

© 2018 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(Supl. 1): 22-29, 2018.

DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2018.0.145

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES ARS EN CEPAS DE *Bacillus* HIPERTOLERANTES AL ARSÉNICO, AISLADAS DE POZAS TERMALES EN ARARÓ, MÉXICO

Cristina M. Prieto-Barajas¹, Julio C. Elorza-Gómez², Pedro D. Loeza-Lara³,
Juan M. Sánchez-Yáñez¹, Eduardo Valencia-Cantero¹ y Gustavo Santoyo^{1*}

¹Laboratorio de Diversidad Genómica, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, Av. Gral. Francisco J. Mujica s/n, Morelia, Michoacán 58030, México. ²Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Guanajuato, México. ³Genómica Alimentaria, Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo, Michoacán, México. E-mail: *gsantoyo@umich.mx

RESUMEN

En este trabajo investigamos la presencia, diversidad y relaciones filogenéticas de genes asociados a la tolerancia al arsénico (As) en 37 cepas del género *Bacillus*, aisladas de tapetes microbianos localizados en pozas termales en Araró, Michoacán, México. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de los genes *arsB* (bomba de expulsión de arsenito) y *arsC* (arsenato reductasa), *ACR3* (transportador de arsenito) y *aoxB* (arsenito oxidasa) del género *Bacillus*, detectando únicamente los genes *arsB* y *arsC* en 21 de las 37 cepas analizadas (56.7% del total). Los análisis tipo Blastx demuestran una alta identidad (84-100%) con bombas de expulsión de arsenito (*ArsB*) y proteínas arsenato reductasas (*ArsC*) de diversas cepas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacter* y *Planococcus*. Dichos análisis se confirmaron a través de la construcción de filogenias de los genes *arsB* y *arsC*. La detección de los genes *arsB* y *arsC* en cepas de *Bacillus* se correlacionó con valores de hipertolerancia al As, los cuales correspondieron a 32 y 128 mM de arsenito (III) y arsenato (V), respectivamente. Finalmente, los genes *arsB* y *arsC* identificados en cepas de *Bacillus* podrían ser un mecanismo de resistencia al arsénico en un ambiente acuático extremo, como las pozas termales de Araró.

Palabras Clave: tapetes microbianos, manantiales termales, diversidad bacteriana, factores ambientales.

Identification and analysis of *ars* genes in strains of *Bacillus* hyper tolerant to arsenic, isolated from thermal pools in Araró, Mexico

ABSTRACT

In this work we investigated the presence, diversity and phylogenetic relationships of genes that confer resistance to arsenic (As) in 37 strains of the genus *Bacillus*, isolated from microbial mats in hot springs from Araró, Michoacán, Mexico. Specific oligonucleotides were designed for PCR amplification of the genes *arsB* (arsenite-specific efflux pump) and *arsC* (arsenite reductase), *ACR3* (arsenite transporter) and *aoxB* (arsenite oxidase) of the genus *Bacillus*, detecting only the genes *arsB* and *arsC* in 21 out of the 37 analyzed strains (56.7% of the total). The Blastx-type analysis showed a high identity (84-100%) with arsenite efflux pumps (*ArsB*) and arsenate reductase proteins (*ArsC*) of various strains of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacter* and *Planococcus*. Such analyzes were confirmed through the construction of phylogenies of the *arsB* and *arsC* sequences. The detection of the *arsB* and *arsC* genes in *Bacillus* strains was correlated with As hyperresistance values, which corresponded up to 32 and 128 mM of arsenite (III) and arsenate (V), respectively. Finally, the *arsB* and *arsC* genes identified in *Bacillus* strains could be a mechanism of resistance to As in an extreme aquatic environment, such as in Araró's hot springs.

Key Words: microbial mats, hot springs, bacterial diversity, environmental factors.

INTRODUCCIÓN

El arsénico es un elemento químico presente en ambientes acuáticos, con efectos mutagénicos, citotóxicos y genotóxicos y ampliamente reconocido como carcinogénico (Rosen, 1971; Liu, Zhang, Chen & Sun, 2011). Se ha propuesto que alrededor de 150 millones de personas pueden estar en riesgo al consumir agua contaminada con arsénico y en algunos países representa un grave problema de salud, ya que la población consume agua con concentraciones de arsénico mayores a 10 µg/L, siendo el máximo permitido por la Organización Mundial de la Salud (Nordstrom, 2002; Khan & Ho, 2011).

