

Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados

Arsenic bioremediation mediated by genetically modified microorganisms

Her Lizeth Rodríguez Martínez¹, Maribel Peña Manjarrez^{1,‡},
Ana Victoria Gutiérrez Reyes¹, Cynthia Lizeth González Trevizo²,
Silvia Lorena Montes Fonseca² y Gladys Guadalupe López Avalos²

¹ ITESM, Campus Chihuahua, estudiantes de séptimo semestre de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, ² Escuela de Ingeniería, Arquitectura y Salud. Av. Heroico Colegio Militar 4700, Col. Nombre de Dios. 31300 Chihuahua, Chih., México.

[‡] Autora responsable (maribelpena.mpm@gmail.com)

RESUMEN

Las actividades antropogénicas aumentan la movilización y distribución de los metales pesados, si se rebasan los estándares permitidos por la normativa internacional resultan un serio problema para la salud de los seres vivos y el medio ambiente. Uno de los casos más alarmantes es el del arsénico; su presencia en agua potable y suelos (y por ende en alimentos) es tal que hay reportados cientos de casos de intoxicación severa en países como China y Bangladesh. Debido a las actividades mineras, en algunas zonas de México como el Estado de Chihuahua, también se han encontrado altas concentraciones del elemento. Por el peligro que representa, la necesidad de encontrar alternativas para la remediación de sitios contaminados con arsénico es de suma importancia. Si bien existen diversos métodos físicos y químicos que se han usado desde hace décadas, la biorremediación constituye una alternativa prometedora que ofrece ventajas económicas y es eficiente. Esto último se debe a que se han aislado microorganismos que pueden resistir altas concentraciones de arsénico e incorporarlo a procesos metabólicos específicos gracias a mecanismos como la enzima arsenito oxidasa (AOX). Aún cuando el sistema de oxidación del arsénico no se ha descifrado completamente ha sido posible identificarlo en un gran número de microorganismos a través de técnicas de ingeniería genética, mismas que de manera reciente se han utilizado para potencializar la capacidad de las cepas silvestres. El objetivo de este documento consistió en hacer una revisión general sobre la biorremediación del arsénico y algunas estrategias como la detoxificación

de arsénico (III) por medio de AOX con el fin de encontrar una solución factible al problema detectado en el estado de Chihuahua. Tras la vasta cantidad de información recabada se determinó que la ingeniería genética resulta una herramienta prometedora para lograr la biorremediación de los metales pesados y que integrar los genes aox, en microorganismos conocidos parece ser una alternativa viable para disminuir la contaminación por arsénico en cualquier sitio contaminado, por lo tanto, debe comenzarse con las pruebas de remoción y toxicidad cuanto antes.

Palabras clave: detoxificación, contaminación ambiental, ingeniería genética, metales pesados, enzima.

SUMMARY

Anthropogenic activities increase mobilization and distribution of heavy metals. When they exceed the standards allowed by international regulations, they become a serious problem for living beings and the environment. One of the most alarming cases is that of arsenic. Its presence in drinking water, soil (and thus food) has caused hundreds of cases of severe poisoning in countries such as China and Bangladesh. Due to mining activities, in some areas of Mexico such as the State of Chihuahua, high concentrations of the element have also been found. The potential hazard it represents requires urgent action to be taken for the remediation of contaminated sites. Although there are several physical and chemical methods that have been used for decades, bioremediation is a promising alternative that offers

Cita recomendada:

Rodríguez Martínez, H. L., M. Peña Manjarrez, A. V. Gutiérrez Reyes, C. L. González Trevizo, S. L. Montes Fonseca y G. G. López Avalos. 2017. Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados. *Terra Latinoamericana* 35: 353-361.

Recibido: enero de 2017. Aceptado: agosto de 2017.
Publicado como revisión en *Terra Latinoamericana* 35: 353-361.

economic advantages and is extremely efficient. There are several arsenic resistant microorganisms that can also incorporate it into specific metabolic processes thanks to mechanisms such as the enzyme arsenite oxidase (AOX). Even though the arsenic oxidation system has not been fully decoded, it has been possible to identify it in different bacteria through genetic engineering techniques, which have recently been used to potentiate the capacity of wild strains. The objective of this paper is to review arsenic bioremediation and some strategies such as arsenic (III) detoxification through AOX in order to find a feasible solution to the problem detected in the state of Chihuahua. After the vast amount of information collected, it was determined that genetic engineering is a promising tool for achieving bioremediation of heavy metals and integrating the aox genes into known microorganisms appears to be a viable alternative to reduce arsenic pollution at any contaminated site, and therefore, toxicity tests and removal should be started as soon as possible.

Index words: *detoxification, environmental pollution, genetic engineering, heavy metals, enzyme.*

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son elementos como Pb, Hg, Cu, Ni, Cr, Tl, Se, Cd, Zn, Al, Br y As, con una densidad al menos cinco veces mayor a la del agua, se distinguen por su persistencia en el medioambiente (Tchounwou *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2016). Por ser elementos de la corteza terrestre, no se pueden destruir ni degradar, su biodisponibilidad y toxicidad dependen completamente de su comportamiento químico (Bulgariu y Bulgariu, 2012; Pretorius *et al.*, 2001). Aunque algunos metales pesados se consideran micronutrientes, la bioacumulación de estos contaminantes en los organismos vivos, puede causar serios efectos tóxicos y carcinogénicos aún en pequeñas dosis, por lo que encabezan la lista de sustancias tóxicas más peligrosas (Dippong y Mihali, 2016; Khalilova y Mammadov, 2016; Osunkiyesi *et al.*, 2014; Zhiqiang, 2015).

