

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**GENOTIPIFICACIÓN DE PROTEOBACTERIAS
RESISTENTES A ARSÉNICO**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIAS EN EL
ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES**

PRESENTA:

Q.F.B. GUADALUPE PACHECO GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. VERÓNICA ALEJANDRA MONDRAGÓN JAIMES

CODIRECTOR:

Dr. JESÚS BERNARDINO VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ

ASESOR:

Dra. ABRIL BERNARDETTE MARTÍNEZ RIZO

Tepic, Nayarit, 16 de Octubre de 2014

Dr. Diego García Paredes

Coordinación del Programa de

Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias

Presente

Los que suscribimos, integrantes del comité tutorial del QFB **Guadalupe Pacheco González**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada: "**Genotipificación de Proteobacterias Resistentes a Arsénico**" y determinamos que la tesis puede ser presentada por la estudiante de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Ambientales.

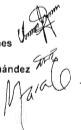
Atentamente

EL COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis: **Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes**

Co-Director de Tesis: **Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**

Asesor de Tesis: **Dra. Abril Bernardette Martínez Rizo**



Handwritten signatures of the thesis committee members: Verónica Alejandra Mondragón Jaimes, Jesús Bernardino Velázquez Fernández, and Abril Bernardette Martínez Rizo.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/339/14

Xalisco, Nayarit., 23 de octubre de 2014

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
P r e s e n t e.

Con base al oficio de fecha 16 de octubre de 2014, enviados por los CC. **Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes, Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández y Dra. Abril Bernardette Martínez Rizo**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la **C. Guadalupe Pacheco González**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, me despido de usted y reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del posgrado



Expediente.

Sref.

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto "Resistencia a metales pesados y antibióticos en bacterias ambientales del río Mololoa" que se desarrolla en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo el liderazgo de la Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes y contó con el apoyo económico PROMEP/103.5/07/2519 del mismo proyecto.

Parte de los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Genómica Bacteriana de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia, como testimonio de agradecimiento por el esfuerzo y apoyo que en todo momento me brindaron. Por su comprensión y sabios consejos, así como impulsarme e infundir en mí el deseo de seguir adelante en los momentos más difíciles que gracias a ustedes pude superar.

A ustedes debo este logro y con ustedes lo comparto.

Con todo cariño:

Guadalupe Pacheco González

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres

Gracias por estar siempre a mi lado y permitirme con su apoyo incondicional poder cumplir un sueño más, son el motor de mi vida y cada paso que doy lo hago para que puedan sentirse igual de orgullosos de mí como yo lo estoy de ustedes.

A mis Hermanos

Por ser siempre mis grandes amigos e impulsarme a seguir adelante en la maestría, por confiar en mí y apoyarme siempre al darme un buen consejo o un gran abrazo!!! Simplemente son los mejores hermanos, los quiero mucho.

A Silvia

Gracias por siempre estar dispuesta a brindarme tu apoyo eres una gran persona y somos muy afortunados de que formes parte de nuestra familia.

A mis sobrinos

Gracias por siempre brindarme una sonrisa, son el mejor regalo que la vida me ha dado, los quiero!

A Carmen Martínez Guzmán

Gracias por ser mi amiga, me recibiste en tu casa y fuiste una anfitriona de primera!, Te quiero mucho!

A la Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes

A usted le debo mi gusto por la investigación, jamás terminaría de agradecer la confianza, consejos, su apoyo incondicional, su conocimiento invaluable que me brindó para llevar a cabo esta investigación, pero sobre todo gracias por creer en mí, en verdad muchísimas gracias por todo!

A mis Sinodales

Gracias Dra. Abril Bernardette Martínez Rizo y Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández por su tiempo, sus valiosas observaciones, consejos y apoyo!!!

Al M.C. Roberto Padilla

*Gracias por sus consejos y conocimiento, siempre es un placer conversar con
Usted!*

A mis amigos

Gracias por compartir conmigo tantos buenos momentos y que aunque pase el tiempo, me han demostrado que siempre están a mi lado en las buenas y en las malas, GRACIAS!

A mis amigos Diana, Alicia y Elias

Gracias por permitirme descubrir el valor de tan bonita amistad son personas extraordinarias a las que siempre les desearé éxito y felicidad.

A mis amigos de Laboratorio de Resistencia Bacteriana

A Pablito, Brenda, Dani, Luz, Ceviche, Lendo, Geovanni, Aidee y el M.C. Armando Quintero, por todos esos buenos momentos que se convirtieron en anécdotas, por la amistad, gracias!!!

A la Dra. María del Rosario Morales Espinosa

Gracias por recibirme en su laboratorio y por todo el apoyo brindado durante la realización de mi estancia de investigación.

A mis amigos del Laboratorio de Genómica Bacteriana

Gracias por hacerme sentir como en casa y compartir conmigo tan gratos momentos.

AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a mi persona en la modalidad de becas estudiantiles para alumnos de maestría.

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, cuya coordinación se encuentra a cargo del Dr. Juan Diego García Paredes, agradezco el apoyo brindado a cada paso durante la realización de mi maestría.

A la dirección de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Resistencia Bacteriana para el desarrollo experimental de la presente investigación.

Al Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la UAN por permitir la realización de la mayor parte de los experimentos realizados en esta investigación

Al Laboratorio de Genómica Bacteriana de la UNAM por permitir la realización de parte de los experimentos realizados en esta investigación.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características químicas y tóxicas del arsénico	1
1.2 Arsénico, distribución y niveles ambientales	3
1.3 Resistencia bacteriana al arsénico	5
1.3.1 Oxidación del arsenito: Operón <i>aox</i>	6
1.3.2 Reducción del arsenato: Operón <i>ars</i>	9
1.4 Proteínas implicadas en el operón <i>ars</i>	12
1.4.1 ATPasa ArsA	12
1.4.2 Proteína transmembranal ArsB	13
1.4.3 Arsenato reductasa ArsC	13
1.4.3.1 Arsenato reductasa del plásmido R773	14
1.4.4 Metalochaperona ArsD	15
1.4.5 Regulador transcripcional ArsR	16
1.5 Epidemiología molecular y genotipificación bacteriana	17
1.5.1 Electroforesis de campos pulsados (PFGE)	19
2. ANTECEDENTES	23
3. HIPOTESIS	25
4. OBJETIVO GENERAL	26
4.1 Objetivos Específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Cepas y condiciones de cultivo	27
5.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	28
5.3 Obtención del ADN genómico	29

5.4	Identificación de los genes <i>ars</i>	29
5.5	Aislamiento de plásmidos.....	30
5.6	Electroforesis por campos pulsados (PFGE).....	31
5.6.1	Formación de bloques de agarosa para PFGE.....	31
5.6.2	Lisis celular y desproteización de los bloques de agarosa.....	32
5.6.3	Lavados de los bloques de agarosa.....	33
5.6.4	Restricción del DNA bacteriano en los bloques de agarosa con la enzima de restricción <i>XbaI</i>	33
5.6.5	Elaboración del gel de agarosa.....	34
5.6.6	Condiciones de la electroforesis por PFGE.....	35
6.	RESULTADOS	36
6.1	Aislamientos ambientales.....	36
6.2	Concentración mínima inhibitoria de las proteobacterias.....	37
6.3	Determinación del perfil plasmídico.....	40
6.4	Identificación de los genes <i>arsA</i> , <i>arsB</i> y <i>arsC</i>	42
6.5	Genotipificación de las proteobacterias por PFGE.....	45
6.5.1	Análisis de PFGE para el género <i>Klebsiella</i> spp.....	47
6.5.2	Análisis de PFGE para el género <i>Escherichia</i> sp.....	48
6.5.3	Análisis de PFGE para el género <i>Citrobacter</i> y <i>Yersinia</i> sp.....	48
6.5.4	Análisis de PFGE para el género <i>Enterobacter</i> spp.....	49
6.5.5	Análisis de PFGE para el género <i>Achromobacter</i> sp.....	50
7.	CONCLUSIONES	55
8.	PERSPECTIVAS	56
9.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	57
10.	ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores de DL50 de las principales especies arsenicales.....	2
Tabla 2. Enzimas de restricción de corte poco frecuente adecuadas para el análisis genómico bacteriano mediante PFGE.....	20
Tabla 3. Características de los diferentes aislados obtenidos en la zona contaminada del río Mololoa.....	28
Tabla 4. Condiciones para realizar la identificación de los determinantes genéticos <i>arsA</i> , <i>arsB</i> y <i>arsC</i> por la técnica de PCR.....	30
Tabla 5. Proporción de buffer H en función del número de bloques de agarosa a utilizar.....	33
Tabla 6. Proporción de buffer H y enzima de restricción en función de bloques de agarosa a utilizar.....	34
Tabla 7. Condiciones de electroforesis de PFGE.....	35
Tabla 8. Frecuencia porcentual del operón <i>ars</i> en los géneros ambientales..	43
Tabla 9. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género <i>Klebsiella</i> spp.....	52
Tabla 10. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género <i>Escherichia</i> sp.....	53
Tabla 11. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género <i>Yersinia</i> sp. y <i>Citrobacter</i> sp.....	53
Tabla 12. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género <i>Enterobacter</i> spp.....	54
Tabla 13. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género <i>Achromobacter</i> sp.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana para arsenico.....	5
Figura 2. Modelo de la enzima arsenito oxidasa.....	7
Figura 3. Contexto genético del operón <i>ars</i>	10
Figura 4. Mecanismo de resistencia a arsenito y arsenato mediado por el operó <i>ars</i>	11
Figura 5. Estructura tridimensional de ArsA	12
Figura 6. La bomba de expulsión ArsAB	13
Figura 7. Mecanismo de transferencia de AsIII entre ArsD y ArsA.....	15
Figura 8. Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE.....	21
Figura 9. Localización de los tres sitio de muestreo.....	27
Figura 10. Frecuencia porcentual de aislados ambientales.....	36
Figura 11. Frecuencia porcentual de los aislados según la concentración inhibitoria.....	38
Figura 12. Producto PCR del gen <i>arsA</i>	43
Figura 13. Producto PCR del gen <i>arsB</i> y <i>arsC</i>	44
Figura 14. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA entre los patrones PFGE de las proteobacterias.....	46

ABREVIATURAS

AB	Arsenobetaina
AC	Arsecolina
Acr3	Bomba de expulsión de AsIII
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
AN	Aguas negras
As	Arsénico
AsIII	Arsenito
AsV	Arsenato
aoxAB	Genes codificantes para la arsenito oxidasa AoxAB
arrAB	Genes que codifican para la arsenato reductasa respiratoria
arsA	Gen codificante para la ATPasa ArsA
arsB	Gen codificante para la bomba de expulsión ArsB
arsC	Gen codificante para la arsenato reductasa citoplasmática ArsC
arsD	Gen codificante para una Metalochaperona de AsIII ArsD
arsR	Gen codificante para el regulador transcripcional ArsR
CSB	Buffer de suspensión celular
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CHEF	Sistema CHEF (del inglés <i>C</i> lamped <i>H</i> omogeneous <i>E</i> lectric <i>F</i> ield)
DL50	Dosis letal media
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DMA	Ácido dimetilarsínico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (del inglés <i>E</i> nvironmental <i>P</i> rotection <i>A</i> gency)
GSH	Glutación

GlpT	Gliceroporina tetramérica
IARC	Agencia Internacional para la investigación sobre el cáncer (del inglés <i>Agency for Research on Cancer</i>)
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Sb	Antimonio
Lx	Lixiviado de residuos sólidos municipales
LB	Caldo Luria-Bertani
Mb	Mega base
MBD	Dominio de unión al metal (del inglés <i>Metal Binding Domain</i>)
Met	Metionina
mg/kg	Miligramo sobre kilogramo
Mm	Milimolar
MMA	Ácido monometilarsónico
NBS	Dominios de unión a nucleótidos (del inglés <i>Nucleotide Binding Sites</i>)
ng/m ³	Nanogramo sobre metro cúbico
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados (del inglés <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
Pit	Transportador inespecífico de fosfato (del inglés <i>Phosphate Inspecific Transporter</i>)
Pst	Transportador específico de fosfato (del inglés <i>Phosphate Specific Transporter</i>)
Pro	Prolina
Rif	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
R	Riachuelo

SDS	Dodecilsulfato sódico
TAT	Péptido señal TAT (del inglés <i>Twin Arginine Transporter</i>)
TBE	Amortiguador Tris/Ácido Bórico/EDTA
TE	Amortiguador Tris/EDTA
TMA ⁺	Ion tetrametilarsonio
TMAO	Óxido de trimetilarsina
Trx	Tiorredoxina
TR	Tiorredoxina reductasa
U	Unidades
UACQByF	Unidad Académica de Ciencias Químicas Biológicas y Farmacéuticas
UAN	Universidad Autónoma de Nayarit
µg/L	Microgramos sobre litro
µg/mm ³	Microgramo sobre milímetro cúbico

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit, con la finalidad de realizar una genotipificación de los aislamientos resistentes a arsénico provenientes de tres zonas de descargas de agua contaminada sobre el río Mololoa en la ciudad de Tepic, Nayarit. Se trabajaron 45 aislamientos ambientales de los cuales el 26.7 % provino del sitio aguas negras, 46.7 % de lixiviados de residuos sólidos municipales y 26.7 % del nachuelo. En cuanto a la clasificación por género, el más frecuente fue *Klebsiella* spp., con 28.9 % y el menor con 2.2 % perteneció a los géneros *Pseudomonas* sp., *Yokenella* sp., y *Kluyvera* sp. La capacidad de crecimiento en presencia de arsénico se determinó mediante ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Por una parte, la CMI para arsenito de la mayoría de las cepas (46.7 %) fue de 12 mM y solo el 8.9 % fue sensible a las concentraciones utilizadas. Por otra parte, la CMI para arsenato de la mayoría de las cepas (26.7 %) fue de 500 mM y solo una (2.2 %) perteneciente al género *Klebsiella* spp. presentó una CMI de 600 mM. Se utilizó la técnica de lisis alcalina para obtener el perfil plasmídico de los 45 aislados, lo que demostró la presencia de los mismos en el 88.9 % de las bacterias trabajadas. La identificación de los genes estructurales del operón *ars* por PCR, dio como resultado que el 86.7 % presentó el gen *arsB*, 51.1 % *arsC* y solo el 2.2 % *arsA*. La genotipificación de los 45 aislados bacterianos para su posible relación clonal se llevó a cabo mediante la técnica electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) para lo cual se utilizó la enzima de restricción *Xba*I. Se obtuvieron 10 grupos posiblemente clonales, siendo *Klebsiella* spp., el género que presentó mayor diversidad genética y *Enterobacter* spp., el de menor variabilidad en sus patrones de bandeo. La existencia de grupos clonales en nuestra colección de proteobacterias nativas y la determinación de sus características genotípicas y fenotípicas frente al As, brindaron información que puede ser utilizada a futuro en la implementación de procesos de biorremediación en ambientes contaminados con arsénico.

1. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento tóxico, introducido en la naturaleza tanto por fuentes geoquímicas como antropogénicas. La presencia de altos niveles de arsénico en el agua, aire y suelo, amenaza la salud de la población humana y de otros organismos (Yang *et al.*, 2010; Mayorga-Moreno, 2013).

Desde que el arsénico se identificó y aisló por primera vez en 1250 por Alberto Magno, se ha utilizado ampliamente debido a sus propiedades medicinales y tóxicas (Mandal y Suzuki, 2002). Hasta los años 40 del siglo XX, los compuestos arsenicales eran utilizados en el tratamiento de varias enfermedades como la sífilis, la leucemia y la psoriasis, así como agente antiparasitario en la profilaxis de la tripanosomiasis y la amebiasis de humanos (Thorsen *et al.*, 2006; Ordoñez, 2009).

A pesar de la disminución de su uso, el arsénico es la causa más frecuente de intoxicación aguda por metaloides, y es segundo, solo superado por el plomo, en cuanto a ingestión crónica (Rubinos-González, 2007). Los numerosos casos de intoxicación epidémica por arsénico ocurridos en las últimas décadas y la grave situación en el golfo de Bengala, donde una población de 34 millones de personas está expuesta a niveles tóxicos de As en agua de bebida (Paiva, 2007) originó que el estudio del arsénico y sus compuestos, desde una perspectiva ambiental sea el campo en el que se realizan los mayores esfuerzos (Rubinos-González, 2007).

1.1 Características químicas y tóxicas del arsénico

El As es un metaloide y sus propiedades químicas responden a su ubicación dentro del grupo V de la tabla periódica. El As tiene un número atómico de 33, unidad de masa atómica de 74.92 g/mol y comparte características químicas con el nitrógeno (N), fósforo (P), antimonio (Sb) y bismuto (Bi) (Wu, 2007; Messens y Silver, 2006).

El arsénico puede presentarse en formas químicas orgánicas e inorgánicas, y existir en cuatro estados de oxidación como As^{3-} , As^0 , As^{3+} y As^{5+} (Mateos *et al.*,

2006). Las especies de arsénico orgánicas presentan diferentes grados de metilación: monometiladas [ácido monometilarsónico, MMA], dimetiladas [ácido dimetilarsínico, DMA], trimetiladas [óxido de trimetilarsina (TMAO), arsenobetaina (AB) y arsenocolina (AC)] y tetrametiladas [ion tetrametilarsonio (TMA⁺)] (Torres-Escribano, 2011).

En el ambiente el As generalmente se presenta en forma inorgánica en dos estados redox: arsenito (AsIII, AsO₂⁻³) y arsenato (AsV, AsO₄⁻³) (Carabantes y Ferricola, 2003). El arsenito es la forma química más soluble y más móvil, por lo tanto, es la forma más tóxica. El arsenato, a diferencia del arsenito, se fija fuertemente a la superficie de varios minerales comunes como la ferrihidrita y alúmina (Smedley y Kinniburgh, 2002; Muller *et al.*, 2003).

La forma química y estado de oxidación del arsénico están directamente relacionados a sus efectos toxicológicos. Según los datos de dosis letal 50 (DL50) obtenidos en animales de experimentación (Tabla 1), definida como la dosis necesaria para producir la muerte del 50 % de la población expuesta, la toxicidad de las especies arsenicales seguiría el orden decreciente: As⁺³ > As⁺⁵ > TMA⁺ > DMA > MMA > AC > AB = TMAO (Mandal y Suzuki, 2002; Torres-Escribano, 2011).

Tabla 1. Valores de DL50 de las principales especies arsenicales

Especie arsenical	DL50 (mg Kg ⁻¹ peso corporal)	Animal de experimentación
AsIII	34,5	Ratas
AsV	41	Ratas
MMA	1800	Ratones
DMA	1200	Ratones
AB	>10000	Ratones
AC	6500	Ratones
TMAO	10600	Ratones
TMA ⁺	890	Ratones

MMA= Ácido monometilarsónico; DMA= Ácido dimetilarsínico; AB= Arsenobetaina; AC= Arsenocolina; TMAO= Óxido de trimetilarsina; TMA⁺= Ion tetrametilarsonio; mg= Miligramos y Kg= Kilogramo (Tomado y modificado de Torres-Escribano, 2011).

La toxicidad del arsenito es considerada de 25 a 60 veces superior a la del arsenato, debido a su capacidad de unión a grupos sulfhidrido de las proteínas.

inactivando su función, por ejemplo, el complejo piruvato-deshidrogenasa, glutatión reductasa, ADN ligasa, tioredoxina peroxidasa, entre otras (Shen *et al.*, 2013). La toxicidad del arsenato es debida a su similitud con el ácido ortofosfórico, lo que provoca desacoplamiento en el proceso de fosforilación oxidativa (Silver y Phung, 2005; Trnpathi *et al.*, 2007).

En la actualidad, el arsénico está clasificado por la Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer (IARC) como carcinógeno en humanos (Carabantes y Ferricola, 2003). En general, las personas expuestas de forma crónica al As presentan incrementos en las tasas de enfermedades como el cáncer de piel, vejiga, pulmón, hígado y leucemia, además de lesiones cutáneas (Gebel, 2001; Tapio y Grosche, 2006). Por lo tanto, aunque los mecanismos de acción del arsénico no estén totalmente dilucidados, se puede concluir que existe una asociación inequívoca entre exposición al arsénico e inducción de cáncer (Paiva, 2007).

1.2 Arsénico, distribución y niveles ambientales

El arsénico es el número veinte en la lista de los elementos más abundantes sobre la corteza terrestre y es un componente de más de 200 minerales (Mandal y Suzuki, 2002; Paiva, 2007). Las fuentes naturales de arsénico incluyen el volcanismo, la actividad hidrotérmica y la erosión de rocas sedimentarias. La acción antropogénica por su parte constituye una segunda fuente de arsénico en el medio. Entre las acciones antropogénicas se encuentran el uso de agroquímicos como insecticidas y herbicidas, conservadores para madera, residuos de la fundición, explotación minera, producción de vidrio, papel y semiconductores (Tchourwou *et al.*, 2004; Badr y Al-Qahtani, 2013).

Dado que el arsénico es un compuesto natural de la corteza terrestre, puede estar presente en todos los medios, incluso en el agua de mar (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002). La concentración natural de arsénico en agua de mar usualmente es menor que 2 µg/L, mientras que en aguas superficiales y subterráneas la concentración varía entre 1 y 10 µg/L. Niveles elevados han sido encontrados en

agua de origen geoquímica y asociada a la actividad hidrotermal (Camabantes y Ferricola, 2003).

En el aire la concentración del metaloide varia entre 1 y 10 ng/m³ en áreas rurales y es levemente más alto en áreas urbanas alcanzan valores cercanos a los 20 ng/m³. En áreas próximas a plantas que queman carbón pueden encontrarse valores de hasta 1 µg/m³. La concentración de arsénico en rocas y suelos no contaminados es generalmente menor de 20 mg/kg (Buchet y Lison, 2000).

Los niveles de arsénico se han incrementado de forma significativa en distintas regiones del planeta. India y Bangladesh son las zonas más afectas, donde más de 500 millones de personas se encuentran en situación de riesgo por el consumo de agua contaminada. En Japón, Nueva Zelanda y EEUU, se pueden encontrar altos niveles de este metaloide en el suelo y en las rocas, mientras que en Chile, Argentina, Taiwán y Reino Unido, existen concentraciones superiores a 1,100 µg/L en el agua de consumo (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

Con el objetivo de reducir el riesgo de exposición a concentraciones de arsénico consideradas peligrosas para la salud, se empiezan a regular sus niveles en el ambiente. En 1942, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) estableció el límite de 50 µg/L en el agua potable, basándose en datos del Servicio de Salud Pública (Paiva, 2007). Por su parte la Unión Europea y la Organización Mundial de Salud establecen una concentración máxima de 10 µg/L de As (Berg *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el estudio de este metaloide es de gran importancia en cuanto a contaminación ambiental, debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Específicamente las bacterias han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de algunos elementos esenciales para la vida como el carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, también por su capacidad para biotransformar compuestos no esenciales como el arsénico, que representa una amenaza para el ambiente y la salud humana (Suárez y Reyes, 2002).

1.3 Resistencia bacteriana al arsénico

La contaminación del agua, aire y suelo por metales es uno de los problemas ambientales más severos debido a que estos no pueden ser degradados y permanecen en el ambiente (Acosta *et al.*, 2007). Su presencia ejerce una fuerte presión de selección sobre los microorganismos que ahí habitan, cuando la descarga del metaloide es de carácter permanente como sucede habitualmente con este tipo de contaminante. Esta presión provoca una selección natural de aquellos genotipos que pueden resistir y adaptarse a dicho estrés (Moraga *et al.*, 2003; Silver y Walderharg, 1992).

La relación arsénico-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que se encuentran asociados a determinantes genéticos y que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el metaloide (Anisimova *et al.*, 1993; Montuelle *et al.*, 1994). Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: enzimas que oxidan el arsenito (AsIII) a arsenato (AsV) (Figura 1A) o las que reducen el AsV a AsIII (Figura 1B y 1C) y transportadores de membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Figura 1C) (Cervantes *et al.*, 2006, Silver y Phung, 2005).

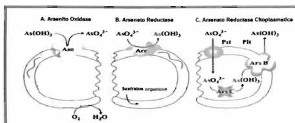


Figura 1. Mecanismos de resistencia bacteriana para arsénico. La resistencia al arsénico se debe a diversos mecanismos que involucran reacciones de óxido-reducción sobre el metaloide. (A) Oxidación de arsenito realizada por la enzima de membrana *Aso*. (B) Reducción de arsenato por la enzima *ArsI*. (C) El AsV entra al citoplasma a través del sistema *Pst* o *Pit*, es reducido a $AsIII$ por la arsenato reductasa citoplasmática (*ArsC*) y posteriormente es eliminado por la bomba de expulsión *ArsB* (Tomada y modificada de Silver y Phung, 2005).

Estos mecanismos de resistencia a arsénico se han reportado en organismos taxonómicamente diversos y metabólicamente versátiles. Por ejemplo, el AsIII es oxidado a AsV por las bacterias oxidantes del AsIII que presentan enzimas arsenito oxidasas localizadas en el periplasma celular o asociadas a membrana citoplasmática (Kotzé, 2006). Estos microorganismos quimioautótrofos utilizan oxígeno y en la respiración anaerobia usan nitrato como aceptor terminal de electrones, a la vez que realizan la fijación de CO₂ atmosférico como fuente de carbono (Santini y Vanden, 2004; Muller *et al.*, 2006; Páez *et al.*, 2009).

Algunas bacterias heterotróficas oxidantes de AsIII no parecen utilizar el arsenito como donador de electrones, lo cual sugiere que la oxidación del AsIII puede ser una forma de detoxificación para dichas especies (Croal *et al.*, 2004). Este mecanismo de detoxificación se ha reportado en miembros de los géneros α , β y γ -proteobacterias, quienes utilizan mecanismos de oxidación del arsenito codificados en los genes estructurales del operón *aox*, *ao* y *aro* (Lett *et al.*, 2012).

En la vertiente contraria se presentan microorganismos que utilizan el AsV como aceptor terminal de electrones, en lo que constituye una respiración anaeróbica típica. Estos microorganismos oxidan diferentes compuestos ya sean de origen orgánico como lactato, acetato, formiato y compuestos aromáticos o bien inorgánicos como hidrógeno y sulfuros, lo cual provoca la formación de AsIII (Pérez *et al.*, 2005; Ordoñez, 2009). Los mecanismos de respiración del arsenato y de la detoxificación del AsV se atribuyen a los genes que codifican la arsenato reductasa *arrAB* (Song *et al.*, 2009) y al operón *arsRDABC* respectivamente (Figura 2C) (Muller *et al.*, 2006; Mateos *et al.*, 2006).

Estos procesos metabólicos y de detoxificación donde las formas inorgánicas de As están implicadas, se detallan a continuación.

1.3.1 Oxidación del arsenito: Operón *aox*

La oxidación bacteriana de AsIII a AsV fue descrita en 1916, pero no fue hasta 1992 que la primera arsenito oxidasa fue aislada a partir de *Alcaligenes faecalis*

(Anderson *et al.*, 1992). Esta enzima está implicada tanto en la desintoxicación de arsénico en bacterias heterótrofas (Muller *et al.*, 2003), como en la generación de energía en bacterias quimioheterótrofas y quimiolitotróficas (Oremland *et al.*, 2002; Santini y Vanden, 2004).

Arsenito oxidasa (Aox) es una enzima redox periplasmática. Presenta una estructura heterodimérica que consta de una subunidad grande y otra pequeña. La subunidad catalítica mayor contiene un centro de molibdeno y un centro [3Fe-4S], mientras la subunidad menor está formada por un centro Rieske [2Fe-2S] (Figura 2) (Ellis *et al.*, 2001). Los genes que codifican estas dos subunidades fueron identificados y secuenciados en la bacteria heterótrofica *Herminiimonas arsenicoxydans* cepa ULPAs1, y se demostró que ambos genes están en el mismo operón *aox/aro/aso* (Muller *et al.*, 2003; Lett *et al.*, 2012).