Ciertas actividades humanas son responsables de la contaminación de suelos y aguas, como la minería, desperdicios industriales y el uso de pesticidas en la agricultura, entre otros (Nordstrom, 2002; Paez-Espino, Tamames, de Lorenzo & Cánovas, 2009). La dificultad para remover o biorremediar sitios contaminados con arsénico, así como su toxicidad, depende en parte del estado de oxidación o valencia del metaloide. El As puede presentar una variedad de estados oxidativos, siendo los estados pentavalente (V) y trivalente (III) las formas más comunes de encontrarlo y el As(III) como la forma más tóxica. El arsenato (AsO_4^{3-}) formado por arsénico pentavalente puede ser asimilado a través de las membranas celulares de las bacterias por los transportadores de fosfato (PO_4^{3-}), mientras que el arsenito (AsO_2^-) compuesto por arsénico trivalente puede entrar a través de las aguagliceroporinas (Paez-Espino, Tamames, de Lorenzo & Cánovas, 2009). Una vez dentro de la célula, el arsenato es reducido a arsenito por arsenato reductasas (ArsC) y es expulsado por bombas de expulsión de arsenito (ArsB). Se ha observado que el arsenito puede estimular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales dañan proteínas, lípidos y al DNA (Alí, Khan & Sajad, 2013). Además de la participación de proteínas como ArsC y ArsB, existen otros mecanismos de resistencia al arsénico; por ejemplo, la oxidación del arsenito, siendo el gen *aoxB* el que codifica para la subunidad catalítica de la arsenito (III) oxidasa (AoxAB), (Quémeneur *et al.*, 2008). Éstos y otros mecanismos de resistencia al arsénico han sido revisados en diversos trabajos (Ver Paez-Espino, Tamames, de Lorenzo & Cánovas, 2009; Yang & Rosen, 2016).

El arsénico es abundante en la corteza terrestre y puede originarse de diversas fuentes naturales (Mandal & Suzuki, 2002). En particular, altas concentraciones de As pueden encontrarse en aguas subterráneas y manantiales termales. Estas fuentes de agua pueden ser empleadas para consumo humano y otras actividades recreativas; como es el caso de los manantiales termales de Araró, Michoacán, México. En los manantiales termales de Araró se han reportado elevadas concentraciones de As, las cuales pueden alcanzar los 6.9 mg/L (Vázquez-Vázquez, Cortés-Martínez & Alfaro-Cuevas-Villanueva, 2015). En el trabajo realizado por Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo,

(2017), se confirmaron las altas cantidades de As detectando concentraciones que van desde 2.7 a 6.6 mg/L durante las cuatro estaciones del año. El As resultó ser un factor relevante para determinar la biodiversidad bacteriana de los tapetes microbianos de las pozas, durante cuatro muestreos en diferentes épocas del año. Uno de los principales grupos reportados en dicho trabajo fueron las bacterias del género *Bacillus*, división Firmicutes. Los resultados mostraron que el As, junto con otros factores fisicoquímicos como la temperatura ($\geq 50^\circ\text{C}$), es uno de los elementos más importantes que seleccionan las comunidades bacterianas en los manantiales termales analizados (Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo, 2017). En este contexto, el objetivo de este trabajo fue identificar genes (*arsB*, *arsC*, *aoxB*, *ACR3*), como un potencial mecanismo de resistencia al arsénico en cepas aisladas de los tapetes microbianos de las pozas termales de Araró, Mich. Por lo tanto, se identificó la presencia de genes *ars* en 21 de las 37 cepas de *Bacillus* analizadas y mediante la amplificación por PCR, secuenciación y análisis filogenéticos, se identificaron los genes *arsB* y *arsC*. Adicionalmente, se analizó la correlación entre la tolerancia al arsenato (V) y arsenito (III) de las cepas bacterianas con la presencia de los genes *ars*. Los resultados demuestran que las cepas de *Bacillus* que muestran ser hipertolerantes al As ($\geq 16\text{mM}$), contienen genes *ars* que podrían contribuir a la resistencia al arsénico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas microbianas

En el presente estudio se trabajó con 37 cepas del género *Bacillus* aisladas de dos pozas termales de Araró, Michoacán, México (Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo, 2017). Los 37 aislados pertenecen a las especies *Bacillus licheniformis* (18 cepas); *Bacillus cereus* (6 cepas); *Bacillus pumilus* (5 cepas); *Bacillus subtilis* (4 cepas); *Bacillus vietnamensis* (2 cepas) y *Bacillus megaterium* (2 cepas). Todos los aislados han sido identificados a través de la secuenciación del gen ribosomal 16S (Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo, 2017). Los aislados fueron cultivados en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN), a 37°C , para su uso rutinario en el Laboratorio y conservadas a -70°C en glicerol al 50% más medio nutritivo.

Amplificación y secuenciación de genes

El DNA genómico de cada cepa fue aislado por medio del protocolo de (Mahuku, 2004) y la extracción se comprobó mediante electroforesis en gel. Se diseñaron “primers” específicos para la amplificación de los genes *arsB*, *arsC*, *aoxB* y *ACR3* (Tabla I). Para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se emplearon las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, treinta ciclos de desnaturalización ($95^\circ\text{C}/30\text{s}$), alineamiento ($59^\circ\text{C}/1\text{min}$), extensión ($72^\circ\text{C}/1\text{min}$) y un ciclo de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos

Tabla I. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de genes de resistencia a arsénico: *arsC*, *arsB*, *ACR3* y *aoxB*. (f: Oligonucleótido directo, r: Oligonucleótido reverso).