Los metales pesados se encuentran de manera natural en la roca madre y se distribuyen a partir de interacciones geológicas como erosión y sedimentación o por medio de procesos biogeoquímicos (Acosta *et al.*, 2010; Venkatramanan *et al.*, 2015). Sin embargo, actividades

antropogénicas como la minería, los procesos industriales y de urbanización, son los principales causantes de esta contaminación (Krami *et al.*, 2013). Los metales tóxicos producidos por las actividades del hombre se acumulan en el aire y permanecen en él, en forma de partículas, las cuales pasan al suelo, a las aguas superficiales, a la flora y por lo tanto a la cadena alimentaria hasta llegar al organismo de las personas. (Vullo, 2003). Por lo tanto, la biodisponibilidad de los metales pesados representa un riesgo latente a la salud (Juozulynas *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016), pudiendo afectar al sistema digestivo, nervioso e incluso se relaciona con el cáncer, siendo los niños el grupo de edad más vulnerable a sus efectos (Benselhoub *et al.*, 2015; Latif *et al.*, 2014).

Uno de los metales que provoca mayores estragos a nivel mundial es el arsénico, debido a la alta toxicidad que representa su acumulación en agua, aire y suelo (Han *et al.*, 2003). El arsénico puede ser absorbido como materia particulada de su forma química reducida arsenito (As III) y su forma oxidada arseniato (As V) (Mandal y Suzuki, 2002). Además, por su efecto metabólico, tras una exposición prolongada a dosis elevadas puede llegar a ser mortal (Flanagan *et al.*, 2012).

En países como Chile, Taiwan, India y Bangladesh los niveles de arsénico en agua potable superan los 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, una cifra alarmante si consideramos que debería oscilar entre los 0.26-0.83 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Jochem *et al.*, 2016). La Norma Nacional Mexicana NOM-001-CONAGUA-(2011) solo permite 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el valor guía de la OMS establecido en 1993 indica 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Ali y Tarafdar, 2003; Ferdosi *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015). La problemática resulta igual de preocupante en el suelo, ya que éste es el principal proveedor de nutrientes para los organismos vivos y es la base de la producción humana (Deng *et al.*, 2015). El arsénico en suelos se debe principalmente al uso de pesticidas a base de arsénico o el riego con agua contaminada (Banik y Sanyal, 2016).

Por años se han utilizado diferentes técnicas de remediación que consisten en el uso intencional de procesos de degradación químicos o físicos que intentan reducir la toxicidad, movilidad o volumen de sustancias contaminantes en el ambiente (Lim *et al.*, 2014). Procesos como la electrocinética, el lavado de suelos, la extracción por solventes y vapores, las técnicas químicas que utilizan peróxido de hidrógeno

y de ozono; e incluso las metodologías físicas como la precipitación, la adsorción, la filtración de membrana u ósmosis inversa son alternativas utilizadas actualmente para la remoción de As de suelo y agua (Drewniak *et al.*, 2015; Jahan *et al.*, 2006; Vullo, 2003). Sin embargo, estas técnicas presentan algunas dificultades como son los costos elevados o el requerimiento de una gran cantidad de permisos gubernamentales para aplicarlas, además, si no son suficientemente específicas pueden resultar contraproducentes en presencia de otros metales (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002).

Por lo anterior, el desarrollo de nuevas metodologías de remediación se ha intensificado desde las últimas dos décadas y dio origen a una nueva rama para la eliminación de xenobióticos del medio ambiente más rentable efectiva y menos dañina: la biorremediación (Jahan *et al.*, 2006; Das Sharma *et al.*, 2016; Dzionek *et al.*, 2016). La biorremediación se basa en la capacidad natural que tienen algunos microorganismos para incorporar contaminantes en sus procesos metabólicos y utilizarlos como fuente de energía o carbono (Mosa *et al.*, 2016; Dzionek *et al.*, 2016). Tal es el caso de algunas bacterias sulfatorreductoras de los géneros *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y de algunas microalgas, que han demostrado tolerar altas concentraciones de metales pesados o incluso requerirlos para sus procesos biológicos (Mehrotra *et al.*, 2016; Hema *et al.*, 2014; Jiang y Fan, 2008; Araie *et al.*, 2009).

Desde hace años se han aislado microorganismos de ambientes contaminados con arsénico, que son capaces de asimilarlo a través de sus rutas metabólicas logrando un efecto detoxificador (Kruger *et al.*, 2013), estudios recientes se han enfocado a aumentar la capacidad de los microorganismos para resistir al arsénico a través del uso de ingeniería genética (Lorenzo *et al.*, 2016), de manera que se podrían diseñar microorganismos más eficientes como estrategia de biorremediación. Aunque existen bacterias con la capacidad de metabolizar el arsénico, los organismos genéticamente modificados pueden detoxificar el arsénico de forma más eficiente y ecológica (Rangel-Montoya y Balagurusamy, 2015; Yang *et al.*, 2016).

En varias ciudades de Chihuahua, México, se han encontrado altas concentraciones de arsénico en suelos y en el agua de consumo, que sobrepasan la norma oficial hasta 14 veces (Benavides *et al.*, 2008), esta situación debe ser tratada inmediatamente.