El primer gen del operón *aox* codifica la subunidad Rieske y se le nombró *aoxA*. La designación *aoxB* se utiliza para el gen que codifica la subunidad pesada Molibdeno (Hille, 1996; Muller *et al.*, 2003; Silver y Phung, 2005). AoxA posee un péptido señal TAT (del inglés *Twin Arginine Transporter*) en el extremo amino terminal que guía la proteína heterodimérica plegada durante el transporte del citoplasma al espacio periplásmico (Figura 2) (Muller *et al.*, 2003).

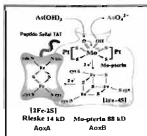


Figura 2. Modelo de la enzima arsenito oxidasa. La enzima AoxB está integrada por la subunidad Rieske y la subunidad Mo-pterina. Contiene un orificio de entrada al AsIII que transfiere dos electrones al Molibdeno (Mo) lo que provoca su reducción a Mo(IV) y

la oxidación del arsenito a arsenato. El arsenato se libera de la enzima y es liberado por el mismo orificio de entrada. El Mo(V) transfiere los dos electrones al grupo 3Fe-4S, con lo cual se regenera el centro de reacción Mo(VI). Se realiza la transferencia de los dos electrones del grupo [3Fe-4S] a la subunidad pequeña Rieske [2Fe-2S] y finalmente la transferencia de los electrones del Rieske de la arsenito oxidasa a la cadena respiratoria (Tomada y modificada de Silver y Phung, 2005).

Se ha propuesto que la oxidación del arsenito por esta enzima ocurre mediante el siguiente mecanismo: el arsenito ingresa a través de un orificio cónico presente en la superficie de la enzima y entra en contacto directo con el Molibdeno (VI) embebido en la misma. Inmediatamente se produce una transferencia de dos electrones del arsenito al grupo Molibdeno lo que provoca su reducción a Molibdeno (IV), posteriormente el arsenato es liberado a través del mismo orificio de entrada. Después los electrones se transfieren primero al grupo [3Fe-4S] dentro de la subunidad grande Mo-pterina de la proteína y después a un grupo [2Fe-2S] situado en la subunidad pequeña. A partir de ese sitio los electrones se transfieren a la cadena respiratoria de la membrana interna y eventualmente al oxígeno, que es el aceptor terminal de electrones (Figura 2) (Anderson *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2001; Hoke *et al.*, 2004; Silver y Phung, 2005; citados en Pacheco-González *et al.*, 2013).

En *Agrobacterium tumefaciens* 5A, se identificó un mecanismo complejo para la expresión de los genes estructurales del arsenito oxidasa (*aoxAB*) que implica la percepción de *quorum sensing*, así como un sistema de dos componentes de transducción de señal. Los genes regulatorios del sistema de dos componentes *aoxS* y *aoxR* están localizados río arriba del operón *aoxAB*: *aoxS* codifica para una histidina quinasa (HK) y *aoxR* funciona como un regulador transcripcional. Además de *aoxA* y *aoxB*, río abajo se localizan los genes *aoxC* y *aoxD* que codifican tanto para el citocromo *c*, como para una enzima involucrada en la biosíntesis de la molibdopterina respectivamente (Kashyap *et al.*, 2006). Por último, dentro del operón *aox* se encuentra el gen denominado *aoxX*, el cual codifica para una proteína de unión a oxianiones (Cai *et al.*, 2009).

En *Ochrobactrum tritici* se reportó la presencia de todos los genes anteriores dentro del operón *aox* (Branco *et al.*, 2009), al igual que en cepas de *Herminiimonas arsenicoxydans*, en las cuales por mutagénesis con el transposón *Tn5* se demostró que existen otras proteínas que participan en el control de la oxidación del arsenito, como son *RpoN* y *DnaJ*, las cuales consisten en un factor sigma N (σ^{54}) alternativo de la ARN polimerasa y en la co-chaperona Hsp-70 (Koechler *et al.*, 2010). Se ha mencionado además que la regulación de la expresión del operón responde a señales *quórum sensing* (Kashyap *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos regulatorios de la oxidación del arsenito aún no están totalmente esclarecidos (Quémèneur *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2010; Sultana *et al.*, 2012).

La importancia ecológica de este proceso oxidativo es indudable ya que la oxidación de AsIII a AsV es un proceso biorremediador debido a que el AsV es menos tóxico y puede ser eficientemente removido del ambiente mediante técnicas como la coagulación con FeIII (Leist *et al.*, 2000; Battaglia *et al.*, 2002; Cai *et al.*, 2009).

1.3.2 Reducción del arsenato: Operón *ars*

En bacterias arsenato-reductoras, el sistema más estudiado corresponde al operón *ars*, el cual puede localizarse en cromosoma o plásmido (Figura 3) y funcionar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Silver y Phung 2005; Branco *et al.*, 2008; Páez *et al.*, 2009).

Este operón fue el primer ejemplo descrito de un sistema de expulsión de arsenito y antimonio (SbIII). Su presencia se determinó en el plásmido pR773 de *Escherichia coli* (Carlin *et al.*, 1995; Cervantes *et al.*, 2006). Donde se encontraron cinco genes: *arsA*, *arsB*, *arsC*, *arsD* y *arsR* (Figura 3A), mientras que a nivel cromosomal sólo se identificaron tres cistrones que se nombraron *arsB*, *arsC*, y *arsR* (Figura 3B), debido a la fuerte homología con los genes del operón *ars* plasmidico (Figura 3ABC) (Silver y Walderhaug 1992; Diorio *et al.*, 1995; Rosen, 2002; Wu, 2007; Mellado *et al.*, 2011). Los plásmidos pI258 y pSX267 de

Staphylococcus aureus también tienen el operón *arsRBC* lo que le confiere resistencia a arsénico (Cuevas *et al.*, 2011).

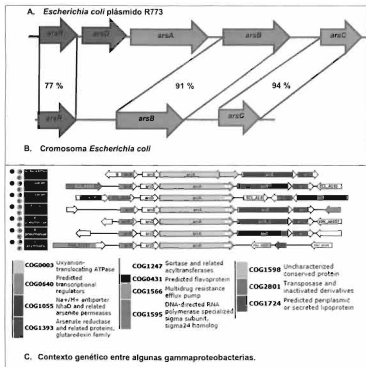


Figura 3. Contexto genético del operón *ars*. El plásmido R773 de *E. coli* muestra los genes de resistencia *arsRDABC* (A). En el cromosoma de *E. coli* inicialmente se determinó la presencia de los genes *arsRBC* (B). Actualmente se tiene evidencia de la presencia del operón *ars* en cromosoma de *E. coli* y otras especies que mantienen analogía con el contexto genético del operón (C). Los colores muestran el grupo de ortología para cada uno de los genes del inciso AB. (Tomada y modificada de Wu, 2007, C. Gene Context Tool III (<http://operons.ibl.unam.mx/gct3/>)).

La resistencia al arsenito mediada por el operón *ars* se debe a que expulsa el As(III) del citoplasma por un complejo formado por las proteínas ArsA y ArsB (Figura 4). ArsA es una proteína hidrofílica asociada con la membrana y con actividad ATPasa (Mellado *et al.*, 2011). ArsB es una proteína que se comporta como una bomba de membrana interna que forma un canal de difusión de aniones (Villadangos *et al.*, 2012).

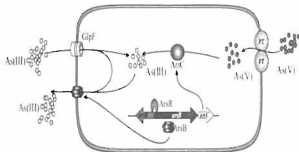


Figura 4. Mecanismo de resistencia a arsenito y arsenato mediado por el operón *ars*. El arsenito se introduce a la célula bacteriana mediante las gliceroporinas (GlpF), a su vez el transportador de fosfatos (PT) internaliza el arsenato. La arsenato reductasa ArsC reduce el AsV a AsIII que posteriormente es eliminado por la bomba de expulsión ArsB. La expresión de los genes del operón *ars* se encuentran bajo la regulación de la proteína ArsR (Tomada y modificada de Ordoñez, 2009).

Para conseguir que todo el arsenito este en forma transportable, contiguo al gen *arsB*, se encuentra *arsC*, que codifica para una arsenato reductasa citoplasmática monomérica que emplea glutatón reducido como donador de electrones para transformar el AsV en AsIII, el cual finalmente es expulsado por el complejo ArsAB. De esta forma, el sistema *ars* confiere resistencia a ambos oxianiones (Figura 4) (Mukhopadhyay y Rosen, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Eppinger *et al.*, 2012).

1.4 Proteínas codificadas en el operón *ars*

1.4.1. ATPasa ArsA

ArsA es una ATPasa dependiente de sustrato que presenta dos sitios de unión de nucleótidos (NBS_s) con sus correspondientes sitios de unión alostéricos (Walmsley *et al.*, 2001). ArsA está compuesta de dos mitades homólogas (A1: residuos 1-282 y A2: residuos 321-583) conectadas por un pequeño "linker" de 25 residuos (Figura 5) (Fu *et al.*, 2010).

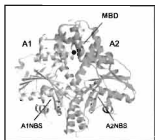


Figura 5. Estructura tridimensional de ArsA. Cada uno de los homólogos de la proteína ArsA, presenta dos sitios de unión a nucleótido (NBS), el dominio MBD es el sitio de unión del As. La actividad ATPasa del sitio NBS, incrementa la extrusión del metaloide (Tomada y modificada de Zhou *et al.*, 2000).

Análisis estructurales de ArsA demostraron que los NBS están formados por residuos de A1 y A2 (Zhou *et al.*, 2000). Tanto A1 como A2 exhiben actividad ATPasa independiente, la cual se estimula de 30 a 40 veces como resultado de la unión de los metaloides que transporta y que requiere la interacción de las dos mitades (Ordoñez, 2009). Existe además un dominio de unión a metaloide-(MBD), que se activa alostéricamente y se ubica en el extremo opuesto de la proteína a partir de los NBS. Por otra parte, el conector está situado cerca de los NBS y participa activamente en los cambios conformacionales que se producen en ArsA ante la unión del sustrato (Kotzé, 2006).

1.4.2 Proteína transmembranal ArsB

ArsB es el determinante de resistencia a As más estudiado en bacterias y arqueas y se clasifica dentro de la superfamilia de transportadores de iones. Esta proteína de 45 kDa está formada por 12 hélices alfa transmembranales y tres bucles citosólicos situados entre los residuos 77-92, 198-221 y 264-277, encargados de unirse a ArsA (Figura 6) (Meng *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2006; Wu, 2007).

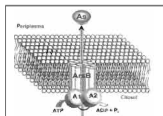


Figura 6. La bomba de expulsión ArsAB. El complejo de ArsA y ArsB forma una ATPasa translocadora de aniones que cataliza la extrusión de arsénito y antimonio. ArsA tiene dos partes homólogas, A1 (N-terminal) y A2 (C-terminal). ArsB es una proteína de membrana interna y sirve tanto para el anclaje de ArsA a la membrana y como bomba de expulsión de AsIII y SbIII (Tomado y modificado de Rosen *et al.*, 1999).

Además, ArsB tiene un modo dual de obtención de energía: (i) puede actuar como un transportador secundario que asocia la fuerza motriz de protones al proceso de transporte o (ii) formar un complejo con ArsA (ArsAB), donde la hidrólisis de ATP es el motor que posibilita dicho transporte (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Ordóñez, 2009). Este es el único sistema de expulsión de iones inorgánicos tóxicos que puede funcionar de manera dual: impulsado por la hidrólisis del ATP o por un proceso quimiosmótico (Cervantes *et al.*, 2006).

1.4.3 Arsenato reductasa: ArsC

Las arsenato reductasas (ArsC) son proteínas citoplasmáticas monoméricas de pequeño tamaño (131 residuos en el caso de *S. aureus* y 141 para *E. coli*) (Mennens y Silver, 2006) que reducen el arsenato a arsénito para que sea

exportado por la bomba de salida ArsAB (Kotzé, 2006). Las proteínas ArsC descritas hasta la fecha presentan diferencias muy claras asociadas no sólo a la heterogeneidad de sus secuencias y a su conformación estructural (Martin *et al.*, 2001), sino también a los mecanismos de reducción y a la localización de las cisteínas catalíticas.

Estas características permiten su clasificación: (i) las arsenato reductasas dependientes de tiorredoxina (Trx) y de tiorredoxina reductasa (TR) cuyos principales exponentes son la ArsC del pl258 de *S. aureus* y la ArsC de *Bacillus subtilis* y (ii) las arsenato reductasas dependientes de glutaredoxina (Grx) y glutatión (GSH), que presentan dos grupos bien diferenciados; el representado por la ArsC del plásmido R773 de *E. coli* y el del grupo de la Acr2p de *Saccharomyces cerevisiae* (Messens y Silver, 2006; Castillo-Rodríguez, 2005; Kozér, 2006).

1.4.3.1 Arsenato reductasa del plásmido R773

La proteína ArsC (141 aa) del plásmido de resistencia R773 es la enzima dependiente de GSH/Grx mejor caracterizada desde el punto de vista enzimológico y estructural. Esta ArsC emplea en su catálisis tres residuos de cisteína al igual que ocurre en las enzimas dependientes de Trx. La diferencia fundamental es que de los tres residuos indicados tan solo uno de ellos lo aporta la enzima ArsC, mientras que los dos restantes los aportan el GSH y la Grx respectivamente. Otras diferencias significativas de esta reductasa, en relación con la ArsC codificada en el pl258, es que no presenta actividad ATPasa (Mukhopadhyay *et al.*, 2000) ni sitios de unión a potasio (K) (Roos *et al.*, 2006).

Además en su secuencia primaria aparecen dos residuos de cisteína (Cys12 y Cys106); solo la Cys12 es necesaria para la reducción de AsV (Martin *et al.*, 2001; DeMel *et al.*, 2004). El arsenato se une a la cisteína y luego es reducido en dos pasos por la glutaredoxina (Grx) y glutatión (GSH) produciendo el intermediario Cys12-S-AsIII que luego se hidroliza para liberar el arsenito (Roseen, 2002). Igualmente el pH óptimo de la reacción es de 6.5 en contraposición al óptimo

descrito para la ArsC del pl258 que es de 8.0 (Ordoñez, 2009; Castillo-Rodríguez, 2005).