Gen	Secuencia de los oligonucleótidos	Longitud (pb)	Tamaño del amplicón
<i>arsC</i>	f 5'-TGGTACTTTTCCACACACTTTCA-3' r 5'-TGTGGCACATGTCAAAAAGCA-3'	24 21	335pb
<i>arsB</i>	f 5'-TGGAATCGCAACTCGGACAA-3' r 5'-CCACCACTAGCAAAGGTTTCG-3'	20 20	700pb
<i>ACR3</i>	f 5'-AGTGATTAGCGCTAGCAATGAAA-3' r 5'-TGGTGAGGATCCGATGTTGC-3'	23 20	638pb
<i>aoxB</i>	f 5'-GCACTGGGGCTCGACTTC-3' r 5'-CCAGGAAAACGCTGCTTACG-3'	18 20	650pb

de PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), y se mandaron secuenciar a MR.DNA sequencing services (Texas, USA).

Análisis filogenéticos

La identificación de los genes de resistencia a arsénico fue llevada a cabo con búsquedas de homología tipo Blastx en la base de datos del GenBank. En el Blastx, las secuencias de nucleótidos son transformadas a secuencias de aminoácidos y con éstas se calcula el grado de identidad de las secuencias. Los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos de los genes *arsB* y *arsC* se llevaron a cabo utilizando el programa MEGA 5. Las filogenias se construyeron utilizando el método del “vecino más cercano”. Otros métodos mostraron topologías similares: máxima verosimilitud y mínima evolución. (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias de genes *arsB* y *arsC* caracterizados se obtuvieron del NCBI y se realizaron los correspondientes alineamientos. Un valor de confianza para el conjunto de datos de secuencias alineadas se obtuvo mediante la realización de análisis de Bootstrap de 1000 repeticiones. Para enraizar los árboles se emplearon las siguientes secuencias para el árbol de *arsB* *Paenibacillus polymyxa* M1 (HE577054.1) y para el árbol de *arsC*, *Aspergillus parasiticus* SU-1 696 (JZEE01000681.1).

Concentraciones máximas de tolerancia al As

Las concentraciones máximas de tolerancia se realizaron mediante el crecimiento de los aislados en cajas de Petri con medio agar nutritivo (AN) y medio mínimo (M9) con concentraciones crecientes de arsenato de sodio dibásico heptahidratado $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4, 8, 16, 32, 64 y 128 mM) y (meta) arsenito de sodio AsNaO_2 (4, 8, 16, 32, 64 y 128 mM). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 72 hrs. El crecimiento se determinó a través de la observación de las colonias en el medio.

RESULTADOS

Identificación de los genes *arsB* y *arsC*.

Los oligonucleótidos fueron diseñados con base en secuencias

conservadas de los genes que codifican las enzimas ArsB, ArsC, AoxB y ACR3 (Tabla I). De las 37 cepas bacterianas analizadas se obtuvieron amplicados del tamaño esperado en 21 cepas para los genes *arsB* y *arsC*; sin embargo, ninguna cepa dio positivo para la amplificación de los genes *aoxB* y *ACR3*.

Los productos de PCR amplicados fueron secuenciados y por búsquedas de tipo Blastx en la base de datos del GenBank, se identificaron como proteínas ArsB y ArsC con altos porcentajes de identidad (Tabla suplementaria). Cuatro de las veintidós cepas dieron positivo a *arsB*, con una alta identidad (84-99%) a genes *arsB* de especies como: *Psychrobacter*, *Bacillus* y *Escherichia coli*. Diecisiete cepas mostraron identidad del 91 al 100% con genes *arsC* de *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus paralicheniformis*, *Planococcus antarcticus* y al grupo de *Bacillus subtilis*.

Filogenias de los genes *arsB* y *arsC*

Para la asignación filogenética de las secuencias *arsB* y *arsC* se utilizaron secuencias del GenBank que mostraron identidad con las secuencias problema como grupos de referencia en la realización del árbol filogenético. Para el árbol de las secuencias *arsB* se utilizó a *Paenibacillus polymyxa* M1 (*arsB*) como grupo externo y para el árbol de *arsC* se utilizó a *Aspergillus parasiticus* US-1 696 (*arsC*). El análisis filogenético colocó las secuencias *arsB* en dos grupos. En particular, la secuencia *arsB* de *Bacillus licheniformis* ZAP10 se agrupó con genes *arsB* de *B. subtilis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus gibsonii* (Figura 1a). Las otras secuencias *arsB* de *B. licheniformis* ZAP31, *B. megaterium* ZAP20 y *B. cereus* ZAP43, formaron un grupo con genes *arsB* de *E. coli*, *Staphylococcus arlettae* y cepas de *Bacillus* sp.

En el caso de las secuencias *arsC*, el análisis filogenético distinguió entre dos grupos distantes de secuencias (Figura 1b). Uno conformado por cepas ZAP aisladas de las pozas de Araró pertenecientes a *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. cereus* con cepas ATCC de referencia de *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B.*

Tabla suplementaria. Cepas bacterianas que dieron positivo a la amplificación por PCR y búsqueda de homología por Blastx en el NCBI.