Por su situación climática, el estado de Chihuahua es susceptible a cambios constantes en el pH o temperatura del agua y el suelo, lo que dificulta la aplicación de técnicas de biorremediación con cepas bacterianas comunes es por ello que la ingeniería genética se considera una opción prometedora para la obtención de microorganismos resistentes a altas temperaturas, con mayor capacidad de resistencia a metales pesados de los que se pueden obtener proteínas recombinantes que favorezcan etapas específicas para la biorremediación de sitios contaminados, como lo es la modificación en el estado de oxidación del arsénico. Es por ello, que el objetivo de esta revisión consiste en brindar una visión general sobre la biorremediación del arsénico y algunas estrategias desarrolladas con microorganismos silvestres ó genéticamente modificados, enfatizando la importancia de la enzima arsenito oxidasa como estrategia para la detoxificación de arsénico(III) por ser su mecanismo de acción uno de los más comunes y efectivos presentes en bacterias, lo anterior con el fin de proponer esta alternativa como una herramienta clave para solucionar la problemática detectada en el estado de Chihuahua.

Formas del Arsénico

El arsénico es el 52º elemento en abundancia de la corteza terrestre con 2 ppm ($5 \times 10^{-4}\%$), es un elemento distribuido ampliamente en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera. Los estados de oxidación que lo caracterizan son As(III) y As(V) y, con menos frecuencia, As(0) y As(-III) (Bundschuh *et al.*, 2008; Castro de Esparza, 2006)¹.

En el suelo se encuentra comúnmente en la superficie combinado con S o metales como Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sn. “El principal mineral del As es el FeAsS (arsenopirita, pilo); otros arseniuros metálicos son los minerales FeAs₂ (löllingita), NiAs (niccolita), CoAsS (cobalto brillante), NiAsS (gersdorffita) y CoAs₂ (esmalta)” (Bundschuh *et al.*, 2008). En agua, el arsénico se encuentra formando oxianiones el As(V) aparece como H₃AsO₄ y sus correspondientes productos de disociación mientras que el As(III) aparece como H₃AsO₃ y sus correspondientes derivados protolíticos (Bundschuh *et al.*, 2008) (Nava-Ruíz y Méndez-Armenta, 2011).

El estado de oxidación del arsénico y su movilidad, se controla fundamentalmente por el potencial redox y

¹ Castro de Esparza, M. L. 2006. Presencia de arsénico en el agua de bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS-SB/SDE/OPS) Congreso Internacional, Ciudad de México, 20-24 Junio 2006. (<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd51/arsenico-agua.pdf>).

el pH. Tanto el As(V) como el As(III) son móviles en el medio, aunque este último es el estado más móvil y de mayor toxicidad. Los compuestos de arsénico pueden sorberse o desorberse de partículas, y cambiar de estado de oxidación fácilmente al reaccionar con oxígeno o con otras moléculas del aire, agua o suelo, o por la acción de microorganismos (Castro de Esparza, 2006¹; Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011).

El arseniato [As(V)] es la especie arsenical más difundida en el medioambiente (60%), y la mayoritaria en agua y suelos. El arsenito [As(III)] es la forma inorgánica reducida y está presente en una menor cantidad (20%); sin embargo, es de 25 a 60 veces más tóxica que la forma oxidada, arseniato. La dosis letal (DL₅₀) de arsénico(III) es menor que la que presenta la DL₅₀ del arsénico(V) inorgánico y esta a su vez menor que la del arsénico(V) orgánico (Cuadro 1), esto debido a la toxicidad que cada especie de arsénico posee (Litter, 2010; Pacheco-González *et al.*, 2013; Fernández-Sanz, 2015)².

Estrategias de Biorremediación de Arsénico con el Apoyo de Ingeniería Genética

Se ha demostrado que cepas de *Corynebacterium glutamicum* genéticamente modificadas pueden acumular 100 veces más arsénico que las cepas nativas (Villadangos *et al.*, 2014). *C. glutamicum* es un microorganismo Gram positivo saprófito con alta resistencia al arsénico, en el cual se ha podido potencializar la entrada de arsénico y evitar su escape a través de modificaciones de genes que codifican para permeasas como el gen *glfF* (Feo *et al.*, 2007; Mateos-Delgado, 2011).

C. glutamicum se ha modificado genéticamente para hacer que la bacteria funcione como un bioacumulador, con el silenciamiento de los genes *arsB/acr3* codificantes para las vías de salida de As III

(Mateos *et al.*, 2006). En tanto el gen *arsB* codifica para una proteína transportadora que se encarga del intercambio iónico con el metaloide (Meng *et al.*, 2004) y el gen *acr3* codifica para un transportador, los dos sirven para exportar arsenito fuera de la célula. También al eliminar *cgacr3-1* y *cgacr3-2*, que codifican para los sistemas responsables de la extrusión del As III. Además se han sobre expresado los genes *cdglpF* y *scglpF* de *Corynebacterium diphtheriae* y *Streptomyces coelicolor*, respectivamente, que codifican para los transportadores de As III (Villadangos *et al.*, 2014).

Otra opción es la eliminación del gen *arsR*, que codifica para una proteína que es un represor transcripcional, permitiendo la expresión de los tres componentes: 5'arsR-arsB-arsC3' del operon, que da resistencia al arsénico ya que lo detoxifica (Mateos-Delgado, 2011).

Estas modificaciones demuestran que es posible transformar genéticamente una bacteria y hacerla tolerante a altas concentraciones de arsénico y por lo tanto una posible opción de biorremediación.