1.4.4 Metalochaperona ArsD

ArsD actúa como un homodímero de 120 residuos cada subunidad (Chen y Rosen, 1997). Análisis genéticos sugieren que los residuos Cys12, Cys13 y Cys18 de ArsD, están implicados en la transferencia citosólica de arsenito a la ATPasa ArsA, es decir, ArsD actúa como una metalochaperona que transfiere el AsIII a ArsA. (Yang *et al.*, 2010). En el modelo descrito, ArsD interacciona con ArsA con baja afinidad en ausencia del metaloide (Lin *et al.*, 2007b; Yang *et al.*, 2010). Esta interacción no se establece ni con ArsC ni con ArsR. Esta débil interacción entre ArsA y ArsD se incrementa cuando el AsIII se une al sitio de unión a metales de ArsD. La unión de AsIII a ArsD se produce como consecuencia de una afinidad muy superior a la que exhibe ArsA por el AsIII (Lin *et al.*, 2007b).

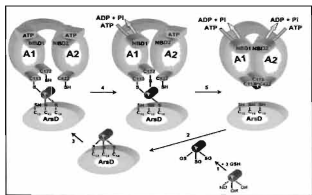


Figura 7. Mecanismo de transferencia de AsIII entre ArsD y ArsA. El en primer paso una molécula de $As(OH)_3$ forma $As(GS)_3$ al unirse a 3 GSH citosólico. Posteriormente, ArsD extrae el AsIII de $As(GS)_3$ por intercambio de un grupo tiol con los residuos de Cys12, Cys13 y Cys18. En una serie gradual de intercambios tiol, la unidad de AsIII se transfiere a tiolatos de Cys113, Cys172, Cys422 de ArsA, cuando los dos dominios de

unión de nucleótidos NBD1 y NBD2, hidrolizan ATP. La unión del AsIII provoca un cambio conformacional en ArsA que incrementa la hidrólisis de ATP y finalmente permite la extrusión final del metaloide (Tomado y modificado de Yang et al., 2010).

La cesión del AsIII desde ArsD a ArsA se debe producir a expensas de cambios conformacionales en las proteínas, ya que es un proceso termodinámicamente desfavorable. Por lo tanto, es previsible que la interacción entre ellas posibilite cambios en la afinidad de los sitios de unión a los metales implicados, de manera que los residuos de cisteína de ArsD involucrados en la interacción con ArsA, se acerquen estéricamente al sitio de unión a metales de ArsA. Esto desorganiza el sitio de unión a metales de ArsD y baja su afinidad, lo que posibilitaría la transferencia del AsIII desde ArsD hasta ArsA (Figura 7).

ArsD no solo actúa como facilitador de AsIII a ArsA, sino que la interacción entre las dos proteínas incrementa la actividad ATPasa de ArsA y la afinidad de ArsA por el AsIII, lo que hace a ArsA más efectiva a bajas concentraciones del metaloide (Lin et al., 2007a; Yang et al., 2010).

1.4.5 Regulador transcripcional ArsR

El Arsénico presente en el ambiente desencadena en los microorganismos una respuesta que dispara los mecanismos de resistencia al metaloide. Esta respuesta la inician las proteínas metaloreguladoras de la familia ArsR/SmtB (Ordoñez, 2009). Los miembros de esta familia funcionan exclusivamente como represores transcripcionales e incluye el represor SmtB de *Synechococcus* sp., y el represor ArsR en *E. coli* (Wu, 2007).

La proteína de 13 kDa ArsR del plásmido de *E. coli* R773 es un homodímero formado por dos monómeros de 117 residuos y controla el nivel basal de la expresión del operón *ars* (Wu, 2007). Cada monómero posee la secuencia Cys³²-Val-Cys³⁴-Asp-Leu-Cys³⁷ en la primera hélice de la región de unión al DNA. Los tres residuos de cisteína de dicha secuencia forman un triple enlace coordinado intramolecular específico para el AsIII, lo que constituye el sitio de unión del metaloide (Ordoñez, 2009).

En ausencia de arsenito el represor ArsR está unido al sitio operador/promotor del operón *ars* y evita la expresión de los genes estructurales. Cuando el arsenito entra al citoplasma interacciona con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de ArsR, lo que ocasiona un cambio en la conformación del represor, lo que trae como consecuencia la disociación de ArsR del sitio operador/promotor y subsecuentemente una expresión de los genes estructurales del operón *ars* (Stoker *et al.*, 2003; Butcher y Rawling, 2002; Wu, 2007; Ordoñez, 2009).

Por lo tanto, la presencia de cada uno de los productos del operón *ars* puede apoyar la persistencia de cepas específicas en un ambiente contaminado por arsénico. Este mecanismo de persistencia puede ser detectada por medio de herramientas moleculares como PCR. Además, se puede determinar las relaciones genéticas entre estos aislados ambientales mediante técnicas de genotipificación como la electroforesis por campos pulsados (Nascentes *et al.*, 2012).

1.5 Epidemiología molecular y genotipificación bacteriana

La epidemiología molecular es una disciplina que permite abordar los estudios a través de la utilización de técnicas moleculares que combinan la epidemiología analítica con métodos avanzados de laboratorio (Mathema *et al.*, 2006; Aguadero, 2014). El conocimiento derivado de los estudios epidemiológicos ha incrementado la información sobre las bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades infecciosas debido a que permite determinar la historia natural de los padecimientos, es decir, su etiología, frecuencia de aparición, distribución, sus vías y patrón de diseminación y sus reservorios o factores que incrementan el riesgo de contraerla (Johnson y Russo, 2005; Vilchez y Alonso, 2009).

La investigación microbiológica con fines epidemiológicos requiere de métodos de tipificación de cepas. Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar entre cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. Los métodos de tipificación en general deben cumplir con dos requisitos principales: poder discriminar entre aislados no relacionados y, ser capaces de brindar

resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes (Schreckingef, 2008). Los métodos para tipificación de microorganismos pueden clasificarse en dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos (Singh *et al.*, 2006; Vilchez y Alonso, 2009).

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas que históricamente constituyeron la primera herramienta que permitió la comparación de microorganismos (Singh *et al.*, 2006). Estos métodos incluyen la determinación de actividad enzimática, capacidad metabólica y determinantes antigénicos o de susceptibilidad frente a antimicrobianos (Valero-Leal, 2012).

No obstante, el alcance de estos procedimientos puede encontrar serias restricciones ya que los rasgos fenotípicos son susceptibles a la influencia del ambiente, y pueden provocar variaciones en la expresión genética, por lo que el resultado obtenido a través de la detección de este tipo de caracteres puede presentar poca estabilidad, reproducibilidad o poder discriminatorio (Vrsaljevic y Lupski, 2002).

Por otra parte, los métodos genotípicos o de genotipificación involucran el estudio del genoma del microorganismo causal de la enfermedad. Por lo que permiten analizar propiedades, características o polimorfismos genéticos presentes en los agentes etiológicos (Aguadero, 2014). En este sentido, las técnicas de genotipificación permiten determinar si los microorganismos analizados se encuentran genéticamente relacionados y por lo tanto, pueden ser considerados como representantes de una misma cepa o clon (Singh *et al.*, 2006).

A nivel epidemiológico se hace indispensable la evaluación de la clonalidad entre aislados cuando se estudian brotes de infecciones intra o extrahospitalarias. Por ejemplo, para establecer la relación genética entre aislados de una misma fuente pero que manifiestan diferencias a nivel fenotípico o, por el contrario, aislados provenientes de distintos pacientes pero que muestran características fenotípicas similares. La confirmación de la relación genética entre estos microorganismos

ayuda a determinar la fuente de la infección, el número de clones circulantes, el vehículo, la ruta y el patrón de distribución (Singh *et al.*, 2006).

El conocimiento que brindan las técnicas de genotipificación permite la implementación de nuevos programas que contribuyan al control y prevención de los brotes infecciosos (Vilchez y Alonso, 2009). Por lo antes mencionado, las técnicas de genotipificación se han popularizado a lo largo de los años, se han modificado y perfeccionado para incrementar su capacidad discriminatoria, reproducibilidad y versatilidad (Singh *et al.*, 2006).

Los métodos moleculares para la genotipificación son variados y pueden estar basados en el análisis de polimorfismos de secuencias repetidas de elementos variables o, del genoma completo de los microorganismos. Desde el punto de vista metodológico las técnicas moleculares para genotipificación pueden clasificarse en los tres grupos siguientes (Aguadero, 2014).

- a) Las relacionadas con la amplificación de fragmentos de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- b) Las que involucran la secuenciación parcial del genoma de los microorganismos, como son el MLST (del inglés MultiLocus Sequencing Typing) o el Spa typing.
- c) Aquellas basadas en el estudio y comparación del electrocarilipo mediante electroforesis de campo pulsado PFGE (del inglés Pulsed-Field Gel Electrophoresis).

Cada una de estas herramientas ha ofrecido una alternativa de gran utilidad para la investigación epidemiológica (Vilchez y Alonso, 2009). Sin embargo para este trabajo se utilizó la técnica de electroforesis de campos pulsados.

1.5.1 Electroforesis de campos pulsados (PFGE)

La electroforesis de campo pulsado corresponde a una técnica de genotipificación que fue descrita por primera vez en 1984 por David Schwartz y Charles Cantor.

Esta técnica ha tomado mucha importancia en los últimos años y actualmente se considera el "estándar de oro" para la tipificación de bacterias patógenas gracias a su capacidad discriminadora y su utilidad en la separación de fragmentos de ADN de un tamaño entre las 10 kb y 10 Mb (Hunter *et al.*, 2005; Schreckinger, 2008).

El ADN genómico de los aislados en estudio es digerido con endonucleasas de corte poco frecuente. La enzima de restricción varía de acuerdo a la genómica bacteriana que se desea analizar por PFGE (Tabla 2) (Goering, 2010).

Tabla 2. Enzimas de restricción de corte poco frecuente adecuadas para el análisis genómico bacteriano mediante PFGE.

Organismo	Enzima	Organismo	Enzima
<i>Enterobacter</i> spp.	XbaI, SpeI	<i>Proteus mirabilis</i>	SfiI, NotI
<i>Enterococcus</i> spp.	SmaI, ApaI	<i>Salmonella</i> spp.	XbaI, BlnI, NotI
<i>Escherichia coli</i>	XbaI, BlnI, NotI, SfiI	<i>Vibrio cholerae</i>	SfiI, NotI
<i>Klebsiella</i> spp.	XbaI, AsnI	<i>Staphylococcus</i> spp.	SmaI, CspI, SstII

Tomado y modificado de Goering, 2010.

La restricción por la endonucleasa genera fragmentos de peso molecular elevado que son separados en un gel de agarosa gracias a la aplicación de campos eléctricos cuya direccionalidad cambia a intervalos predeterminados mediante el empleo del sistema CHEF (del inglés *C*hange *H*omogeneous *E*lectric *F*ield), este tipo de cámara de electroforesis tiene un campo eléctrico homogéneo en un contorno cerrado de electrodos, donde veinticuatro electrodos están dispuestos en un arreglo hexagonal que se utiliza para la generación de campos eléctricos uniformes en ángulos de 120° (Valero-Leal, 2012). Esto causa que el ADN se mueva en el gel de un lado al otro permitiendo así la migración de estos fragmentos (Figura 8) (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013). Como resultado se obtiene un patrón de bandas característico para cada aislado (Schreckinger, 2008; Vilchez y Alonso, 2009).

La calidad y resolución de los patrones de bandas son afectadas por la cantidad de ADN y las condiciones experimentales seleccionadas. La resolución del patrón de bandas depende del tiempo de pulsos (Switch inicial y final) que determina el

intervalo de los tamaños que se pueden separar; además la calidad puede ser modificada por el tiempo de corrida, la temperatura experimental, la intensidad del campo eléctrico, la concentración de agarosa y la composición del tampón de electroforesis (Valero-Leal, 2012).

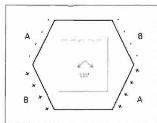


Figura 3. Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE. Flechas cortas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes. Símbolos A+ y A-, B+ y B- indican posiciones de los pares de electrodos de los campos eléctricos alternantes (Tomado y modificado de Cardozo-Bernal et al., 2013).

En 1995, Tenover y colaboradores propusieron un criterio que permite interpretar el electrocariotipo de diversas cepas de manera tal, que se pudieran establecer las relaciones genéticas y epidemiológicas entre dichos microorganismos. Según este sistema se puede clasificar a los aislados bacterianos en cuatro categorías: (Tenover et al., 1995; Cardozo-Bernal et al., 2013).

- i. **Cepas indistinguibles:** Los aislamientos se designan genéticamente indistinguibles si sus patrones de restricción tienen los mismos números de bandas y las bandas correspondientes son aparentemente del mismo tamaño.
- ii. **Cepas estrechamente relacionadas:** Un aislado se considera que está estrechamente relacionado con la cepa del brote, si su patrón de PFGE difiere del patrón brote por cambios consistentes con un único suceso genético, es decir, una mutación puntual o una inserción o deletión de ADN. Estos cambios resultan típicamente en dos o tres bandas de diferencia.

- iii. **Cepas posiblemente relacionadas:** Un aislado es considerado como posiblemente relacionado con la cepa del brote, si su patrón PFGE difiere del patrón brote por cambios consistentes con dos eventos genéticos independientes, es decir, diferencias de cuatro a seis bandas que pueden explicarse por simples inserciones o deleciones de ADN o la ganancia o pérdida de sitios de restricción.
- iv. **Cepas no relacionadas:** Su patrón de PFGE difiere del patrón brote por cambios consistentes con tres o más eventos genéticos independientes, generalmente siete o más bandas de diferencia.

