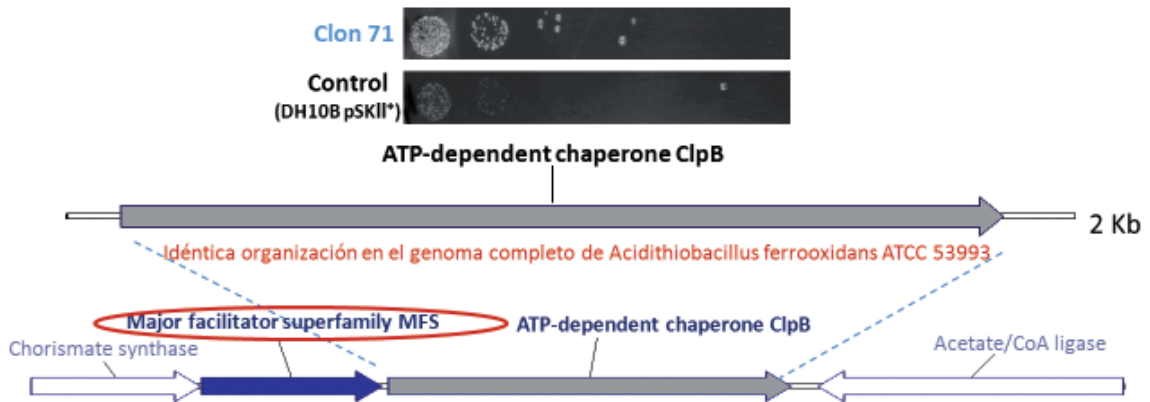
El análisis bioinformático de los fragmentos metagenómicos permitió encontrar la presencia de numerosos ORFs (que codifican para proteínas). En las Figuras 4-6 se representa la organización genética de los diferentes ORFs detectados en clones con fenotipo de resistencia a arsénico. Algunos ORFs revelaron que:

- son similares a proteínas descritas previamente con funciones relacionadas a resistencia de metales pesados en bacterias, (Figura 4).
- muestran *nuevas funciones* asociadas a resistencia de metales pesados, (Figura 5).
- nunca antes fueron descritos en las bases de datos (proteínas hipotéticas o desconocidas, en las Figuras 4 y 6).

Organización de ORFs y similitud con proteínas previamente descritas en las bases de datos.



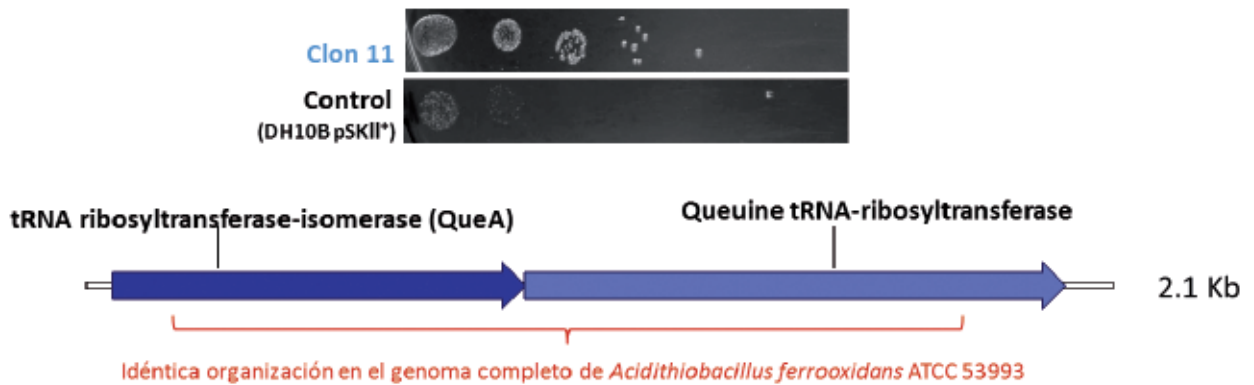
- Major Facilitator Superfamily (MFS) es un grupo diverso de transportadores secundarios (uniporter, symporter y antiporter) que permite el pasaje a través de la membrana citoplasmática de una amplia variedad de sustratos (iones, azúcares, fosfatos, drogas, amino ácidos, *metales pesados*).