ARSENITO OXIDASA, ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN

Los mecanismos de oxidación, reducción y metilación del arsénico en bacterias son probablemente una respuesta evolutiva y adaptativa debida a la ubiquidad global del arsénico y sus formas alotrópicas; se sabe que existen clústers genéticos responsables de estas respuestas, pero muchos no han sido identificados (Pandey y Bhatt, 2016).

Los genes de resistencia a arsénico están organizados generalmente en operones, siendo los más representativos los formados por unidades transcripcionales de tres (*arsRBC*) o cinco genes (*arsRDABC*). El operón de 3 genes expulsa arsenito de las células, el compuesto por 5, codifica para una arseniato reductasa que se encarga de reducir arseniato a arsenito. Existe otro gen conocido como *arsA* reportado en *E. coli* R773 y R47 que codifica para una ATPasa intracelular y *arsD* que codifica para una chaperona de arsénico (facilita la salida de arsenito por la bomba ArsAB) (Carlin *et al.*, 1995).

Otro ejemplo es el clúster que codifica para la enzima arsenito oxidasa (AOX), una enzima periplasmática que transforma el As (III) a As (V). Consta de dos subunidades, la subunidad pequeña *aoxA* (también

Cuadro 1. Dosis letales de arsénico según su forma.

Especie de arsénico	DL 50
	mg kg ⁻¹
As ³⁺	10
As ⁵⁺ (inorgánico)	150
As ⁵⁺ (orgánico)	1800

Fuente: Fernández-Sáenz, 2015².

² Fernández-Sanz, B. 2015. Ecotoxicología del arsénico: Movilización en suelos y aguas, relevancia clínica y métodos de eliminación (trabajo fin de grado). Facultad de Farmacia Universidad Complutense. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/FERN%C3%81NDEZ%20SANZ,%20BEATRIZ.pdf>.

llamada aioB / aroB / asoB) y la subunidad grande y catalítica aoxB (también llamada aioA / aroA / asoA) (Lett *et al.*, 2012; Ellis *et al.*, 2001; Pacheco-González *et al.*, 2013). aoxB tiene una estructura relacionada con la superfamilia de dimetilsulfóxido reductasa (DMSO), que tiene un centro de molibdeno y un centro de [3Fe4S] (Graham *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2009). Actualmente se clasifica como del tipo Molibdeno-bis Piranopterin Guanosin Dinucleotido (Mo-bisPGD por sus siglas en inglés) (Duval *et al.*, 2016). La subunidad pequeña (Aoxa) con un centro de [2Fe-2S], es una proteína Rieske que desempeña un papel en la transferencia de electrones de As III a un citocromo o azurina y cuenta con un péptido señal TAT para el transporte de la enzima hacia el citoplasma (Anderson *et al.*, 1992; Duval *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2003). En 1992 se purificó la primera arsenito oxidasa de *Alcaligenes faecalis*, pero los genes que codifican para AOX se identificaron por primera vez en *Herminiimonas arsenoxydans* (Anderson *et al.*, 1992; Lièremont *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2012). Desde entonces, muchas alfa, beta y gama proteobacteria, crenarchaeota y Deinococcus Thermus se han estudiado debido a la relación filogenética de sus enzimas AOX (Lebrun *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003, 2006).

Por su capacidad de asimilación de metales como Se, Mn, Cr, Cd, Sb, Ni y As la bacteria *Herminiimonas arsenicoxydans* (antes ULPAs1) se ha estudiado ampliamente como organismo modelo (Muller *et al.*, 2006). Pacheco González *et al.* (2013) describen el mecanismo de oxidación del arsenito por AOX el cual consiste en la introducción de As III a través de un orificio cónico presente en su superficie hacia el sitio de unión con el sustrato dentro de la enzima. El par de electrones del arsénico se encargan del ataque nucleofílico sobre el grupo Mo = O en el centro de molibdeno oxidado. Esta reacción produce molibdeno reducido (VI) mediante la unión coordinada del producto (arseniato) con el metal. La reacción oxidante del ciclo catalítico se completa por la disociación de los productos de la esfera de coordinación de molibdeno para generar la enzima reducida en la estructura cristalina. A partir de ese sitio, los electrones se transfieren a un citocromo o azurín (González *et al.*, 2013; Rangel Montoya *et al.*, 2015).

Aún cuando el sistema de oxidación del arsenito no ha sido descifrado completamente, se sabe que el operón aoxAB es regulado por controles transcripcionales.

También responde a señales “quorum sensing” que pueden ser emitidas por genes lux o un sistema de dos componentes, donde una proteína transmembranal o dominio receptor recibe un estímulo extracelular (como la exposición al arsénico) y se fosforila de modo que un dominio activo permita la activación del gen (Slyemi *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2012; Barba-Ostria, 2014).

Las herramientas bioinformáticas han favorecido el estudio de los genes de la arsenito oxidasa, permitiendo determinar las similitudes y relación filogenética de varios microorganismos que poseen la enzima; por ejemplo, mientras que el gen *aoxB* de *Agrobacterium* spp. TS43, y el de *Agrobacterium tumefaciens* tienen un 95% de identidad, los genes de *Alcaligenes faecalis* NCBI 8687 y *Pseudomonas* sp. TS44 tienen solo 61% de similitud; se cree que todas estas discrepancias se deben a los genes involucrados en funciones complementarias de transporte, o el control transcripcional de AOX. Los mecanismos más complejos de la enzima pudieron haber sido adquiridos a través de la transferencia horizontal de genes (Van Lis *et al.*, 2012; Muller *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2012). En el Cuadro 2 se muestran generalidades y características de algunas bacterias mencionadas a lo largo de este texto en los que se ha comprobado una actividad arsenito oxidasa.