Mediante el análisis de los patrones de PFGE de manera visual (Tenover *et al.*, 1995) o se utiliza un software como BioNumerics y base de datos de huellas dactilares Software Diversity (Goering, 2010), se han podido determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos. Esto permite inferir si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva (Nascentes *et al.*, 2012; Cardozo-Bernal *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

El río Mololoa ubicado en el estado de Nayarit es el principal afluente del río Santiago (CNA, 1994). A lo largo de su trayectoria por el estado, recibe descargas de diferentes poblados tales como La Labor y San Cayetano. Sin embargo, la descarga de aguas residuales que más lo afecta es la proveniente de la ciudad de Tepic, lo que ha provocado cambios significativos en la calidad del agua (Jáuregui *et al.*, 2007). Además, los diversos lixiviados procedentes del relleno sanitario "El Ixtete" provocan una importante contaminación sobre el caudal (Mondragón *et al.*, 2011).

Esta situación deriva en una constante presión de selección en el medio, lo cual favorece la permanencia de los microorganismos que presentan características genéticas de resistencia a metales pesados y antibióticos, que, como se ha mencionado, se encuentran genéticamente ligadas o coexisten dentro de los integrones (Alonso *et al.*, 2001; Alencía *et al.*, 2005). Es decir, esta zona se puede visualizar como un modelo natural de estudio que permite conocer las diferentes presiones de selección y perpetuación de características de resistencia.

En el laboratorio de Resistencia Bacteriana de la UACQByF de la UAN, se han trabajado muestras de agua provenientes del río Mololoa y se han identificado en ellas la presencia de bacterias de importancia médica y veterinaria como *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras especies (Mondragón *et al.*, 2011).

En el 2013, Gutiérrez-Meza reportó la presencia de los genes de virulencia *asa1* y *ge1* en 15 cepas aisladas de 3 sitios distintos en la periferia del río Mololoa. Asimismo, ha sido posible identificar en estos aislados resistencia a metales pesados como el mercurio, arsénico, cromo y cadmio, y se ha comprobado que existe capacidad de transferencia de información por conjugación (Mondragón *et al.*, 2012). Por lo anterior, se representa un riesgo potencial de diseminación y perpetuación de las características fenotípicas y genotípicas mencionadas.

La presencia de genes detoxificadores de arsénico (*arsA*, *arsB* y *arsC*) en bacterias nativas arsenato-reductoras, permite hipotetizar sobre la permanencia de esta característica genotípica como un mecanismo de resistencia en el ambiente microbiano que posteriormente podría ser considerado en la detoxificación del arsénico mediante procesos de biorremediación. Además la confirmación de una posible relación clonal entre estos aislados nos permitiría determinar el número de clones circulantes, la ruta y el patrón de distribución en el ambiente. Estos resultados permitirían la implementación de nuevos programas que contribuyan al control y prevención de un posible brote de infección provocado por bacterias patógenas resistentes a arsénico.

3. HIPÓTESIS

Las proteobacterias resistentes a arsénico provenientes del río Mololoa presentan relación clonal.

4. OBJETIVO GENERAL

Genotipificación de proteobacterias resistentes a arsénico provenientes del río Mololoa.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de arsenato y arsenito en la colección de proteobacterias.
- Identificar la presencia de los genes del operón *ars* (*arsA*, *arsB* y *arsC*).
- Establecer las huellas digitales de los cromosomas de proteobacterias mediante perfiles cromosómicos producidos por electroforesis de campos pulsados (PFGE).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio, se trabajó con 45 cepas de proteobacterias con un perfil de resistencia inicial de 20 mM para arsenato. Estos aislados fueron obtenidos en investigaciones previas realizadas en el laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit. Las cepas de estudio pertenecen a una colección de 300 aislados obtenidos en tres puntos distintos en la periferia del río Mololoa. El sitio 1 correspondiente a los lixiviados de residuos sólidos municipales (Lx) localizados a 21°33'05.33" latitud norte y 104°53'30.65" de latitud oeste, el sitio 2 (R) a 21°32'47.13" de latitud norte y 104°53'36.35" de latitud oeste, correspondiente a un riachuelo que escurre en la ladera del basurero, el sitio 3 (AN) a 21° 32'48.23" de latitud norte y 104°53'43.04" de latitud oeste, el cual corresponde a las aguas negras que se descargan directamente sobre el río, como se observa en la figura 9 .



Figura 9. Localización de los tres sitio de muestreo. Lx= Lixiviado de residuos sólidos municipales; AN= Aguas negras; R= Riachuelo; PTAR= Planta de tratamiento de aguas residuales (Tomado y modificado de Quintero-Casasola, 2014).

Genotipificación de Proteobacterias Resistentes a Arsénico
Materiales y Métodos

En estudios previos se reportó la identificación realizada por el sistema automatizado de MicroScan® (Tabla 3) y los perfiles de resistencia antimicrobiana de los 45 aislados (Mondragón et al., 2011).

Tabla 3. Características de los diferentes aislados obtenidos en la zona contaminada del río Mololoa

No. de cepa	Especie	L ^a	No. de cepa	Especie	L ^a
Kleb-1	<i>Klebsiella</i> spp.	R	En-4	<i>Enterobacter</i> sp.	Lx
Kleb-2	<i>Klebsiella</i> spp.	Lx	En-5	<i>Enterobacter</i> sp.	Lx
Kleb-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	En-6	<i>Enterobacter</i> sp.	R
Kleb-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	En-7	<i>Enterobacter</i> sp.	R
Kleb-5	<i>Klebsiella</i> spp.	R	En-8	<i>Enterobacter</i> sp.	R
Kleb-6	<i>Klebsiella</i> spp.	R	Ac-1	<i>Achromobacter</i> sp.	AN
Kleb-7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AN	Ac-2	<i>Achromobacter</i> sp.	AN
Kleb-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	Ac-3	<i>Achromobacter</i> sp.	AN
Kleb-9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	Ac-4	<i>Achromobacter</i> sp.	AN
Kleb-10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lx	Ac-5	<i>Achromobacter</i> sp.	R
Kleb-11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AN	Ac-6	<i>Achromobacter</i> sp.	Lx
Kleb-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lx	Ac-7	<i>Achromobacter</i> sp.	Lx
Kleb-13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lx	Ac-8	<i>Achromobacter</i> sp.	Lx
Es-1	<i>Escherichia</i> sp.	AN	Ac-9	<i>Achromobacter</i> sp.	AN
Es-2	<i>Escherichia</i> sp.	R	Ac-10	<i>Achromobacter</i> sp.	Lx
Es-3	<i>Escherichia</i> sp.	Lx	Cf-1	<i>Citrobacter</i> sp.	Lx
Es-4	<i>Escherichia</i> sp.	Lx	Cf-2	<i>Citrobacter</i> sp.	Lx
Es-5	<i>Escherichia</i> sp.	Lx	Ye-1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lx
Es-6	<i>Escherichia</i> sp.	Lx	Ye-2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lx
Es-7	<i>Escherichia</i> sp.	Lx	Kc-1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Lx
En-1	<i>Enterobacter</i> sp.	R	Yr-1	<i>Yokenella regenburgeri</i>	Lx
En-2	<i>Enterobacter</i> sp.	R	Ps-1	<i>Pseudomonas</i> sp.	R
En-3	<i>Enterobacter</i> sp.	R			

L^a= Lugar de aislamiento, R= Riachuelo, AN= Aguas Negras, Lx= Lixiviado de residuos sólidos municipales.

5.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para determinar la CMI se utilizaron las sales de arsénico de Na₂HAsO₄ para AsV

en las concentraciones 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600 mM y NaAsO₂ para AsIII y 3, 5, 7, 12, y 15 mM, todas en agar bacteriológico; además se incluyó una placa control sin arsénico. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó a partir de la mayor concentración del agente selectivo en la cual se inhibió el crecimiento (Mondrajon *et al.*, 2011). Como control de sensibilidad se usó la cepa de *E. coli* J-53 (Pro^r, Met^r y Rif^r, AsIII^r, AsV^r, Sb^r) donada por laboratorio de Resistencia Bacteriana del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

5.3 Obtención del ADN genómico

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología modificada de choque térmico planteada en el manual titulado "Shorts Protocols in Molecular Biology" (Sambrook *et al.*, 1989). Un tubo eppendorf con 100 µL de agua destilada estéril se inoculó con una asada de la cepa problema, posteriormente se llevó a temperatura de ebullición durante 10 min. Al terminó de este lapso se sometió el tubo con la muestra a -20 °C durante 10 min; se repitieron los dos últimos pasos y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min. Por último se realizó una dilución 10⁻¹ del sobrenadante y se guardó a -4 °C.

5.4 Identificación de los genes *ars*

Se identificó la presencia de los genes *arsABC* por la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), se utilizaron los oligonucleótidos específicos descritos en la tabla 3 (Saltikov y Olson, 2002).

Para la amplificación de los genes *ars* (ABC) se utilizó por mezcla de reacción un volumen total de 25 µL. Se empleó 2 µL de ADN molde, buffer 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8.3)] (Invitrogen®), 200 µM desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (Invitrogen®), 2 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 25 pmol/µL de cada oligonucleótido (Invitrogen®), (Tabla 4) y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen®). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % a 90 V por 80 min, se verificó el tamaño del

ADN amplificado con el marcador de tamaño molecular 1 kb ADN Ladder (Gene Craft) (Saltikov y Olson, 2002).

Tabla 4. Condiciones para realizar la identificación de los determinantes genéticos *arsA*, *arsB* y *arsC* por la técnica de PCR

Gen	Oligos	Secuencia de oligonucleótidos (5' - 3')	Condiciones	Tamaño pb
<i>arsA</i>	<i>arsA-F</i>	TCTTGGATTGTCGGCTCTTG	94°C/5 min 94°C/30 seg 58°C/30 seg 72°C/30 seg 72°C/7min Durante 32 ciclos	189
	<i>arsA-R</i>	ATCTGTCAAGTAATCCGGTAA		
<i>arsB</i>	<i>arsB-F</i>	CGGTGGTGTGGAATATTGTC	94°C/5 min 94°C/30 seg 59°C/30 seg 72°C/30 seg 72°C/7 min Durante 36 ciclos	219
	<i>arsB-R</i>	GTCAGAATAAGAGCCGCACC		
<i>arsC</i>	<i>arsC-F</i>	GTAATACGCTGGAGATGATCCG	94°C/5 min 94°C/30 seg 59°C/30 seg 72°C/30 seg 72°C/7 min Durante 35 ciclos	370
	<i>arsC-R</i>	GTAATACGCTGGAGATGATCCG		

Seg= Segundos, min= Minutos; pb= Pares de bases.

5.5 Aislamiento de plásmidos

Con la finalidad de conocer la presencia de plásmidos en nuestras cepas se realizó la extracción del ADN plasmídico por el método de lisis alcalina descrito por Kieser (Kieser, 1984). Las cepas se sembraron en 3 mL caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron (Incubadora con agitación Environ 0303-1828) a 37 °C con agitación durante toda la noche. Los cultivos se centrifugaron (Centrifuga marca Eppendorf 5452XJ043219) a 3,500 rpm durante 4 min, el sedimento se resuspendió en 400 µL de solución I (Sacarosa 0.3 M, EDTA 25 mM, Tris 25 mM pH 8.0), se mezcló con ayuda del vortex (Gene 2 400624). Se adicionaron 100 µL de lisozima (10 mg/mL), se incubó en hielo 30 min. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de la

solución II (NaOH 0.3 M, SDS al 1 %), se homogeneizó y se incubó en Termobloque (Labnet) a 55 °C durante 30 min. El ADN se extrajo con 80 µL de fenol-cloroformo, se centrifugó durante 20 min a 4 °C. El patrón plasmídico se corrió en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio en una cámara de electroforesis (Thermo Scientific 240616) a 90 V por 3 horas, el gel se observó bajo luz ultravioleta (Trasluminador BENCHTOP UV 011810-001). Como marcadores de peso molecular se utilizaron los siguientes plásmidos R6K (40 kb), RP4 (54 kb), RI (94 kb) y la SHV-4 (275 kb) donados por laboratorio de Resistencia Bacteriana del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

5.6 Electroforesis por campos Pulsados (PFGE)

Para la determinación del patrón de restricción mediante PFGE, se utilizó el método descrito en PulseNet (www.pulsenetinternational.org), de acuerdo al protocolo que se describe en los siguientes párrafos.

5.6.1 Formación de bloques de agarosa para PFGE

Se inoculó una asada del cultivo seleccionado en un tubo con 4 mL de caldo Luria-Bertani y se incubó de 14-18 horas a 37 °C con agitación de 150 rpm. Después del tiempo de incubación se centrifugó toda la muestra a 13 000 rpm por 2 min en tubos eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetados con el número de cepa. Se recuperó el precipitado y se procedió a resuspender con 500 µL de buffer de suspensión celular (CSB) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) para efectuar los lavados. Una vez homogeneizada la muestra, se centrifugó el tubo eppendorf a 1300 rpm por 2 min, se tiró la solución y se usó nuevamente el pellet bacteriano. Este lavado se realizó 3 veces. Se resuspendió el precipitado en 200 µL de Buffer CSB frío. Se determinó la absorbancia DO_{620nm} de cada uno de los cultivos de la siguiente forma:

- a. Se colocó en celdas de plástico 1 mL de buffer CSB y 5 µL de cada cultivo bacteriano.

- b. Posteriormente en una placa para ELISA, se colocó en cada pozo 200 μ L de la preparación de la celda de plástico; se dejó el primer pozo solo con el buffer CSB como blanco.
- c. La lectura óptica se realizó de manera automatizada mediante el programa Magellan 4.