- ATP-dependent chaperone ClpB: en bacterias es una proteína con un rol central en la respuesta frente a diversos factores ambientales de stress tales como: calor, frío, hipersalinidad, *exposición a metales pesados* (arsenito), etc.

Figura 4. 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.

Organización de ORFs y similitud con proteínas descritas previamente en las bases de datos con función desconocida en la resistencia a metales pesados.



- Función asociada a la modificación nucleosídica, es decir la maduración post-transcripcional de tRNAs.

Figura 5. 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.

Organización de los ORFs en otros clones resistentes a arsénico

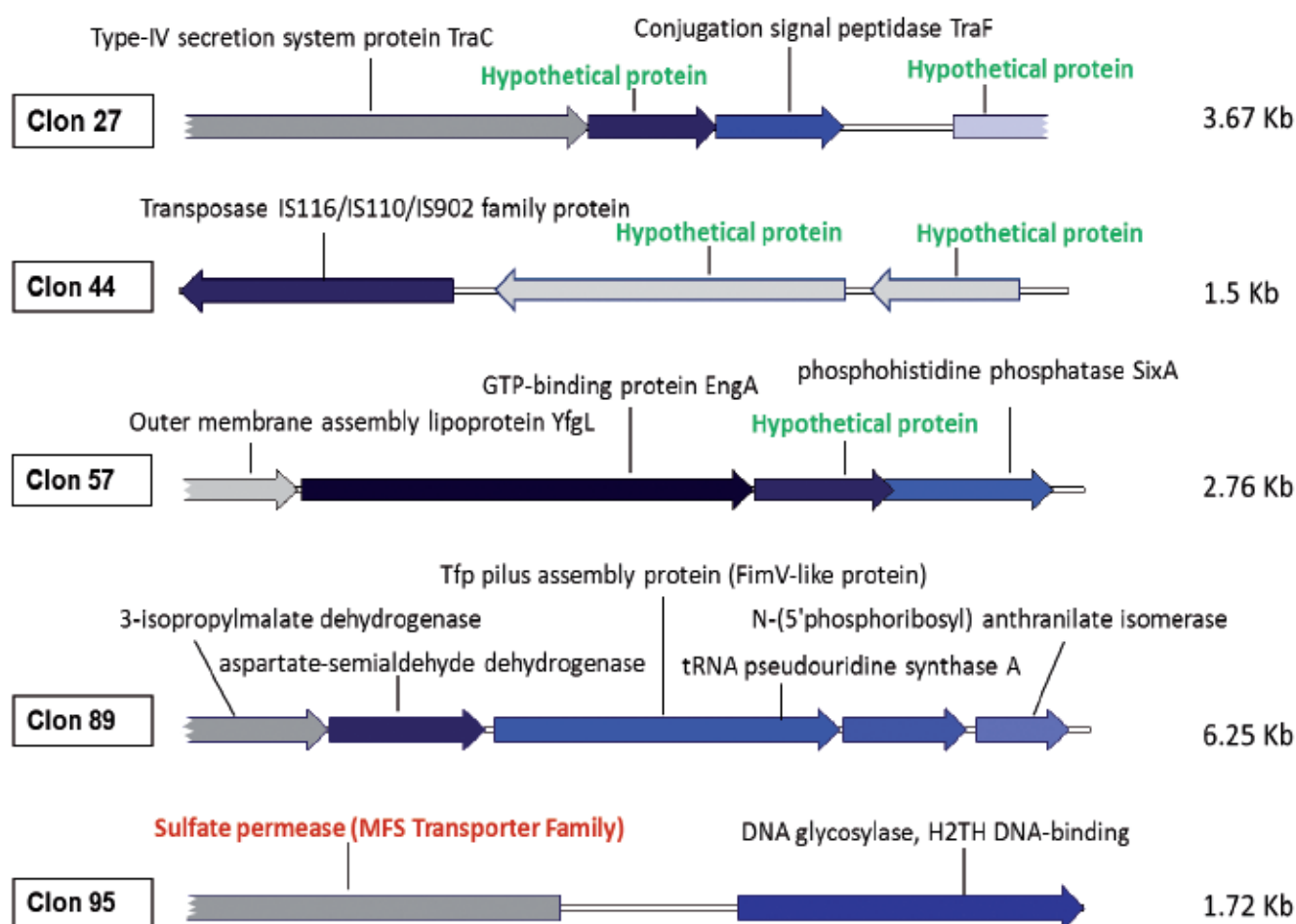


Figura 6. Diagrama de la organización genética de los ORFs detectados en los insertos de ADN de otros clones con resistencia a arsénico y antimonio. En color rojo se muestran aquellos ORFs previamente descritos en las bases de datos con funciones conocidas en resistencia a metales pesados. En verde se destacan los genes con funciones hipotéticas y nunca antes descritas. En negro se muestran los genes identificados con funciones conocidas *per nunca antes implicadas con la resistencia a metales pesados*.

4.4. Análisis funcional de la metagenoteca: validación del fenotipo de resistencia a arsénico

Durante la última fase de esta investigación, se trabajó en el sub-clonaje de 20 ORFs diferentes. Para ello, se diseñaron primers (cebadores de amplificación) de manera específica empleando las herramientas bioinformáticas apropiadas (Editseq, Primer 3 Input v0.4.0, etc.). Se procedió a la amplificación por PCR de cada fragmento 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 aproxima-

ción, 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 N° 7, 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).