A nivel genético, algunos de los genes que dan lugar a la enzima arsenito oxidasa aún son poco conocidos, sin embargo, se han identificado algunos con funciones muy específicas que se presentan en la Cuadro 3.

Como se ha dicho, la enzima arsenito oxidasa es crucial para la transformación de arsénico debido a que está presente en un amplio número de bacterias, de ahí que surja la necesidad de conocer tanto su mecanismo de acción como su estructura y genes involucrados, de manera que se pueda determinar que mecanismos nativos sería conveniente modificar y de qué manera resultaría más efectivo.

Perspectiva

El mecanismo de la enzima arsenito oxidasa es aceptado como herramienta en el proceso de biorremediación. El estudio de los microorganismos que poseen este sistema es el primer paso para determinar cuáles son más efectivos y a partir de ahí explorar las técnicas de ingeniería genética que permitirían potenciar su actividad y usarse in situ o

Cuadro 2. Descripción general de la arsenito oxidasa en diferentes microorganismos.

Microorganismo	Características	Referencia
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Su AOX fue obtenida, purificada y se hizo su caracterización estructural en 1992, por lo que mucha de la información sobre esta enzima proviene de estudios con <i>A. faecalis</i> .	Stolz <i>et al.</i> , 2006
<i>Cenibacteriu marsenoxidans</i>	Inicialmente conocida como ULPAs1, y también conocida como <i>Herminiimonas arsenoxydans</i> , fue aislada originalmente de un ambiente contaminado y su sistema de oxidación del arsénico se considera muy eficiente.	Muller <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas</i> sp. TS44	Su clúster AOX incluye genes no asociados a la resistencia o transformación del arsénico por lo que resulta inusual.	Cai <i>et al.</i> , 2009
<i>Thermusther mophilus</i>	De esta bacteria han sido aisladas varias enzimas de utilidad biotecnológica. Posee el mecanismo AOX más simple.	Gihring <i>et al.</i> , 2001
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Es una bacteria nivel de bioseguridad tipo 2, con amplias aplicaciones biotecnológicas, aunque su resistencia al arsénico ha sido estudiado, su mecanismo AOX tiene variaciones genéticas que podrían hacerlo menos eficiente.	Kashyap <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizobium</i> sp. NT-26	Su enzima arsenito oxidasa (Aio) es periplasmática y tiene un peso de 219kDa. Es muy similar a la de <i>Alcaligenes faecalis</i> .	Santini y Vanden Hoven, 2004

Cuadro 3. Genes involucrados en la regulación de la actividad arsenito oxidasa.

Gen	Función	Fuentes
<i>aoxR</i>	Dominio activo de un sistema de dos componentes (genes <i>aoxR</i> y <i>aoxS</i>) que es el factor de transcripción de los genes que codifican para la enzima AOX.	Koechler <i>et al.</i> , 2010
<i>aoxS</i>	Dominio receptor periplasmático de un sistema de dos componentes (genes <i>aoxR</i> y <i>aoxS</i>) que funciona como sensor de histidina kinasa.	Koechler <i>et al.</i> , 2010
<i>aoxC</i>	Secuencia codificante para una nitroreductasa que produce hidroxilamina a través de la reducción de grupos nitro.	Cleiss-Arnold <i>et al.</i> , 2010
<i>aoxX</i>	Potencial componente periplasmático involucrado en el transporte de oxianiones.	Cai <i>et al.</i> , 2009
<i>rpoN</i>	Codifica para un factor sigma que interactúa con <i>aoxR</i> .	Koechler <i>et al.</i> , 2010
<i>aoxD</i>	Secuencia codificante para un citocromo 552	Cleiss-Arnold <i>et al.</i> , 2010

bien obtener una enzima recombinante que juegue un papel importante en el proceso de biorremediación. Lo que falta por conocer es cómo actuaría dicha proteína, de modo que tras su obtención desde diferentes organismos, se realice un análisis comparativo bajo las mismas condiciones. Luego, tras la expresión proteica, su exposición a ambientes con arsénico y la cuantificación de su actividad enzimática, se podría determinar la eficiencia de remoción del contaminante respecto al tiempo y velocidad de tal actividad.

CONCLUSIONES

El arsénico es un metaloide muy peligroso que causa daños al ambiente y a la salud de los seres vivos, por el riesgo que representa su detoxificación es de vital importancia. La biorremediación se considera una solución eficiente, económica y factible para la remediación de metales pesados. Debido a la gran diversidad de bacterias que de manera natural poseen genes relacionados con la detoxificación de arsénico

y a la eficiencia que han demostrado, la ingeniería genética resulta una herramienta prometedora para potencializar esa actividad natural. Integrar los genes *aox*, en microorganismos conocidos y realizar experimentos de remoción y toxicidad es una propuesta viable para conocer a fondo el funcionamiento de esta enzima, y comprobar científicamente si el mecanismo de oxidación del arsénico puede ser tomado en cuenta como una forma de disminuir la contaminación por arsénico en cualquier sitio contaminado, esta acción debe realizarse pronto pues podría ser una etapa importante para el proceso de biorremediación.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. Miguel Ángel López Mariño y al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Chihuahua, específicamente a la Academia de Biotecnología, por todo el apoyo brindado.