Especie y cepa bacteriana	Tamaño del amplicón (pb)	Relación más cercana por Blastx	Identidad %	Número de acceso
<i>B. megaterium</i> ZAP20	529	Bomba de flujo de arsénico/ <i>Psychrobacter</i> sp.	97%	WP_058368437.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP31	346	Bomba de flujo de arsénico / <i>Psychrobacter</i> sp.	99%	WP_058368437.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP10	358	Proteína de Resistencia al arsénico <i>arsB</i> / <i>Bacillus</i>	84%	WP_004398718.1
<i>B. cereus</i> ZAP43	474	Bomba de flujo de arsénico / <i>Escherichia coli</i>	99%	ORT41606.1
<i>B. cereus</i> ZAP40	348	Arsenato reductasa / <i>Planococcus antarcticus</i>	98%	WP_006829557.1
<i>B. cereus</i> ZAP15	257	<i>arsC</i> / Grupo <i>Bacillus subtilis</i>	100%	WP_020451674.1
<i>B. cereus</i> ZAP64	421	<i>arsC</i> / <i>Bacillus</i> sp.	100%	WP_003182412.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP98	399	Arsenato reductasa/ <i>Bacillus paralicheniformis</i>	91%	OMI10446.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP73	401	<i>arsC</i> / <i>Bacillus</i>	99%	WP_003182412.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP14-1	278	Arsenato reductasa <i>arsC</i> / <i>Bacillus licheniformis</i>	100%	WP_069500528.1
<i>B. subtilis</i> ZAP33	404	Arsenato reductasa / Grupo <i>Bacillus subtilis</i>	100%	WP_025810781.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP12	404	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	100%	WP_014600010.1
<i>B. subtilis</i> ZAP13	407	Arsenato reductasa / Grupo <i>Bacillus subtilis</i>	99%	WP_025810781.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP14-2	390	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	100%	WP_014600010.1
<i>B. subtilis</i> ZAP100	273	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	100%	WP_014600010.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP79	408	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	93%	WP_040103021.1
<i>B. pumilus</i> ZAP072	403	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	93%	WP_040103021.1
<i>B. pumilus</i> ZAP16	399	Arsenato reductasa / <i>Paenibacillus polymyxa</i>	93%	WP_040103021.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP17	399	Arsenato reductasa / <i>Bacillus paralicheniformis</i>	91%	OMI10446.1
<i>B. licheniformis</i> ZAP14-1	408	Arsenato reductasa / <i>Bacillus paralicheniformis</i>	91%	OMI10446.1
<i>B. cereus</i> ZAP09	362	<i>arsC</i> / <i>Bacillus</i>	99%	WP_023857526.1

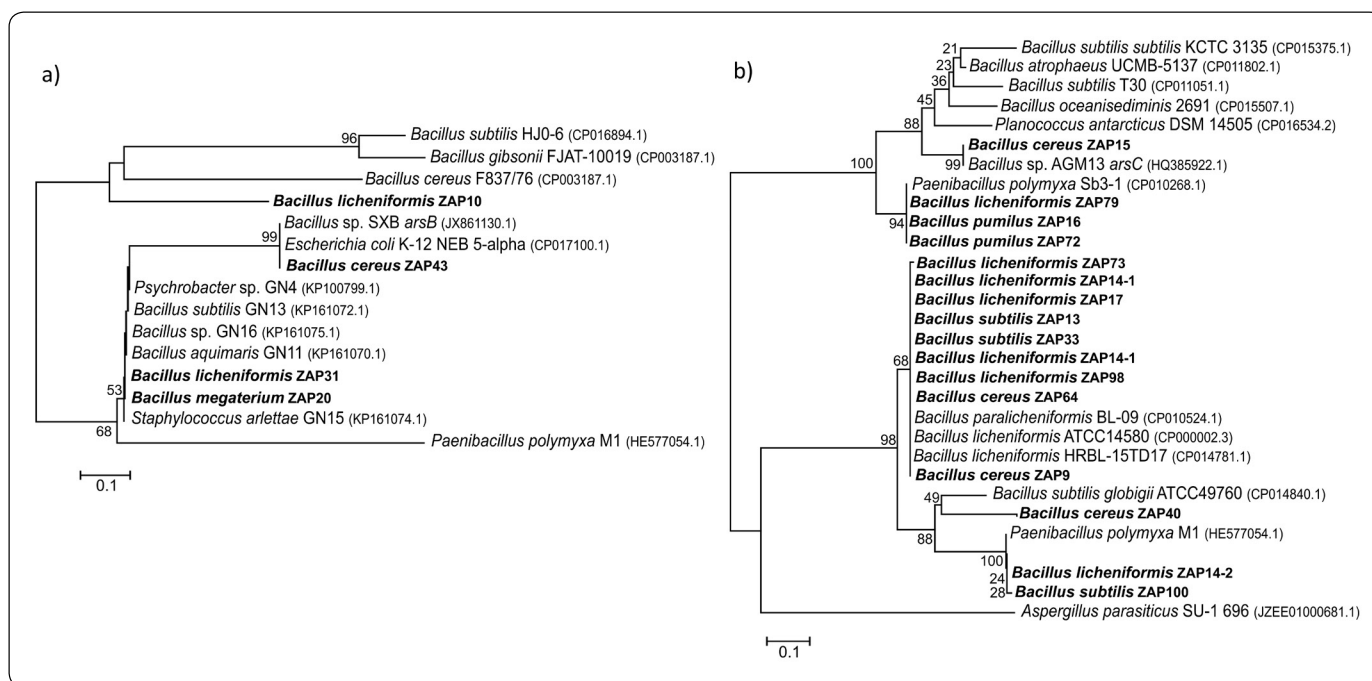


Figura 1. Filogenias de las secuencias *arsB* (a) y *arsC* (b). Para la reconstrucción filogenética se utilizó el método del “vecino más cercano” y como medida de soporte Bootstrap de 1000 repeticiones, utilizando el programa MEGA 5.