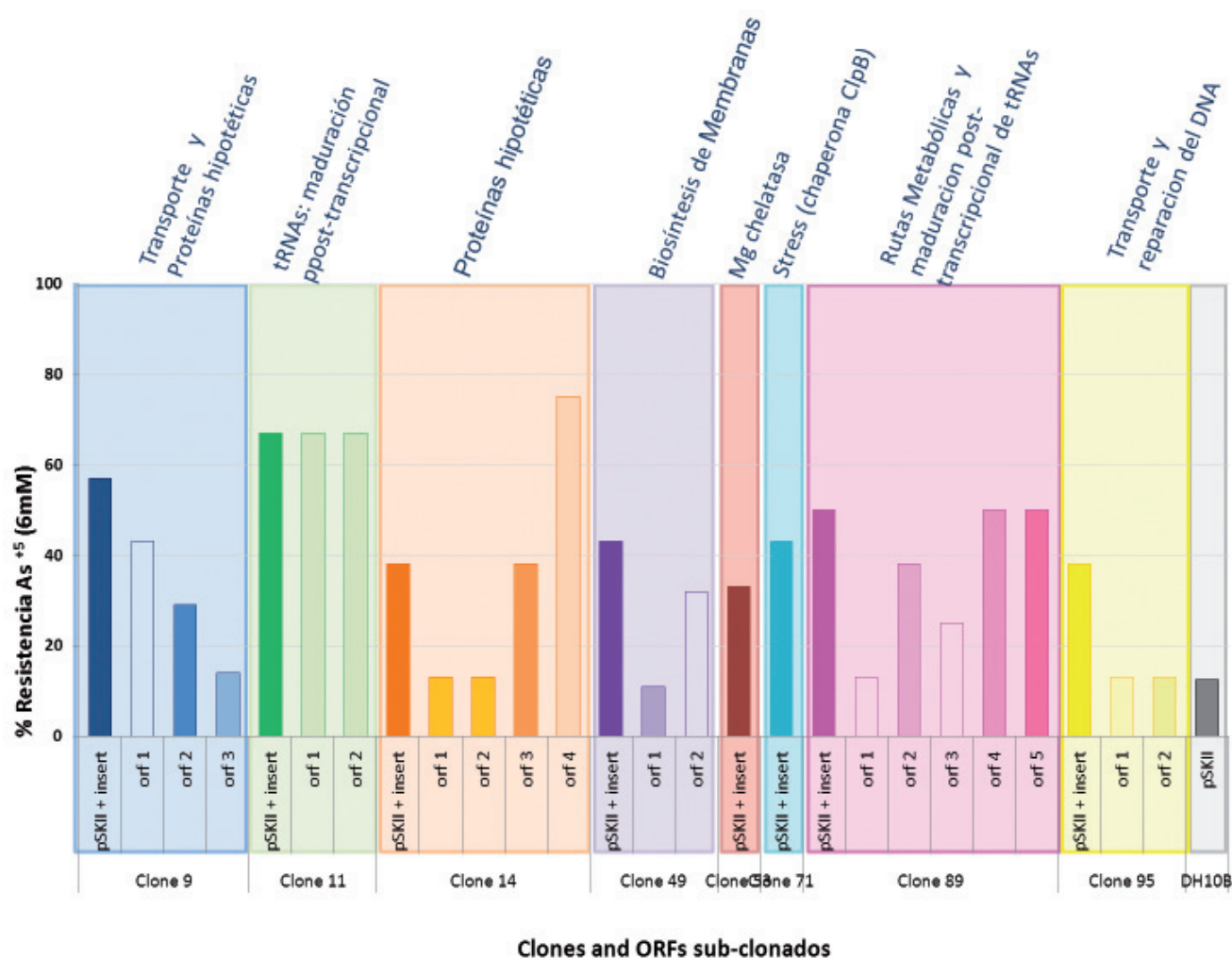


Figura 8. Contribución en la resistencia a Arsénico (V) de cada ORF sub-clonado respecto al fragmento de ADN metagenómico completo. En cuadros de colores se distingue la función global de los genes detectados en la célula bacteriana, según las bases de datos (BLAST, Pfam, etc.).

5. DISCUSIÓN

El arsénico es uno de los contaminantes de origen natural más tóxico que se conoce y ha sido una de las primeras sustancias químicas reconocidas como carcinógenas [9]. Es muy abundante y se encuentra ampliamente distribuido por toda la corteza de la Tierra. Las fuentes de contaminación de agua por arsénico son principalmente de origen natural (pizarras negras, minerales como la piritita, zonas volcánicas, aguas termales) aunque también puede originarse como resultado de actividades humanas. Se estima que más de 40 millones de personas en el mundo están en riesgo de beber agua contaminada por arsénico [10 y 11].

Los microorganismos pueden desarrollarse en ambientes muy extremos y contaminados por arsénico (y/u otros metales pesados). Esta capacidad de adaptación está relacionada con una sorprendente diversidad funcional génica. Es decir, estos microorganismos han desarrollado mecanismos genéticos que les permiten adap-

tarse a esos ambientes, los cuales en su mayoría se desconocen. Dichos mecanismos pueden ser estudiados empleando las herramientas moleculares apropiadas (por ejemplo: metagenómica funcional) y su descubrimiento puede resultar de interés para aplicaciones biotecnológicas.

En general, un problema de las aproximaciones metagenómicas es que la expresión de los genes heterólogos solo se produce si las secuencias promotoras son reconocidas por la bacteria huésped, en este caso *E. coli* [12]. Nuestra apuesta fue construir librerías empleando vectores con promotores inducibles y/o constitutivos a ambos lados del sitio de clonaje, en los que se clonaría fragmentos de menor tamaño con el objetivo de analizarlos de una forma más ágil [7 y 8]. Podemos confirmar, que la estrategia de metagenómica funcional empleada en este trabajo ha resultado de utilidad para la expresión de 20 genes heterólogos procedentes de los insertos de DNA ambiental. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran con éxito que ha sido posible a detectar al menos 10

genes con una nueva función implicada en mecanismos de adaptación a ambientes contaminados con metales pesados, y en particular arsénico.