LITERATURA CITADA

- Acosta, J. A., A. Faz, and S. Martínez-Martínez. 2010. Identification of heavy metal sources by multivariable analysis in a typical Mediterranean city (SE Spain). *Environ. Monitor. Assess.* 169: 519-30. doi:http://dx.doi.org/millennium.itesm.mx/10.1007/s10661-009-1194-0.
- Ali, M. and S. A. Tarafdar. 2003. Arsenic in drinking water and in scalp hair by EDXRF: A major recent health hazard in Bangladesh. *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 256: 297-305.
- Anderson, G. L., J. Williams, and R. Hille. 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 267: 23674-23682.
- Araie, H., K. Iwamoto, and Y. Shiraiwa. 2009. Aquatic bioremediation by metal accumulation of microalgae. *Phycologia* 48: 120.
- Banik, G. C. and S. K. Sanyal. 2016. Evaluation of inorganic fractions of arsenic in relation to soil properties in affected areas of West Bengal, India. *Current Sci.* 111: 1371-1377.
- Barba-Ostria, Carlos A. 2014. Los sistemas de dos componentes: Circuitos moleculares versátiles. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 17: 62-76.
- Benavides, A., M. Moreno, M. Sosa, S. Puga, J. Alcalá y C. Quintana. 2008. Evaluación de la Calidad del Agua en las Principales Lagunas del Estado de Chihuahua. *Rev. Latinoam. Rec. Nat.* 4: 84-88.
- Benselhou, A., M. M. Kharytonov, S. Bouabdallah, M. Bounouala, A. Idres, and M. L. Boukelloul. 2015. Bioecological assessment of soil pollution with heavy metals in Annaba (Algeria). *Studia Universitatis "Vasile Goldis", Seria Stiintele Vietii* 25: 77-22.
- Bulgariu, D. and L. Bulgariu. 2012. Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresour. Technol.* 103: 489-493.
- Bundschuh, J. A. Pérez-Carrera y M. I. Litter. 2008. Iberoarsen: Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana. CYTED. Argentina. ISBN: 13 978-84-96023-61-1.
- Cai, L., C. Rensing, X. Li, and G. Wang. 2009. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 715-725.
- Carlin, A., W. Shi, S. Dey, and B. P. Rosen. 1995. The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177: 981-986. DOI 0021-9193/95.
- Cleiss-Arnold, J., S. Koechler, C. Proux, M. L. Fardeau, M. A. Dillies, J. Y. Coppee, Bertin, F. Arsène-Ploetze, and P. N. Bertin. 2010. Temporal transcriptomic response during arsenic stress in *Herminiimonas arsenic oxydans*. *BMC Genomics* 11: 709. doi: https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-709.
- Das Sharma, M., A. Juyal, K. Mantha, and S. Das Sharma. 2016. A student-centric research and education programme on heavy metal pollution of water bodies from selected Indian cities. *Curr. Sci.* 111: 1393-1400.
- Deng, L., G. Zeng, C. Fan, L. Lu, X. Chen, M. Chen, H. Wu, X. He, and Y. He. 2015. Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 8259-8269.
- Dippong, T. and C. Mihali. 2016. Analysis of heavy metal content of different varieties of wines. *Sci. Bull. Series D: Mining, Mineral Process., Non-Ferrous Metallur., Geol. Environ. Eng.* 30: 23-32.
- Drewniak, L., M. Ciekowska, M. Radlinska, and A. Sklodowska. 2015. Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *J. Biotechnol.* 196: 42-51.
- Duval, S., J. M. Santini, D. Lemaire, F. Chaspoul, M. J. Russell, S. Grimaldi, W. Nitschke, and B. Schoepp Cothenet. 2016. The H-bond network surrounding the pyranopterins modulates redox cooperativity in the molybdenum-bisPGD cofactor in arsenite oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1857: 1353-1362.
- Duval, S., J. M. Santini, W. Nitschke, R. Hille, and B. Schoepp-Cothenet. 2010. The small subunit AroB of arsenite oxidase. Lessons on the [2Fe-2S] Rieske protein superfamily. *J. Biol. Chem.* 285: 20442-20451.
- Dzionek, A., D. Wojcieszynska, and U. Guzik. 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electron. J. Biotechnol.* 23: 28-36.
- Ellis, P. J., T. Conrads, R. Hille, and P. Kuhn. 2001. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9: 125-132.
- Feo, J. C., E. Ordoñez, M. Letek, M. A. Castro, M. I. Muñoz, J. A. Gil, L. M. Mateos, and A. J. Allera. 2007. Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res.* 41: 531-542.
- Ferdosi, H., E. K. Dissen, N. A. Afari-Dwamena, J. Li, R. Chen, M. Feinleib, and S. H. Lamm. 2016. Arsenic in drinking water and lung cancer mortality in the United States: An analysis based on US counties and 30 years of observation (1950-1979). *J. Environ. Pub. Health* 1-13.
- Flanagan, S. V., R. B. Johnston, and Y. Zheng. 2012. Arsenic in tube well water in Bangladesh: Health and economic impacts and implications for arsenic mitigation. *Bull. World Health Organ.* 90: 839-846.