Una vez obtenida la lectura se hace un ajuste para que la densidad óptica (DO) final sea de 0.5, por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen en } \mu\text{L de buffer CSB frío} = \text{Lectura DO} \times 40 \times 210 - 210$$

Se agregó el volumen calculado a cada tubo eppendorf para tener el ajuste final de 0.5 DO_{620nm}. Se realizó un nuevo ajuste de DO_{620nm} de 1.45, para lo cual en un tubo eppendorf se agregaron 105 μ L de la suspensión de 0.5 DO_{620nm} y 195 μ L del buffer CSB frío. Posteriormente se agregaron 15 μ L de Proteínasa K (20 mg/mL) (Macherey-Nagel) y se incubó a 50 °C en baño maría. Durante esta incubación se colocó cinta transparente por abajo a los moldes para los bloques de agarosa y se etiquetaron para cada cepa bacteriana. Posteriormente, se colocaron sobre un vidrio y fueron irradiados con luz UV por 2 minutos. Se agregaron 300 μ L de la suspensión 1.45 DO_{620nm} a los tubos eppendorf y 300 μ L de agarosa SeaKem Gold (Lonza) con 1 % de SDS a 50 °C. Se vertió inmediatamente esta mezcla en los pozos de los bloques de agarosa con ayuda de la micropipeta y se evitó la formación de burbujas a la hora del vaciado. Se prepararon 5 bloques de agarosa por cada mezcla de suspensión bacteriana, se dejó gelificar en refrigeración (4 °C) por 5 minutos.

5.6.2 Lisis celular y desproteinización de los bloques de agarosa

Se vertieron los 5 bloques de agarosa en un tubo Falcon de 50 mL previamente etiquetados con el número de cepa. Para sacar los bloques se retiró la cinta colocada en la parte inferior de los moldes y se empujaron por arriba para ser sacados sin daños. Se agregaron 5 mL de Buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1 % N-Sarcosil) y 25 μ L de Proteínasa K (20 mg/mL), se

incubaron a 50 °C en baño maría durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h de lisis celular, se realizó una segunda desproteínización por lo que nuevamente se adicionó buffer de lisis fresco y se incubó en el baño maría a 50 °C toda la noche.

5.6.3 Lavados de los bloques de agarosa

Se desechó la segunda solución de desproteínización con ayuda de una gasa. Se adicionaron en el tubo Falcon 50 mL de buffer TE a 50 °C y se colocó en el agitador basculante a una velocidad de 5 rpm por una hora. Transcurrida la hora de lavado se vació el buffer TE con ayuda de una gasa y se repitieron los lavados por seis ocasiones más. Se decantó el último lavado y se adicionaron 30 mL de buffer TE, se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta que se colocó la restricción del DNA.

5.6.4 Restricción del DNA bacteriano en los bloques de agarosa con la enzima de restricción *Xba*I

Se etiquetaron tubos eppendorf de 1.5 mL con el número del cultivo; se utilizaron 11 cepas en cada corrida de gel, así como 4 cepas control de *Salmonella braenderup* H9812 (ATCC® BAA-664™). Con ayuda de un asa se removió el bloque de agarosa del tubo Falcon y se colocó en un portaobjeto previamente desinfectado con etanol al 70 %. Se cortó 1/4 del bloque de agarosa con ayuda de un cubre objetos y se colocó en el tubo Eppendorf. Una vez que se tuvieron los bloques de agarosa cortados se preparó una dilución 1:10 del buffer H 10X (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂ 10 mM Dithiothreitol (DTT) y 1M NaCl) (Invitrogen) de acuerdo a la tabla 5.

Tabla 5. Proporción de buffer H en función del número de bloques de agarosa

Reactivo:	µL/ trozo de bloque de agarosa	µL/ 15 bloques de agarosa
Buffer H	10	150
Agua desionizada estéril	90	1350
Volumen final:	100	1500

µL= Microlitro

Se adicionaron 100 μ L de la solución buffer H 1X a cada tubo eppendorf de tal manera que 1/4 del bloque de agarosa quedara cubierto. Posteriormente se incubaron los tubos eppendorf con las 11 cepas problema y los 4 controles de *S. braenderup* H9812 en un baño maria a 37 °C por mínimo 30 min. Después de la incubación, se desechó el buffer y nuevamente se preparó el buffer H en solución 1X con la enzima de restricción *Xba*I (Roche) que reconoce la secuencia (5' T[^]CTAGA3') (Invitrogen) (Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de buffer H y enzima de restricción en función al bloque de agarosa a utilizar

Reactivo	μ L/ trozo de bloque de agarosa	μ L/ 15 bloques de agarosa
Buffer H	10	150
Agua desionizada estéril	87	1305
Enzima <i>Xba</i> I (10 U/ μ L)	3	45
Volumen final:	100	1500

μ L= Microlitro; U= Unidades.

Se agregaron 100 μ L de la solución del buffer H con la enzima a cada tubo Eppendorf, de tal manera que el 1/4 del bloque de agarosa quedara cubierto y se incubó en baño Maria a 37 °C durante 24 h.

5.6.5 Elaboración del gel de agarosa

Se prepararon 100 mL de agarosa SeaKem Gold al 1 % en un frasco con rosca previamente estéril y se colocó en un baño maria a 54 °C para evitar su gelificación. Una vez que se tuvo la agarosa fundida se sacaron los tubos eppendorf del baño maria y se removió el buffer con enzima de restricción de los tubos. Se armó y equilibró el molde para la cámara de electroforesis, posteriormente se colocaron los bloques de agarosa en la punta de cada diente del peine. Los bloques control de *S. braenderup* H9812 se colocaron en los dientes 1, 5, 10 y 15 una vez que se situaron los 15 bloques de agarosa se retiró el sobrante de buffer de restricción con ayuda de un papel filtro. Se colocó el peine en posición vertical sobre el molde de gel y se corroboró que los bloques de agarosa estuvieran en su posición y quedaran pegados a la base del molde. Con

ayuda de una micropipeta se agregó agarosa sobre los bloques de tal forma que se quedaran pegados al peine. Se dejó gelificar por 15 min la agarosa. Posteriormente se agregó cuidadosamente la agarosa restante en el molde del gel y se dejó gelificar por 30 min, se guardó un volumen pequeño de agarosa (1 a 3 mL) para sellar posteriormente los pozos que dejó el peine. Se equilibró la cámara de electroforesis para campos pulsados, se añadió a la cámara de 2,200 mL del buffer TBE 0.5 X, y se colocó el gel en el marco de la cámara para comenzar con la electroforesis.

5.6.6 Condiciones de la electroforesis por PFGE

Para llevar a cabo la electroforesis de campos pulsados se utilizó el equipo CHEF MAPPER (Bio-Rad) con las siguientes condiciones (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de electroforesis de PFGE

Switch inicial	2.16 seg
Switch final	54.17 seg
Tiempo	18 h
Voltaje	6 V
Temperatura	12-14 °C

Seg= Segundos; h= Hora; °C= Grados centígrados.

Una vez transcurridas las 18 h de electroforesis, se tiñó el gel en 200 mL de TE con bromuro de etidio (1 µg/mL) durante 30 minutos, posteriormente se tomó la fotografía con el programa de KODAK y se guardó en formato TIF. Para el análisis de la foto de los geles se utilizó el programa BioNumerics versión 6.0.

6. RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1 Aislamientos ambientales

Se trabajaron 45 aislamientos ambientales de los cuales el 26.7 % provino del sitio Aguas Negras, 46.7 % de lixiviados de residuos sólidos municipales y el 26.7 % de Riachuelo. En cuanto a la clasificación por género, el más frecuente perteneció a *Klebsiella* spp., con un 28.9 % y el menor con un 2.2 % perteneció a los géneros *Pseudomona* sp., *Yokenella* sp., y *Kluyvera* sp., como se muestra en la figura 10.

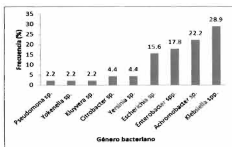


Figura 10. Frecuencia porcentual de aislados ambientales. *Pseudomona* sp., *Yokenella* sp., *Kluyvera* sp., *Citrobacter* sp., *Yersinia* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacter* spp., *Achromobacter* sp., y *Klebsiella* spp.

La elevada frecuencia de aislamiento de *Klebsiella* spp, puede deberse a que es un género bacteriano que está presente de forma natural en ambientes acuáticos. Además, son excretados en las heces de humanos por lo que se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales (Chirolés-Rubalcaba *et al.*, 2007; Echeverri-Toro y Cataño-Correa, 2010). Sin embargo, aunque es un género ubicuo no siempre está presente en ambientes contaminados por arsénico y esto lo podemos observar en lo reportado en 2007 por Rokbani-Achour y colaboradores, quienes trabajaron con 41 aislados ambientales resistentes a arsénico en los cuales no estuvo presente *Klebsiella* pero si el género *Escherichia*. Por otra parte, se ha demostrado que dentro de las especies del género *Klebsiella*,

K. pneumoniae, es de las más frecuentes en ambientes acuáticos (Podschun *et al.*, 2001) y aún son capaces de expresar mecanismos de virulencia tanto como las aisladas de mesocómitos.

A partir de ambientes acuáticos se han aislado algunas clonas de *K. pneumoniae* que contienen plásmidos con genes de resistencia a antibióticos como carbapenémicos, β -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, sulfonamidas, entre otros. Lo anterior es particularmente interesante, ya que la información de resistencia se localizó dentro de un transposón semejante a Tn3 (Zurfluh *et al.*, 2014), lo que podría sugerir la posible presencia de otros determinantes de resistencia, por ejemplo a MP, además de su dispersión por transferencia horizontal. En consecuencia, cabría la posibilidad de que algunas de las clonas con estas características, jugaran un papel de reservorios naturales dinámicos en la transferencia de información, además de putativos candidatos seleccionados por la presión de agentes como antibióticos y metales pesados. Aún más, aislados clonales de *K. pneumoniae* han mostrado su alta capacidad de dispersión y permanencia, ya que ha sido posible identificar la misma clonalidad en cepas de Korea, Italia y Estados Unidos (Lee *et al.*, 2014).

6.2 Concentración mínima inhibitoria de las proteobacterias

La figura 11A, indica la frecuencia porcentual de los distintos géneros bacterianos a la concentración mínima inhibitoria a arsenito, del total de las 45 proteobacterias analizadas. El 8.9 % (4 de 45) fueron sensibles a las concentraciones utilizadas en el ensayo, ya que no existió crecimiento. La CMI para la mayoría de las cepas (46.7 %) fue de 12 mM y solo el 6.7 % presentó una CMI de 15 mM. Estos resultados son muy similares a lo informado por Ordoñez *et al.*, 2005 ya que la CMI de mayor prevalencia para AsIII fue de 12 mM. En comparación Branco *et al.*, 2008, señalan una CMI de 50 mM para AsIII muy superior a lo reportado en este trabajo.

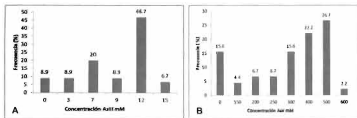


Figura 11. Frecuencia porcentual de los aislados según la concentración mínima inhibitoria. (A) Concentración mínima inhibitoria para arsenito. (B). Concentración mínima inhibitoria para arsenato.

Esta variabilidad en la CMI puede ser debida a la concentración de arsénico presente en el lugar de aislamiento, esto lo podemos observar en lo informado por Liao *et al.*, 2011, quienes trabajaron principalmente con gammaproteobacterias provenientes de un lago en Taiwán que presenta una concentración de arsénico entre 0.3 a 0.78 mg/L, y definen como resistencia a As a las cepas que crecen en presencia de AsIII 2 mM. Además, reportan una CMI de 5 mM, estos valores difieren a lo informado en este trabajo, ya que se reporta como resistente a las cepas que crecen a partir de AsIII 3 mM hasta 15 mM. En el caso de la zona de estudio, Zambrano-Cárdenas y colaboradores (2011) reportaron que la concentración promedio de arsénico en el material terrígeno de la cuenca del río Mololoa fue de 10.8 mg/L, muy superior al contenido promedio de la corteza continental (1.8 mg/L). Esta elevada concentración de arsénico en el medio nos proporciona una posible explicación a las distintas CMI, ya que una concentración elevada del contaminante se podría relacionar con la presencia de un mayor número de genes involucrados en la resistencia al metal (Fernández *et al.*, 2014), en un elevado número de operones presentes en multicopias dentro de un plásmido (Maciaszczyk *et al.*, 2012) o en la presencia de promotores fuertes que permiten una alta expresión del operón (Ordóñez *et al.*, 2005).

Sin embargo, existen evidencias de la presencia de bacterias resistentes a metales pesados, en ausencia del contaminante ambiental (Karbasizadeh *et al.*, 2004). Lo anterior suele ser frecuente en aislados nosocomiales, los cuales conservan los genes de resistencia a diversos metales pesados, ya que suelen encontrarse insertos en transposones o flanqueados por secuencias de inserción, los que además contienen genes de resistencia a antibióticos (García-Fernández *et al.*, 2012). Por otra parte, nuestros aislados, también han mostrado resistencia a otros metales pesados como Cd, Te, Cr, Zn, Co (Segura-Bransford, 2010; Celis-Limón, 2013; Gómez, 2008). No obstante, la presencia de todos estos metales no ha sido determinada en la zona.

En el 2006 Mateos y col., reportaron una elevada resistencia a arsenito (60 mM) y arsenato (400 mM) en la cepa *Corynebacterium glutamicum* debido a la presencia de dos operones *ars*. Por su parte, en 2011 Mellado *et al.*, relacionó la frecuencia de aparición de los genes *arsABC* con distintas concentraciones de arsénico presente en los sedimentos de cuatro diferentes sectores del río Camarones en Chile. Aunque en los cuatro sectores existió resistencia al metaloide y presencia de alguno de los genes *ars*, fue la zona más contaminada con As (1.3 mg/L) la que presentó la CMI más elevada (>100 mM para AsV y >20 mM para AsIII) y presentaron los tres genes del operón *ars* en el 71.4 % (5-7) de las cepas provenientes de este lugar. Lo que indica una posible relación entre la concentración del ambiente con la expresión de los genes *ars* lo que le permite a estas bacterias sobrevivir en dicho ambiente.