paralicheniformis. El otro grupo incluyó tres secuencias de las cepas *B. cereus* ZAP15, *B. licheniformis* ZAP79, *B. pumilus* ZAP16 y ZAP72 con especies de *Bacillus* sp.

Hipertolerancia al arsenato (V) y arsenito (III)

El arsénico se presenta principalmente en dos formas químicas: arsenato y arsenito, por lo que los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia a ambos estados de oxidación. Para determinar la tolerancia a estos compuestos se crecieron las cepas en medios AN y M9 con cantidades crecientes de arsenato y arsenito (4, 8, 16, 32, 64 y 128 mM). Cuando fueron cultivadas en los medios M9 y AN sin el metaloide (condiciones control), todas las bacterias crecieron de manera óptima, igualmente, todos los aislados fueron tolerantes a concentraciones de As(V) y As(III) de 8 mM, sin embargo, el porcentaje de aislados bacterianos capaces de crecer en presencia del As disminuyó de forma estadísticamente significativa a partir de la concentración 16 mM para el caso del As(III) y de 32 mM para el caso del As(V), hasta llegar a una proporción 0.0 y de 0.13 en la concentración de 128 respectivamente (Tabla II).

La Figura 2 muestra un listado de las 37 cepas de *Bacillus* analizadas en este trabajo, así como la presencia/ausencia de genes *ars* y la tolerancia a las diferentes concentraciones de As(V) y As(III). En general, se puede observar que las cepas hipertolerantes [≤ 128 mM de As (V) y 32 mM As (III)], *B. megaterium* ZAP20, *B. licheniformis* ZAP31, *B. licheniformis*

ZAP10 y *B. cereus* ZAP43, dieron positivo a la presencia de los genes *arsB* y *arsC*, siendo estas cepas las que mostraron mayor resistencia al As. Otras 17 cepas con niveles altos de resistencia al arsénico (V y III), pero inferiores a las del primer grupo, dieron también positivo a la amplificación del gen *arsC*, que codifica para la arsenato reductasa ArsC pero no a la amplificación del gen *arsB* que codifica para la bomba de expulsión de arsenito. No obstante, no se descarta que otros mecanismos de resistencia estén presentes en las demás cepas de *Bacillus*, ya que algunas de ellas también fueron tolerantes a altas concentraciones de arsénico [≤ 64 mM As (V) y 32 mM As (III)], sin haber dado positivo para los genes *arsB* y *arsC*. Sin embargo, se puede observar una correlación clara entre la presencia de los genes *arsB* y *arsC* como posibles mecanismos de resistencia en las cepas hipertolerantes al As.

DISCUSIÓN

En un trabajo realizado recientemente por Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo, (2017), se observó un efecto de la estacionalidad y ciertos parámetros fisicoquímicos sobre la diversidad cultivable de comunidades bacterianas de dos pozas termales en Araró (Prieto-Barajas, Alfaro-Cuevas, Valencia-Cantero & Santoyo, 2017), localizado en el centro del Eje Volcánico Transmexicano y relativamente cercano (20 Km) a la zona de los Azufres, en Michoacán (Israde-Alcántara & Garduño-Monroy, 1999). Al analizar diversos parámetros fisicoquímicos, las altas concentraciones de arsénico resultaron

Tabla II. Proporción de aislados bacterianos tolerantes a As(III) y As(V) a distintas concentraciones.

Concentración (mM)	As	Medio M9			Medio AN		
		Tolerantes	Proporción	Valor P^a	Tolerantes	Proporción	Valor P
0 (Control)	(V)	37	1	-	37	1	-
	(III)	37	1	-	37	1	-
8	(V)	37	1	0.5	37	1	0.5
	(III)	37	1	0.5	37	1	0.5
16	(V)	37	1	0.5	26	0.7	0.0002
	(III)	11	0.29	<0.0001	24	0.64	<0.0001
32	(V)	33	0.89	0.0190	26	0.7	0.0002
	(III)	6	0.16	<0.0001	4	0.1	<0.0001
64	(V)	20	0.54	<0.0001	15	0.4	<0.0001
	(III)	0	0	<0.0001	0	0	<0.0001
128	(V)	5	0.13	<0.0001	7	0.18	<0.0001
	(III)	0	0	<0.0001	0	0	<0.0001