Como se mencionó, hemos descrito la identificación de 20 genes diferentes y todos ellos fueron analizados en su estructura y función. La mayoría demostró estar asociado a la resistencia frente arsénico. En términos generales, el análisis bioinformático permitió agruparlos según su función global en 5 procesos celulares diferentes: transporte, biogénesis de membrana, metabolismo energético, maduración post-transcripcional y respuesta a stress. A esta clasificación, se debe sumar una categoría adicional, que agrupa a las proteínas hipotéticas, es decir, aquellas proteínas que han sido identificadas en más de un organismo pero se desconoce su función celular. Nuestros resultados concuerdan con los descritos por Bertin et al., 2011, quienes mediante una aproximación metagenómica y metaproteómica identificaron numerosas proteínas pertenecientes a diversas familias (por ejemplo: transporte, respuesta a estrés, metabolismo energético, etc.) en ambientes enriquecidos en arsénico [13].

Entre los genes detectados y que estarían implicados en la resistencia a arsénico (y/o vinculados previamente a metales pesados), encontramos por ejemplo, a aquellos asociados a transporte (miembros de la familia de transportadores MFS como el ORF_1 del clon 9 y ORF_1 del clon 95), reparación de daño al ADN (ADN glycosylasa en el ORF_2 del clon 95) y estrés celular (chaperona ClpB en el clon 71). 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 y dedicado exclusivamente 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 (ampliamente distribuido y esencial para la vida) [14]. Los sistemas Pit (transportador de fosfato) y PST (transportador específico de fosfato) descritos en *E. coli* son los principales sistemas de entrada para el arsenato en esta bacteria [15], con una fuerte preferencia por el sistema Pit. En este caso del As(III), este transportado al interior de las células a través de una rama de la superfamilia de transportadores aquaporinas (agua glicerolporinas) como GlpF en *E. coli* [16]. Además, algunos mecanismos de entrada de azúcares son capaces del transporte de arsenito en levaduras (permeasas de hexosa; [17]) y en células de mamíferos (permeasas de glucosa; [18]).

Respecto a los genes asociados a respuesta a estrés celular y reparación al DNA, estos también revelaron conferir resistencia a arsénico. Dichos genes han demostrado previamente estar involucrados en respuesta a estrés y daño celular (en procariontes y eucariotes) 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 repara-

ción de bases nitrogenadas dañadas por oxidación, respectivamente [19 y 20].

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 mencionó, otro grupo importante de los genes identificados en nuestro trabajo desempeñan funciones celulares muy bien estudiadas a la fecha, 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 post-transcripcional 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 post-transcripcional 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 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 post-transcripcional en células eucariotas y bacterianas [21 y 22]. En eucariotas, dicho proceso estaría implicado en la diferenciación celular, mientras que en bacterias en la supervivencia durante algunas situaciones de estrés y pérdida de la virulencia, respectivamente [23]. 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 situaciones ambientales adversas [24]. En este complejo mecanismo homeostático, están involucradas numerosas enzimas, siendo algunas de las principales la diacylglicerol-kinasa (DAGK) y la fosfolípido fosfatasa (PAP) responsables de regular la síntesis de fosfolípidos y desfosforilación de los mismos, (ORF_1 y ORF_2 del clon 49, respectivamente). En este contexto, la homeostasis de la membrana fosfolípida es cuidadosamente regulada en bacterias como respuesta a situaciones ambientales adversas (temperatura, osmolaridad, luz, carencia de nutrientes, pH, etc.) [25], pero a 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.