En figura 11B, se indica la frecuencia porcentual que presentaron las 45 proteobacterias según la CMI de As^{V} . Se puede observar que solo el 15.6 % (7 de 45) fue sensible a las concentraciones utilizadas en el ensayo. La CMI para la mayoría de las cepas (26.7 %) fue de 500 mM y solo una (2.2 %) perteneciente al género *Klebsiella* spp. presentó una CMI de 600 mM. Estos resultados se asemejan a lo informado por Rokbari-Achour *et al.*, 2010 y Ordoñez *et al.*, 2005, ya que la CMI para As^{V} que determinaron fluctuó entre 400 y 500

mM, a diferencia de lo reportado por Branco *et al.*, 2008, quien manejó una CMI de 200 mM muy inferior a lo obtenido en este trabajo.

De acuerdo a los resultados de Yang *et al.*, 2013, se propone que la alta resistencia a arsenato puede ser debida a la presencia de genes para tres arsenato reductoras (*arsC1*, *arsC2* y *arsC3*) y para tres transportadores transmembranales de arsenito (*arsB1*, *arsB2* y *arsB3*), estos genes fueron encontrados dentro del mismo genoma en una cepa de *Ochrobactrum* (CDB2) aislada de una zona contaminada por arsénico en South Wales, Australia.

Por último, la magnitud de resistencia a MP, es el reflejo de la concentración de los MP presentes en la zona y/o de la presencia de plataformas genéticas como los transposones, que permiten su permanencia dentro de la población. Por lo anterior, la presencia de bacterias resistentes a cierto MP, no es indicativo de la presencia de dicho metal en el ambiente. De igual forma, se debe enfatizar que el riesgo potencial de la dispersión de dichas características debe ser evaluado en cuanto a describir la naturaleza de su contexto genético, esto es: si se encuentran formado parte de plataformas genéticas móviles, con lo cual el riesgo de dispersión y permanencia en las poblaciones bacterianas, se incrementa. De igual forma, se debe considerar que generalmente viajan dentro de estas plataformas genéticas, genes de resistencia a antibióticos. Además, se ha reportado genes de virulencia a nivel plasmídico (Villa *et al.*, 2010; McCarthy y Lindsay, 2012). Lo anterior, tendría serias repercusiones en salud pública debido a que tal plasticidad en los genomas bacterianos por el intercambio genético horizontal facilita la aparición de nuevos patógenos (Rasko *et al.*, 2011).

6.3 Determinación del perfil plasmídico

La extracción plasmídica reveló que el 88.9 % (40 de 45) de los aislados presentaron al menos un plásmido (Tabla 9-13). El tamaño determinado del plásmido más pequeño fue de 49 kb y el de mayor tamaño fue de 513 kb. Sin embargo, se observó la presencia de plásmidos que no fueron reportados en este

trabajo debido a que se presentaron muy por debajo del último marcador de peso molecular (40 kb). Estos plásmidos probablemente estaban en forma superenrollada lo que les permitió avanzar más rápidamente en la electroforesis comparado con el avance que tiene la estructura plasmídica relajada (Ausina y Moreno, 2006).

La presencia de estas estructuras genéticas ha sido reportada tanto en bacterias de origen nosocomial como ambiental, su importancia radica en que pueden ser conjugativos y realizar transferencia horizontal entre las bacterias, lo que promueve la diseminación de un gran número de genes de resistencia que le pueden permitir a los microorganismos sobrevivir en ambientes adversos. La transferencia puede producirse entre células de especies y/o géneros diferentes, y capacita a la célula receptora de funciones que inicialmente no estaban presentes, tales como la resistencia a múltiples antibióticos y a metales pesados (Huang et al., 2012; Atencio et al., 2005).

Existen evidencias de que algunos plásmidos que han sido aislados de *K. pneumoniae* de origen nosocomial, presentan además de genes de resistencia a β -lactámicos, operones y genes de resistencia a metales como mercurio, plata, cromo y arsénico los cuales se han localizado flanqueados por secuencias de inserción (García-Fernández et al., 2012). Entre los plásmidos que han sido citados con relevancia en resistencia antimicrobiana, se encuentra un plásmido de 220 kb con tamaño semejante al que se determinó en la cepa Kleb10 (Tabla 9) (Sandegren et al., 2012). Incluso, ha sido posible determinar la presencia de transposones y similitud en el contexto de los genes transportados a través de estas plataformas genéticas dentro de plásmidos conjugativos en especies como *K. pneumoniae* y *E. coli*. Lo anterior, subraya la importancia de estos elementos extracromosomales como vehículos de dispersión de información pertinente ante la presión selectiva que ejerce el ambiente (Chen et al., 2014).

De igual forma, si bien desconocemos la información genética de los plásmidos que contienen nuestros aislados, sabemos que muchos de ellos presentaron resistencia a diversos antibióticos y al menos dos de estos aislados fueron capaces de transferir la resistencia por conjugación a AsIII y AsV a la cepa sensible de *E. coli* J-53 (Mondragón *et al.*, 2012). La importancia y repercusión potencial de la transferencia horizontal (TH) de la información genética, se puede apreciar de forma preliminar al menos en dos resultados iniciales que se han obtenido en otros aislados de la zona de estudio se determinó la presencia de los genes de virulencia de *Enterococcus faecalis* *asa1*, *gelE* y *esp*, en uno de los aislados de *E. cloacae* (Gutiérrez-Meza, 2013) y se determinó la presencia de genes de virulencia de *E. coli* *papD* y *neuC* en la cepa En-1 (Tabla 12). Lo anterior, abre nuevas interrogantes que apuntan hacia la búsqueda de plataformas genéticas y mecanismos de dispersión que den cuenta de la TH que ocurre de forma dinámica en la zona de estudio. El hecho de que nuestros aislados presenten una gran variedad de tamaños plasmídicos, además de los hallazgos mencionados, permiten plantearse la hipótesis inicial presuntiva de que son estos elementos extracromosomales, los vehículos por medio de los cuales la información genética identificada en este estudio, se dispersa entre la microbiota autóctona.

6.4 Identificación de los genes *arsA*, *arsB* y *arsC*

A las 45 proteobacterias (Tabla 3), se les realizaron ensayos de PCR con los oligonucleótidos específicos para los genes *arsA*, *arsB* y *arsC*, para identificar la presencia de los genes del operón *ars*. En la tabla 8 se describe la frecuencia porcentual del operón *ars* que se presentó en cada uno de los nueve géneros analizados en este estudio.

Tabla 8. Frecuencia porcentual del operón *ars* en los géneros ambientales

Gen del operón	Kleb (%)	Es (%)	Ye (%)	Cf (%)	En (%)	Ac (%)	Ps (%)	Yr (%)	Kc (%)
<i>arsA</i>	0	14.3	0	0	0	0	0	0	0
<i>arsB</i>	84.8	71.4	100	100	100	90	0	100	100
<i>arsC</i>	30.8	43	50	100	87.5	50	0	100	100

Ec= *Escherichia* sp, *Kleb*= *Klebsiella*, *En*= *Enterobacter*, *Kc*= *Kluyvera*, *Ac*= *Achromobacter* y *Ye*= *Yersinia enterocolitica*, *Ps*= *Pseudomona* sp; *Kc*= *Kluyvera* sp.

Solo el género *Pseudomona* sp. no presentó ningún gen del operón *ars* y por el contrario en *Escherichia* se encontraron los tres genes *ars*. De acuerdo al resultado obtenido, solo un aislado (2.2 %) de las 45 cepas presentó el gen *arsA* (Figura 12). Se debe señalar que se trata de una *E. coli* que también presentó a *arsB* y *arsC*.

Este resultado es muy similar a lo informado por Sunita-Lakshmi *et al.*, 2012, quienes señalan al genotipo *arsA* en 3 de 44 cepas resistentes a arsénico, probablemente esto sea debido a que la bomba de expulsión ArsB puede obtener la energía mediante un proceso quimiosmótico, por lo cual, no es fundamental la presencia de la ATPasa ArsA (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2006).



Figura 12. Gel de agarosa (1%) utilizado para la separación del producto de PCR del gen *arsA* (189 pb). carril 1: MP 1 kb DNA Ladder; 2, cepa Ec-1; 3, control (-).

Cabe mencionar que los oligonucleótidos seleccionados incluye una región del gen *arsA* que codifica uno de los tres residuos de cisteína que forman el sitio de unión al AsIII dentro de la proteína ArsA, esta característica los hace idóneos para la identificación de ArsA en las enterobacterias (Sallikov y Olson, 2002).

Para la expresión de ArsB fueron positivos el 86.7 % (39 de 45) de las proteobacterias (Figura 13A). Esta proteína le brinda a dichas bacterias resistencia

a AsIII, ya que le permite expulsarlo del citoplasma celular (Rosen, 2002). En el caso de las cepas resistentes que no presentaron *arsB*, la resistencia a arsenito puede estar confundiéndose por la presencia de la enzima redox arsenito oxidasa que oxida el AsIII a AsV, y que ha sido reportada tanto en bacterias heterótrofas, quimioheterótrofas y quimiolitotróficas (Pacheco-González *et al.*, 2013) o a la presencia de la bomba de expulsión *Acr3* (Rokhani-Achour *et al.*, 2007; Aaltonen y Silow, 2008; Nakajima *et al.*, 2013).

De acuerdo a la secuenciación del genoma de los microorganismos se informó que la proteína transportadora de AsIII denominado *Acr3* se encuentra en miembros del género bacteria, arquea y hongos lo que sugiere que *Acr3* predomina sobre *ArsB*, misma que, se ha encontrado solo en Bacteria y Arquea (Mansour *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2010; Villadango *et al.*, 2012; Maciaszczyk *et al.*, 2012).

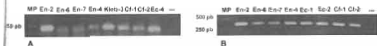


Figura 13. (A) Gel de agarosa (1 %) utilizado para la separación del producto de PCR del gen *arsB* (219 pb). carril 1: MP 1 kb ADN Ladder; 2, cepa En-2; 3, cepa En-6; 4, cepa En-7; 5, cepa Kleb-3; 7, cepa En-4; 8, cepa Cf-1; 9, cepa Cf-2; control (-). **(B)** Gel de agarosa (1%) utilizado para la separación del producto de PCR del gen *arsC* (370 pb). carril 1: MP1 kb ADN Ladder; 2, cepa En-2; 3, cepa En-6; 4, cepa En-7; 5, cepa En-4; 6, cepa Ec-1; 7, cepa Ec-2; 8, cepa Cf-1; 9, cepa Cf-2; control (-).

De las 45 proteobacterias analizadas en este trabajo solamente 23 (51.1 %) (Figura 13B), presentaron *arsC* que codifica para la enzima citoplasmática, arsenato reductasa lo que explica la resistencia arsenato. Sin embargo, el resto de las cepas resistentes puede tener la presencia de alguna de las otras arsenato reductasa reportadas a nivel plasmídico y cromosomal (Kaur *et al.*, 2009; Rosen, 2002; Messens y Silver, 2006; Escudero, 2009; Bachate *et al.*, 2009). La reducción microbiana de arsenato ha sido reportada en numerosos géneros como *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Desulfotribrio*, *Shewanella*, *Enterobacter*, *Thauera*, *Cyanobacterias* y en bacterias reductoras de sulfatos (Campos *et al.*, 2007). Además se ha informado de la existencia de tres familias

de arsenato reductasas en bacterias filogenéticamente diferentes, esto proporciona la posibilidad de que la resistencia a AsV sea mediada por una ArsC que no pertenezca a la familia de las arsenato reductasas dependientes de glutaredoxina (Grx) y glutatión (GSH).

6.5 Genotipificación de las proteobacterias por PFGE

La obtención de las huellas moleculares de los 45 aislados bacterianos para su definición clonal se llevó a cabo mediante la técnica PFGE. Se utilizó la endonucleasa de restricción *Xba*I ya que estudios previos la señalan como la adecuada para la caracterización genotípica de enterobacterias al producir patrones de bandas fácilmente interpretables (Ribot *et al.*, 2006; Badri *et al.*, 2009; Goering, 2010).

Con el objeto de conocer la relación existente entre las cepas estudiadas, los patrones de PFGE, se analizó el número y el tamaño de los fragmentos generados por la restricción enzimática. Lo anterior se realizó de acuerdo a la interpretación propuesta por Tenover y colaboradores (1995), lo que permite discernir entre tipos y subtipos de clonas. De manera que, los aislamientos fueron considerados idénticos si tenían el mismo patrón de bandas. Se asignó a una cepa un genotipo diferente, cuando el patrón de bandas difería del resto en más de tres bandas. Si la diferencia entre el número de bandas era de una a tres se consideró un subtipo (Valero-Leal, 2012).

Posteriormente se realizó un análisis bioinformático mediante el programa BioNumerics versión 6.0 que analiza los patrones de macrorestricción. El primer paso fue calcular el coeficiente de similitud mediante el algoritmo Dice que se basa en la posición de las bandas. Cuando se ha definido la totalidad de bandas presentes, se determina su presencia/ausencia en cada una de las cepas, esta comparación de los patrones de restricción permite establecer la posible relación genética entre los aislamientos (Coll *et al.*, 2005). Posteriormente los elementos de la matriz fueron sometidos a análisis de agrupamientos por la técnica del algoritmo de emparejamiento de bandas sin ponderación con base en promedios aritméticos

(UPGMA, del inglés *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*), que utiliza un agrupamiento secuencial. La identificación y ordenamiento de las relaciones de manera decreciente con respecto a la similitud permitió una variación de 1.5 % en la posición de la banda, lo que generó un dendrograma de los géneros analizados (Figura 14).

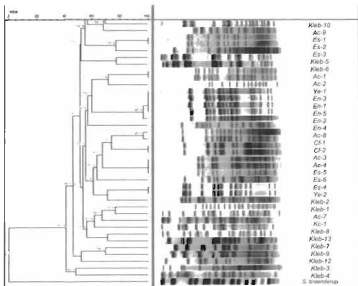


Figura 14. Dendrograma derivado del agrupamiento por UPGMA entre los patrones PFGE de las proteobacterias. *Salmonella* Branderup H9812 fungió como marcador de peso molecular. Es= *Escherichia* sp; Kleb= *Klebsiella*; En= *Enterobacter*; Kc= *Kluyvera*; Ac= *Achromobacter* y Ye= *Yersinia enterocolitica*.