^aValor de p indica la significancia estadística de la diferencia de las proporciones entre el control y el tratamiento señalado según un análisis de frecuencias de χ^2 seguido de un análisis de proporciones.

ser un factor importante que influyó de forma significativa sobre la diversidad bacteriana en una de las pozas analizadas. Otros reportes también habían encontrado niveles altos de As en algunas otras fuentes termales recreativas en Araró, con valores que oscilan entre 0,01 mg/L y 6,26 mg/L, que superan las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo un riesgo potencial para la salud (Vázquez-Vázquez, Cortés-Martínez & Alfaro-Cuevas-Villanueva, 2015). Por lo tanto, al descubrir los altos niveles de As en el agua de las pozas termales, surgió la hipótesis de que dichas cepas poseen elementos genéticos que les brindan resistencia al As para poder sobrevivir. Cabe destacar que el 76% de los filotipos analizados correspondieron al Phylum Firmicutes y principalmente al género *Bacillus*. Así, de las 37 cepas analizadas el 56.7% dieron positivo al ser amplificadas por PCR los genes *arsB* y *arsC*. Los genes *arsB* y *arsC* son dos de los genes más ampliamente distribuidos en bacterias resistentes al As, ya que la reducción del arsenato a arsenito, llevada a cabo por la arsenato reductasa ArsC; así como su posterior expulsión por la bomba de expulsión de arsenito ArsB, es uno de los mecanismos más eficientes de resistencia a la toxicidad del As (Bachate, Cavalca & Andreoni, 2009; Cervantes & Gamiño, 2017; Oremland & Stolz, 2003). Los genes *arsB* y *arsC* forman parte del operón *arsRDABC*, que contiene cinco genes o tres, como el *arsRBC*, siendo ambos localizados en diversos replicones, de tipo cromosomal o plasmídico (Oremland & Stolz, 2003). Sin embargo, el que no se hayan amplificado los genes *ACR3* y *aoxB*, no permite descartar su presencia en este trabajo. Las razones podrían

ser diversas, incluyendo un esfuerzo mayor para modificar las condiciones de amplificación o diseño de nuevos oligos. Así mismo, se podría realizar otro tipo de estudio más amplio, como un análisis metagenómico de dichos ambientes que podría revelar la presencia de esos genes o incluso, de otros elementos que brinden un mecanismo diferente de resistencia al As (Yang & Zhang, 2017).

Al realizar los análisis tipo Blastx se encontró una alta identidad con las proteínas ArsB y ArsC de diversas especies, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Psychrobacter* y *Planococcus*. Algunas de estas proteínas han sido ya caracterizadas, por lo que su función ha sido comprobada como un mecanismo de resistencia al As. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Bachate, Cavalca & Andreoni (2009), se aislaron diversas cepas bacterianas tolerantes al As de un suelo agrícola contaminado con este metaloide en Bangladesh, logrando reducir 2 mmol l⁻¹ de As(V) a As(III), en condiciones aerobias. Algunas cepas del género *Bacillus* contenían arsenato reductasas y bombas de expulsión de arsenito. Otro trabajo realizado por Tripti, Sayantan, Shardendu, Singh & Tripathi (2014), también analizaron la capacidad de toma y remoción de arsenato (V); así como la reducción de arsenato (V) a arsenito (III), en una cepa de *Bacillus licheniformis* (DAS1). De forma interesante las cepas mostraron que concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) para As (V) y As (III) eran 10 y 7 mM, respectivamente. Aunque el trabajo anterior reporta buenas capacidades de la cepa DAS1 para tomar, remover o reducir el arsenato y arsenito, la cepa