- Gihring, T. M., G. K. Druschel, R. B. McCleskey, R. J. Hamers, and J. F. Banfield. 2001. Rapid arsenite oxidation by *Thermusaquaticus* and *Thermus thermophilus*: Field and laboratory investigations. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3857-3862.
- Graham, N. G., J. Hilton, C. Temple, R. C. Prince, and K. V. Rajagopalan. 1999. Structure of the molybdenum site of dimethyl sulfoxide reductase. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1256-1266.
- Han, F., Y. Su, D. L. Monts, M. J. Plodinec, A. Banin, and G. E. Triplett. 2003. Assessment of global industrial-age anthropogenic arsenic contamination. *Naturwissenschaften* 90: 395-401.
- Hema, T. G., K. Getha, G. Y. A. Tan, H. L. Sahira, A. M. Syamil, and M. Y. N. Fairuz. 2014. Actinobacterial isolates from tin tailings and forest soil for bioremediation of heavy metals. *J. Trop. For. Sci.* 26: 153-162.
- Jahan, K., P. Mosto, C. Mattson, E. Frey, and L. Derchak. 2006. Microbial removal of arsenic. *Water Air Soil Pollut. Focus* 6: 71-82.
- Jiang, W. and W. Fan. 2008. Bioremediation of heavy metal-contaminated soils by sulfate-reducing bacteria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1140: 446-454.
- Jochem, W. C., A. Razaque, and E. D. Root. 2016. Effects of health intervention programs and arsenic exposure on child mortality from acute lower respiratory infections in rural Bangladesh. *Int. J. Health Geogr.* 15: 32. doi:10.1186/s12942-016-0061-9.
- Juozulynas, A., A. Jurgelėnas, B. Butkienė, K. Greičiūtė, and R. Savičiūtė. 2008. Implications of soil pollution with heavy metals for public health. *Geologija* 50: 62.
- Kang, Y. S., B. Bothner, C. Rensing, and T. R. McDermott. 2012. Involvement of RpoN in regulating bacterial arsenite oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 5638-5645.
- Kashyap, D. R., L. M. Botero, W. L. Franck, D. J. Hassett, and T. R. McDermott. 2006. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 188: 1081-1088.
- Khalilova, H. and V. Mammadov. 2016. Assessing the anthropogenic impact on heavy metal pollution of soils and sediments in urban areas of Azerbaijan's oil industrial region. *Pol. J. Environ. Stud.* 25: 159-166.
- Koehler, S., J. Cleiss-Arnold, C. Proux, O. Sismeiro, M. A. Dillies, F. Goulhen-Chollet, and P. N. Bertin. 2010. Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *BMC microbial.* 10: 53. doi: 10.1186/1471-2180-10-53.
- Krami, L. K., F. Amiri, A. Sefiyanian, A. R. B. M. Shariff, T. Tabatabaie, and B. Pradhan. 2013. Spatial patterns of heavy metals in soil under different geological structures and land uses for assessing metal enrichments. *Environ. Monitor. Assess.* 185: 9871-9888.
- Kruger, M., P. N. Bertin, H. J. Heipieper, and F. Arsène-Ploetze. 2013. Bacterial metabolism of environmental arsenic-mechanisms and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 3827-3841. doi:10.1007/s00253-013-4838-5.
- Kumar, A., M. S. Rahman, M. A. Iqbal, M. Ali, P. K. Niraj, G. Anand, P. Kumar, K. Abhinav, and A. K. Ghosh. 2016. Ground water arsenic contamination: A local survey in India. *Int. J. Prevent. Med.* 12-17.
- Latif, M. T., S. M. Yong, A. Saad, N. Mohamad, N. H. Baharudin, M. B. Mokhtar, and N. M. Tahir. 2014. Composition of heavy metals in indoor dust and their possible exposure: A case study of preschool children in Malaysia. *Air Qual. Atmos. Health* 7: 181-193. doi:http://0-dx.doi.org.millennium.itesm.mx/10.1007/s11869-013-0224-9.
- Lebrun, E., M. Brugna, F. Baymann, D. Muller, D. Lièvreumont, M. C. Lett, and W. Nitschke. 2003. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Boil. Evol.* 20: 686-693.
- Lett, M. C., D. Muller, D. Lièvreumont, S. Silver, and J. Santini. 2012. Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *J. Bacteriol.* 194: 207-208.
- Lièvreumont, D., P. N. Bertin, and M. C. Lett. 2009. Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie* 91: 1229-1237.
- Litter, M. 2010. La problemática del arsénico en la Argentina: el HACRE. *Rev. SAEGRE* 17: 5-10.
- Lorenzo, V., P. Marlière, and R. Solé. 2016. Bioremediation at a global scale: From the test tube to planet Earth. *Microb. Biotechnol.* 9: 618-625.
- Mandal, B. K. and K. T. Suzuki. 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58: 201-235.
- Mateos-Delgado, L. M. 2011. El arsénico: ese conocido tan desconocido. *AmbioCiencias* 7: 40-55.
- Mateos-Delgado, L. M., E. Ordóñez, M. Letek, and J. A. Gil. 2006. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int. Microbiol.* 9: 207-215.
- Mehrotra, A., A. Mishra, R. M. Tripathi, and N. Shukla. 2016. Mapping of arsenic contamination severity in Bahraich district of Ghagra basin, Uttar Pradesh, India. *Geomat. Nat. Hazards Risk* 7: 101-112.
- Meng, Y. L., Z. Liu, and B. P. Rosen. 2004. As(III) and Sb(III) Uptake by GlpF and Efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279: 18334-18341.
- Mosa, K. A., I. Saadoun, K. Kumar, M. Helmy, and O. P. Dhankher. 2016. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Front. Plant Sci.* 7: 303. doi: 10.3389/fpls.2016.00303.
- Muller, D., D. D. Simeonova, P. Riegel, S. Manganot, S. Koechler, D. Lièvreumont, P. N. Bertin and M. C. Lett. 2006. *Herminiimonas arsenicoxydans* sp. nov., a metalloresistant bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1765-1769.
- Muller, D., D. Lièvreumont, D. D. Simeonova, J. C. Hubert, and M. C. Lett. 2003. Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant β -proteobacterium. *J. Bacteriol.* 185: 135-141.
- Nava-Ruiz, C. y M. Méndez-Armenta. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch. Neurocienc. (Mex)* 16: 140-147.
- Osunkiyesi, A. A., A. G. Taiwo, O. A. Olawunmi, O. I. Akindele, and A. A. Sobo. 2014. Environmental impact of heavy metal contaminants and micronutrients in soil samples of metal dumpsites in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. *IOSR J. Appl. Chem.* 7: 52-55.
- Pacheco González, G, V. Mondragón Jaimes y J. Velázquez Fernández. 2013. Oxidación del arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Rev. Bio Ciencias* 2: 92-97.