Finalmente, un numeroso grupo de proteínas hipotéticas (PH) y proteínas desconocidas (PD) fue hallado en este trabajo, quienes también han demostrando una activa

función en la resistencia a arsénico. En el sentido estricto, las PH son proteínas que se predicen a partir de secuencias de ácidos nucleicos pero que no se ha demostrado su existencia mediante una evidencia experimental. Además, estas proteínas se caracterizan por poseer una baja identidad respecto de las proteínas conocidas y anotadas en las bases de datos. Por su parte, las denominadas PD, corresponden a aquellas proteínas cuya existencia ha sido experimentalmente demostrada pero no se han caracterizado desde el punto de vista físico-químico o no pueden ser vinculadas a un gen conocido [26]. Un actual desafío para la ciencia (en la era de la metagenómica) es profundizar en el estudio de estos grupos de proteínas, siendo de suma importancia para: i)- completar la información genómica y proteómica de los organismos secuenciados, ii)- para proveer a las bases de datos bioinformáticas con información más certera y, iii)- descubrir nuevas estructuras y conformaciones desconocidas, así como nuevos dominios y motivos que contribuirán al desarrollo biotecnológico y de la biomedicina (por ejemplo, como 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 concreta aplicación 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.

6. 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 formas 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, stress 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 con un mejor conocimiento de la microbiota nativa de ambientes extremos. El empleo de las capacidades microbianas, son relevantes para la descontaminación

de ambientes contaminados con arsénico y otros metales pesados, particularmente el agua como elemento esencial para el desarrollo de la vida.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Páez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V. y Cánovas, D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* (2009) 22:117-130.
2. Silver S. y Phung L. T. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:599-608.
3. Fernández-Remolar, D., Gómez-Elvira, J., Gómez, F., Sebastián, E., Martín, J., Manfredi, J.A., Torres, J., Kesler, C.G. y Amils, R. 2004. The Tinto River, an extreme acidic environment under control of iron, as an analog of the Terra Meridiani hematite site of Mars. *Planetary and Space Science* 52: 239-248.
4. López-Archilla, A.I., Marín I. y Amils, R. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbial Ecol.* 41: 20-35.
5. Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750.
6. Riesenfeld, C.S., Schloss, P.D. y Handelsman, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525-552.
7. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6001-6011.
8. 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.
9. Rosen, P. 1971. Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *J Theor Biol.* 32:425-426.
10. Nordstrom, D. K. 2002. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296: 2143-2145.
11. Smedley, P. L. y Kinniburgh, D. G. 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17: 517-568.
12. Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. y Goodman, R. M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.
13. Bertin, P. N. et al. 2011. Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *ISME J.* 5: 1735-1747.
14. Rosen, B. P. y Liu, Z. 2008. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environ Int* 35:512-515.
15. Willsky, G. R. y Malamy, M. H. 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144: 366-374.
16. Meng, Y. L., Liu, Z. y Rosen, B. P. 2004. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 18334-18341.
17. Liu, Z., Boles, E. y Rosen, B. P. 2004. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 17312-17318.

18. Liu, Z., Sánchez, M. A., Jiang, X., Boles, E., Landfear, S. M. y Rosen, B. P. 2006. Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 424-430.
19. Sánchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A. y Lindquist, S. L. 1992. HSP104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* 11:2357-2364.
20. Zharkov, D.O. 2008. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci.* 65(10):1544-65.
21. Gaur, R., Björk, G. R., Tuck, S. y Varshney, U. 2007. Diet-dependent depletion of queuosine in tRNAs in *Caenorhabditis elegans* does not lead to a developmental block. *J Biosci.* 32(4):747-54.
22. 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. *J. Biol. Chem.* 279, 6280-6285.
23. Iwata-Reuyl, D. 2003. Biosynthesis of the 7-deazaguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNA. *Bioorg Chem.* 31(1):24-43.
24. 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 *Escherichia coli*. *Mol Microb.* 80(5): 1260-1275.
25. Cozzzone, J. 1997. Diversity and specificity of protein-phosphorylating systems in bacteria. *Folia Microbiológica.* 42(3): 165-170
26. 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. *Prog. Neurobiol* 77:90-127.