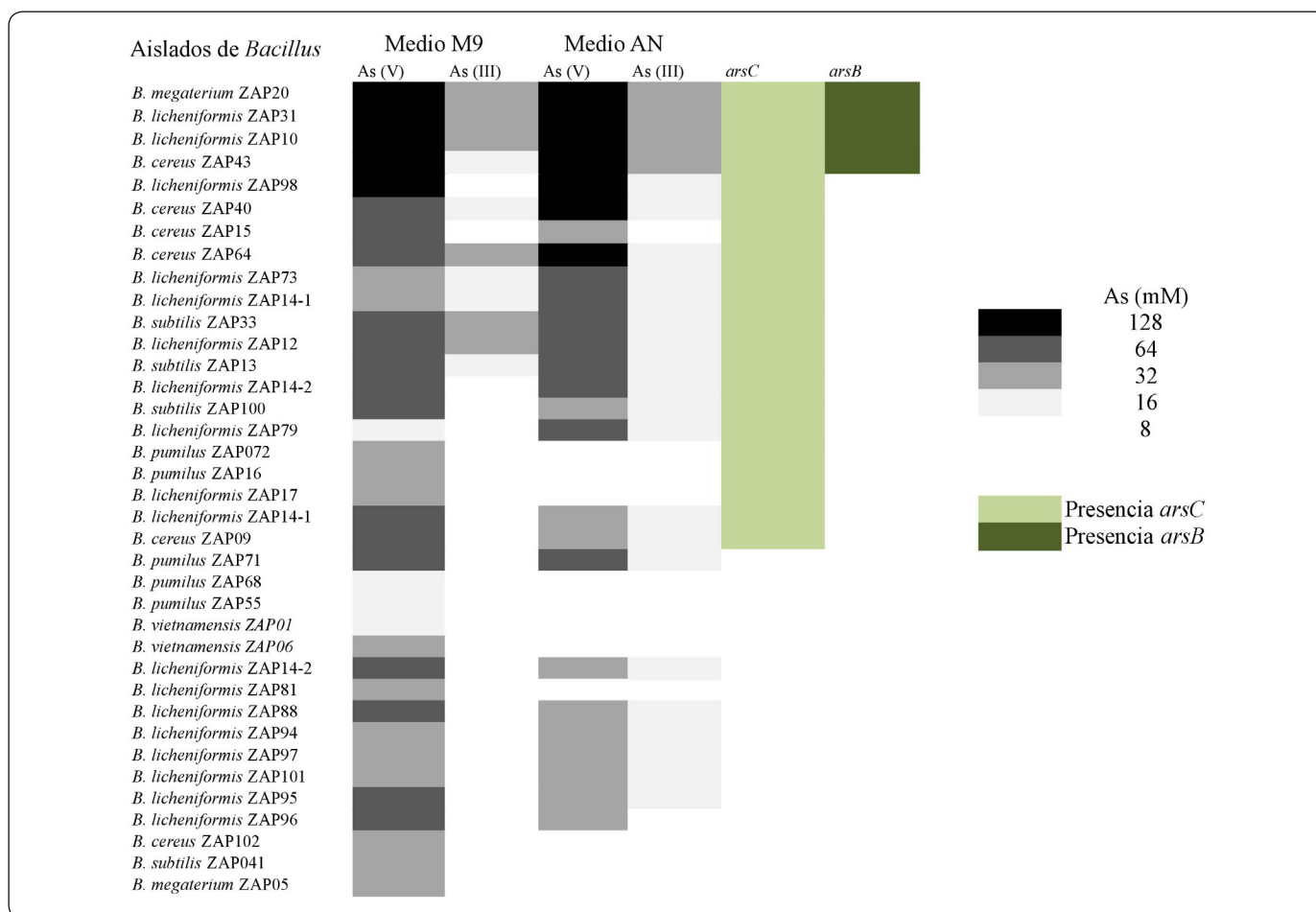


Figura 2. Comparación de los niveles de tolerancia al arsenato y arsenito de las 37 cepas de *Bacillus* analizadas en este trabajo y su asociación con la presencia/ausencia de los genes *arsC* y *arsB*. La intensidad de colores de blanco a negro de los cuadros indican la concentración de arsenato o arsenito resistido por las cepas. Los cuadros de color verde claro indican la detección del gen *arsC*, mientras que los cuadros color verde oscuro indican la presencia de *arsB*, detectados por medio de la PCR.

no muestra altos niveles de resistencia al As, lo que limitaría su uso en ambientes contaminados con altas concentraciones de dicho elemento tóxico (Tripti, Sayantan, Shardendu, Singh & Tripathi, 2014). De acuerdo con Cai, Liu, Rensing & Wang, (2009), se consideran cepas altamente resistentes (hiper) al As cuando reportan concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), igual o mayor a 14 mM de As. Los autores reportan el aislamiento de 58 cepas hiperresistentes al As de suelos altamente contaminados con dicho metal, incluyendo géneros como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, pero no de *Bacillus*. Un dato interesante reportado por los autores fue que se encontró una alta frecuencia de transferencia horizontal de los genes *arsB/ACR3* entre las cepas aisladas. Lo anterior coincide con nuestros análisis filogenéticos, donde genes *arsB* de *B. licheniformis* cepas ZAP10 y ZAP31 no se agrupan en un mismo clado, sino que están ubicados en grupos distintos. El mismo caso se observa para las secuencias *arsC* de las cepas

B. licheniformis ZAP79 y ZAP73 igualmente separadas en el análisis filogenético.

En otro trabajo realizado por Cavalca, *et al.*, (2010), se reporta el aislamiento de bacterias resistentes al arsénico asociadas con las raíces de la planta silvestre *Cirsium arvense* de un suelo contaminado con arsénico y la búsqueda de posibles actividades promotoras del crecimiento vegetal. Comparando con nuestros resultados, cinco cepas que aislamos de las pozas termales de Araró lograron tener una tolerancia de hasta 32mM de arsenito (III) y 128 mM de arsenato (V) (Figura 2). Cabe destacar que la mayor concentración a la cual lograron sobrevivir fue cuando las cepas fueron cultivadas en medios nutritivos (AN), comparado cuando se cultivaron en medios mínimos. Y es que un medio nutritivo contiene mayores cantidades de fosfatos, los cuales pueden competir con el As (V), para ser internalizados a través de los transportadores de fosfato (Cervantes & Gamíño 2017; Rosen & Liu, 2009).