- Pandey, N. and R. Bhatt. 2016. Arsenic removal and biotransformation potential of *exiguobacterium* isolated from an arsenic-rich soil of Chhattisgarh, India. *CLEAN-Soil Air Water* 44: 211-218.
- Prasad, K. S., V. Subramanian, and J. Paul. 2009. Purification and characterization of arsenite oxidase from *Arthrobacter* sp. *Biomaterials* 22: 711-721.
- Pretorius, J., P. W. Linder, J. L. Slabbert, and P. W. Wade. 2001. The chemical behaviour of heavy metals and their bioavailability and toxicity to organisms: Implications for environmental quality criteria. *South Afri. J. Sci.* 97: 431-434.
- Rangel-Montoya, E. A. and N. Balagurusamy. 2015. Bioprospecting arsenite oxidizing bacteria in the soil of the Comarca Lagunera. *Rev. Chapingo, Serie Cienc. For. Amb.* 21: 41-56.
- Rangel-Montoya, E. A., L. E. Montañez-Hernández, M. P. Luévanos-Escareño y N. Balagurusamy. 2015. Impacto del arsénico en el ambiente y su transformación por microorganismos. *Terra Latinoamericana* 33: 103-118.
- Rhine, E. D., S. M. Ni Chadhain, G. J. Zylstra, and L. Y. Young. 2007. The arsenite oxidase genes (aroAB) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 662-667.
- Santini, J. M. and R. N. Vanden Hoven. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186: 1614-1619.
- Slyemi, D., D. Moinier, E. Talla, and V. Bonnefoy. 2013. Organization and regulation of the arsenite oxidase operon of the moderately acidophilic and facultative chemoautotrophic *Thiomonas arsenitoxydans*. *Extremophiles* 17: 911-920. doi: 10.1007/s00792-013-0573-1.
- Stolz, J. F., P. Basu, J. M. Santini, and R. S. Oremland. 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 107-130.
- Tchounwou, P. B., C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, and D. J. Sutton. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. pp. 133-164. *In: A. Luch (ed.). Molecular, clinical and environmental toxicology, volume 3: Environmental toxicology.* Springer. Dordrecht, Netherlands.
- Van Lis, R., W. Nitschke, T. P. Warelow, L. Capowicz, J. M. Santini, and B. Schoepp-Cothenet. 2012. Heterologously expressed arsenite oxidase: A system to study biogenesis and structure/function relationships of the enzyme family. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1701-1708.
- Venkatramanan, S., S. Y. Chung, T. Ramkumar, and S. Selvam. 2015. Environmental monitoring and assessment of heavy metals in surface sediments at Coleroon river estuary in Tamil Nadu, India. *Environ. Monitor. Assess.* 187: 1-16. doi:http://0-dx.doi.org.millennium.itesm.mx/10.1007/s10661-015-4709-x.
- Villadangos, A. F., E. Ordóñez, B. Pedre, J. Messens, J. A. Gil, and L. M. Mateos. 2014. Engineered coryneform bacteria as a bio-tool for arsenic remediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 10143-10152.
- Volke-Sepúlveda, T. y J. A. Velasco-Trejo. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México. ISBN: 968-817-557-9.
- Vullo, D. L. 2003. Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Rev. Quím. Viva.* 2: 93-104.
- Wu, F., F. Jasmine, M. G. Kibriya, M. Liu, X. Cheng, F. Parvez, T. Islam, A. Ahmed, M. Rakibuz-Zaman, J. Jiang, S. Roy, R. Paul-Brutus, V. Slavkovich, T. Islam, D. Levy, Tyler J. VanderWeele, B. L. Pierce, J. H. Graziano, H. Ahsan, and Y. Chen. 2015. Interaction between arsenic exposure from drinking water and genetic polymorphisms on cardiovascular disease in Bangladesh: A prospective case-cohort study. *Environ. Health Perspec.* 123: 451-457.
- Yang, J., H. Liu, X. Yu, Z. Lv, and F. Xiao. 2016. Entropy-cloud model of heavy metals pollution assessment in farmland soils of mining areas. *Pol. J. Environ. Stud.* 25: 1315-1322.
- Yuan, W., N. Yang, and X. Li. 2016. Advances in understanding how heavy metal pollution triggers gastric cancer. *BioMed Res. Int.* 1-10. ID 7825432. doi:10.1155/2016/7825432.
- Zhiqiang, Y. 2015. Advances in microbial remediation on the application of heavy metal pollution in agricultural water resource. *Agric. Sci. Technol.* 16: 2824-2828.