CONCLUSIONES

Los genes *arsB* y *arsC* identificados en cepas de *Bacillus* y en particular en aquellos aislados hipertolerantes al As, podrían constituir uno de los principales mecanismos genéticos de sobrevivencia en un ambiente acuático con altas concentraciones del metaloide, como son las pozas termales de Araró, Michoacán.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Proyecto No. 169346) y Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2017-2018), por apoyar nuestros proyectos de investigación. Agradecemos a Pedro Huerta Venegas por la ayuda durante algunos experimentos preliminares y a Christian Hernández por la asesoría con el análisis estadístico. Cristina M. Prieto Barajas agradece la beca de doctorado de CONACYT-México. Finalmente, gracias a los revisores anónimos de este trabajo por sus sugerencias.

REFERENCIAS

- Alí, H., Khan, E., & Sajad, M.N. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, **91**(7), 869-881. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- Bachate, S. P., Cavalca, L., & Andreoni, V. (2009). Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *Journal of applied microbiology*, **107**(1), 145-156. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04188.x.
- Cai, L., Liu, G., Rensing, C., & Wang, G. (2009). Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiology*, **9**, 1471-1480. Doi: 10.1186/1471-2180-9-4.
- Cavalca, L., Zanchi, R., Corsini, A., Colombo, M., Romagnoli, C., Canzi, E., & Andreoni, V. (2010). Arsenic-resistant bacteria associated with roots of the wild *Cirsium arvense* (L.) plant from an arsenic polluted soil, and screening of potential plant growth-promoting characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*, **33**(3), 154-164. Doi: 10.1016/j.syapm.2010.02.004.
- Cervantes, C., & Gamiño, N.S. (2017). Diversidad de genes de resistencia a arsénico en procariotas. *Ciencia Nicolaita*, **70**, 80-93.
- Israde-Alcántara, I., & Garduño-Monroy, V.H. (1999). Lacustrine record in a volcanic intra-arc setting: the evolution of the Late Neogene Cuitzeo basin system (central-western Mexico, Michoacan). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **151**(1-3), 209-227. DOI: 10.1016/S0031-0182(99)00024-3.
- Khan, M.L., & Ho, Y-S. (2011). Arsenic in drinking water: a review on toxicological effects, mechanism of accumulation and remediation. *Asian Journal of Chemistry*, **23**(5), 1889-1901. doi:10.1155/2014/304524.
- Liu, S., Zhang, F., Chen, J., & Sun, G. (2011). Arsenic removal from contaminated soil via biovolatilization by genetically engineered bacteria under laboratory conditions. *Journal of Environmental Sciences*, **23**(9), 1544-1550. Doi: 10.1016/S1001-0742(10)60570-0.
- Mahuku, G.S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**, 71-81. DOI: 10.1007/BF02773351.
- Mandal, B.K., & Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, **58**(1), 201-235. DOI:10.1016/S0039-9140(02)00268-0.
- Nordstrom, D.K. (2002). Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science*, **296**(5576), 2143-2145. DOI: 10.1126/science.1072375.
- Oremland, R.S., & Stolz, J.F. (2003) The ecology of arsenic. *Science*, **300**, 939-944. DOI: 10.1126/science.1081903.
- Paez-Espino, D., Tamames, J., de Lorenzo, V., & Cánovas, D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, **22**(1), 117-130. DOI: 10.1007/s10534-008-9195-y.
- Prieto-Barajas, C.M., Alfaro-Cuevas, R., Valencia-Cantero, E. & Santoyo, G. (2017). Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **88**, 616-624. DOI: 10.1016/j.rmb.2017.07.010.
- Quéméneur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Lièvremon, D., Jauzein, M., Bertin, P. N., Garrido, F. & Joulain, C. (2008). Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, **74**(14), 4567-4573. DOI: 10.1128/AEM.02851-07.
- Rosen, P. (1971). Theoretical significance of arsenic as a carcinogen. *Journal of theoretical biology*, **32**, 425-426. Doi:10.1016/0022-5193(71)90178-0.
- Rosen, B.P. & Z. Liu (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environmental International*, **35**, 512-515. DOI: 10.1016/j.envint.2008.07.023.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Tripti, K., Sayantan, D., Shardendu, S., Singh, D. N., & Tripathi, A. K. (2014). Potential for the Uptake and Removal of Arsenic [As (V) and As (III)] and the Reduction of As (V) to As (III) by *Bacillus licheniformis* (DAS1) under Different Stresses. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, **42**(3), 238-248. DOI: 10.4014/kjmb.1401.01004.
- Vázquez-Vázquez, M.J., Cortés-Martínez, R. & Alfaro-Cuevas-Villanueva, R. (2015). Arsenic occurrence and water quality in recreational thermal springs at Araró, Mexico. *International Journal of Science and Technology*, **5**(1), 1-5.
- Yang, H-C. & Rosen, B.P. (2016). New mechanism of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, **39**(1), 5-13. DOI: 10.1016/j.bj.2015.08.003
- Yang, Y., & Zhang, R. (2017). Draft Genome Sequence of *Bacillus* sp. Strain CDB3, an Arsenic-Resistant Soil Bacterium Isolated from Cattle Dip Sites. *Genome announcements*, **5**(25), e00429-17. DOI: 10.1128/genomeA.00429-17