Se observó una gran variabilidad de patrones de restricción debido a que se trabajó con distintos géneros bacterianos. Sin embargo, se observaron diferentes clústers los cuales podrían ser clonales. Para saberlo se agrupó y evaluó de manera independiente cada género (Tabla 9-13).

6.5.1 Análisis de PFGE para el género *Klebsiella* spp.

El análisis de PFGE por BioNumerics versión 6.0 de los patrones de restricción del género *Klebsiella* spp. (n=13) produjo 10 perfiles de restricción de los cuales 3 son grupos de clonas. En la tabla 9 se muestra el perfil de restricción obtenido por PFGE, además de las características fenotípicas y genotípicas de cada cepa.

El primero grupo de clonas está integrado por los aislados *Kleb-1* y *Kleb-2*, presentaron la misma huella genética con un porcentaje de similitud del patrón de bandas del 100 %. Además se observa en la tabla 9 que ambas comparten las mismas características genotípicas y fenotípicas, la única diferencia es que provienen de diferentes lugares de aislamiento, lo que nos indica una posible movilidad en el ambiente. El grupo 2 está integrado por *Kleb-3* y *Kleb-4*, por su parte, el grupo 3 lo integra *Kleb-5* y *Kleb-6*, además de presentar las mismas características genéticas (Tabla 9) se debe señalar que estos grupos presentaron plásmidos con el mismo peso molecular a su respectiva clona.

Independiente a los 3 grupos clonales formados, *Klebsiella* spp. presentaron siete aislados con su propio patrón de restricción. Este resultado lo ubicó como el género con mayor diversidad genética. Esta diversidad puede ser ocasionado por dos hechos genéticos independientes, ya sea inserción/delección de ADN o pérdida/ganancia de lugares de restricción (Valero-Leal, 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos para el peso molecular plasmídico (Tabla 9-13) el género *Klebsiella* spp. fue el que presentó mayor diversidad en el peso molecular de sus plásmidos. Esto nos indica la existencia de plásmido distintos pero del mismo grupo de incompatibilidad (Taylor y Grant 1977; Funnell, 2005).

No obstante que el análisis PFGE, es la técnica por excelencia usada para la determinación de la clonalidad, en la actualidad para una determinación más sensible en casos de brotes clínicos se han propuesto anexar otros estudios como el polimorfismo de un solo nucleótido, plásmidos asociados y MLST (Lee et al., 2014).

6.5.2 Análisis de PFGE para el género *Escherichia* sp.

En el género *Escherichia* se identificaron tres perfiles de restricción, siendo dos de ellos posiblemente clonales (Tabla 10). El perfil 11 está integrado por Es-1, Es-2, ambas cepas presentaron el mismo patrón de bandeo con un coeficiente de similitud del 100 % lo que las clasifica como relacionadas genéticamente como clonas. En este mismo perfil se encuentra Es-3, con una similitud de 76.9 % al perfil 11 por lo que se clasifica como perfil 11A debido a que su patrón de PFGE difiere en dos bandas del patrón del perfil 11. Esta diferencia suele deberse a cambios consistentes con un único suceso genético, es decir, una mutación puntual o una inserción/delección de ADN. Además, se debe señalar que aunque las tres presentaron la presencia de plásmidos, solo Es-1 y Es-3 compartieron un plásmido de 217 kb. Por lo tanto la diferencia en tamaño de los plásmidos presentes en Es-1, Es-2 y Es-3, podría explicar la diferencia en el patrón de bandeo.

El perfil 12 lo integra Es-4, Es-5 y Es-6, presentan el mismo patrón de bandeo (100 % de similitud) lo que las clasifica como cepas indistinguibles, además tienen el gen que codifica para la bomba de expulsión *ArsB*, lo que les permitió compartir la misma CMI ante *AsIII* (Tabla 10). Los dos grupos clonales encontrados en el género *Escherichia* sp., provienen de aislamientos obtenidos de diferentes puntos del sitio de estudio como se muestra en el tabla 10. Este resultado de clonalidad encontrada a partir de sitios diferentes a nivel ambiental ha sido reportada por Tanaro y col., (2013) quienes encontraron clonalidad en *E. coli* obtenidas a partir de diversas fuentes de agua.

6.5.3 Análisis de PFGE para el género *Citrobacter* y *Yersinia* sp.

Los aislados de *Citrobacter* y *Yersinia* están integrados por dos cepas cada uno y de acuerdo al resultado obtenido por PFGE solamente *Citrobacter* fue clonal pues comparten entre ellos huella genómica con un 100 % de similitud y los genes *arsB*

y *ArsC*, lo que les permitió obtener la misma CMI para arsenato/arsenito (Tabla 11).

6.5.4 Análisis de PFGE para el género *Enterobacter* spp.

En el caso del género *Enterobacter* la rápida aparición y diseminación de sus especies productoras de carbapenemasas aunado a la resistencia a arsénico, representa una amenaza considerable para la atención de pacientes hospitalizados y para la salud pública. Por ello, se han realizado diversos estudios con PFGE para determinar la relación genética y su diseminación en el medio (Aschbacher *et al.*, 2011; Mondragón *et al.*, 2011). Debido a la importancia a nivel salud pública de las *Enterobacter* resistentes a los carbapenemicos, Heller y col., (2012) analizaron la relación genética de 33 cepas nosocomiales del género *Enterobacter*, los análisis de PFGE revelaron 3 grupos distintos, el mayor de los cuales contenía 18 aislados. Este hallazgo pone de manifiesto el riesgo de propagación de estos microorganismos y su posible persistencia en el tiempo.

En este trabajo se analizaron por PFGE ocho aislados del género *Enterobacter* spp. Este fue el género con menor diversidad genética ya que se obtuvo como resultado solo 3 perfiles (Tabla 12). El perfil 17 está integrado por los aislados En-1, En-2, En-3, En-4 y En-5. Cabe destacar que En-4 y En-5 provienen de puntos de aislamiento diferentes al de En-1, 2 y 3 además de presentar distintos niveles de CMI. No obstante todo el perfil 17 fue positivo para *arsB* y *arsC* además de obtener un 100 % de similitud de acuerdo al dendrograma obtenido (Figura 14). Además, en 2012 Mondragón y colaboradores reportaron que los plásmidos de la cepa En-1 y En-4 fueron conjugativos.

Las cepas del perfil 18 presentan las mismas características tanto genéticas como fenotípicas lo que las coloca como cepas indistinguibles de acuerdo a la clasificación de Tenover y col., (1995). Por su parte el perfil 19 solo lo presentó la cepa En-8.

6.5.5 Análisis de PFGE para el género *Achromobacter* sp.

Se analizó el perfil de restricción de diez aislados de *Achromobacter* sp. Se observó la formación de dos grupos posiblemente clonales. El perfil 20 lo integra Ac-1 y Ac-2, las que presentan la misma huella genética. Sin embargo, Ac-2 no fue positivo para *arsC* a diferencia de Ac-1. Por su parte Ac-3 y Ac-4 forman el perfil 21, este grupo de clones presentan las mismas características genotípicas y fenotípicas frente al arsenito y arsenato (Tabla 13). Con base los resultados de genotipificación y fenotipificación, se puede afirmar que los aislados de género *Achromobacter* se encuentran después del género *Klebsiella* como el grupo con mayor diversidad genética.

Esta diversidad genética podría suponer que es el resultado de cambios genéticos asociados a los dos principales mecanismos: las mutaciones en el ADN codificante y la adquisición de nuevo material genético principalmente plasmídico (Kaur *et al.*, 2009; Avison y Bennett, 2005). Una vez establecido los cambios en el genoma, puede existir la transferencia de material genético entre microorganismos mediante mecanismos de transformación o conjugación (Valencia-Cano, 2009).

Por otra parte, se debe señalar que las cepa Ps-1 y Ac-10 fueron "no tipificables" con la enzima *Xba*I. Esto pudo deberse a la metilación de los sitios de reconocimiento de la enzima. Este problema se ha presentado con otras enzimas, por ejemplo, *Sma*I es normalmente la endonucleasa de elección para el análisis de *Staphylococcus aureus* por PFGE. Sin embargo, Fanoy y colaboradores reportaron aislamientos de *S. aureus* "no tipificables" por PFGE debido a la inactivación de *Sma*I por la metilación de su sitio de restricción (Bens *et al.*, 2006; Fanoy *et al.*, 2009; Goering, 2010).

Finalmente, debe recordarse que la técnica de PFGE no detecta cambios puntuales en genes ni permiten la observación detallada de ciertos elementos genéticos como los plásmidos y transposones capaces de transmitirse entre microorganismos de la misma o de distinta especie (Coll *et al.*, 2005). Probablemente, la diversidad genética se encuentre subestimada, lo que

cambiaría posiblemente la proporción de representantes de cada género en los diferentes grupos

En concreto, los resultados obtenidos por PFGE, muestran que en la zona de estudio convergen las clonas que circulan en la región, ya que como se demuestra en las tablas 9, 10 y 11, se determinó la presencia de la misma clonalidad en los aislados, no obstante que los orígenes de ellas fueron diferentes. Resumiendo, los aislados del perfil P1 con las cepas Kieb-1, Kieb- 2 (Tabla 9), fueron obtenidos de R y Lx, los del P11 con las cepas Es-1, Es-2, se obtuvieron de AN y R (Tabla 10) y por último, los aislados del P17, con las cepas En1 a En-5, fueron obtenidas de R y Lx (Tabla 12). Por ende, lo anterior pone de manifiesto que al menos estas clonas se encuentran circulando en el municipio de Tepic y en residuos municipales, coincidiendo su trayecto en la zona de estudio. Estos datos enfatizan la importancia de la toma de medidas preventivas por parte del sector salud, ya que como se mencionó, los aislados además de presentar relevancia en virulencia, han demostrado resistencia a antibióticos (Mondragón *et al.*, 2011; Mondragón *et al.*, 2012). La búsqueda de microorganismos con características indicativas de riesgo en salud, además de su función como indicadores de contaminación por MP, queda de manifiesto. Por lo anterior, será necesario continuar con los estudios para seleccionar alguna clona como putativa indicadora de la presencia de MP en el ambiente, el uso biotecnológico de alguno de sus productos como la proteína ArsB, en biorremediación, así como la potencialidad de la TH y por último la capacidad de dispersión del foco infeccioso en las zonas de cultivo aledaño, así como su establecimiento en los cultivos camaronícolas y de moluscos en la región donde desemboca el estuero.

Tabla 9. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género *Klebsiella* spp.

Huella genómica producida por PFGE	Perfil (P)	Cepa	Lugar de aislamiento	Operón Ars	CMI AsIII mM	CMI AsV mM	Plásmido kb
	P10	Kleb-13	Lx	arsBC	12	300	185, 109
	P9	Kleb-12	Lx	arsBC	3	200	49, 142
	P8	Kleb-11	AN	arsB	12	300	48, 142
	P7	Kleb-10	Lx	arsB	12	500	413, 242
	P6	Kleb-9	AN	*	15	200	109
	P5	Kleb-8	AN	*	15	600	109
	P4	Kleb-7	AN	arsB	15	200	192
	P3	Kleb-6	R	arsB	12	400	220
	P3	Kleb-5	R	arsB	12	400	220
	P2	Kleb-4	AN	arsBC	12	500	293
	P2	Kleb-3	AN	arsBC	12	500	293
	P1	Kleb-2	Lx	arsB	12	500	231
	P1	Kleb-1	R	arsB	12	500	275

AN= Agua Negrais, Lx= Levivado de residuos sólidos municipales, R= Riachuelo, kb= Kilobases, Kleb= *Klebsiella* spp.

Tabla 10. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género *Escherichia* sp.

Huella genómica producida por PFGE	Perfil (P)	Cepa	Lugar de aislamiento	Operón Ars	CMI AsIII mM	CMI AsV mM	Plásmido kb
	P13	Es-7	Lx	-	<3	<150	185
	P12	Es-6	Lx	arsB	7	400	89
	P12	Es-5	Lx	arsB	7	400	89
	P12	Es-4	Lx	arsB	7	400	218, 115
	P11-A	Es-3	Lx	arsC	<3	250	57, 217
	P11	Es-2	R	arsBC	12	500	115
	P11	Es-1	AN	arsABC	12	500	217

AN= Aguas Negras; Lx= Lixiviado de residuos sólidos municipales; R= Riachuelo; kb= kilobases; mM= milMolar; Es: *Escherichia* sp.

Tabla 11. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género *Yersinia* sp. y *Citrobacter* sp.

Huella genómica producida por PFGE	Perfil (P)	Cepa	Lugar de aislamiento	Operón Ars	CMI AsIII mM	CMI AsV mM	Plásmido kb
	P16	Cf-2	Lx	arsBC	7	<150	142
	P16	Cf-1	Lx	arsBC	7	<150	142
	P15	Ye-2	Lx	arsB	3	<150	316, 109
	P14	Ye-1	Lx	arsBC	7	<150	-

Lx= Lixiviado de residuos sólidos municipales; kb= Kilobase; mM= milMolar; Ye: *Yersinia enterocolitica*

Tabla 12. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género *Enterobacter* spp.

Huella genómica producida por PFGE	Perfil (P)	Cepa	Lugar de aislamiento	Operón Ars	CMI Asill mM	CMI AsV mM	Plásmido kb
	P19	En-8	R	arsB	7	300	-
	P18	En-7	R	arsBC	12	250	115
	P18	En-6	R	arsBC	12	250	115
	P17	En-5	Lx	arsBC	12	300	152
	P17	En-4	Lx	arsBC	12	400	152
	P17	En-3	R	arsBC	12	400	152
	P17	En-2	R	arsBC	12	400	152
	P17	En-1	R	arsBC	12	400	152

Lx= Lavado de residuos sólidos municipales, R= Rachocho, kb= Kilobases, mM= milimolar, En= *Enterobacter* spp.

Tabla 13. Características fenotípicas y genotípicas de los aislados del género *Achromobacter* sp.

Huella genómica producida por PFGE	Perfil (P)	Cepa	Lugar de aislamiento	Operón Ars	CMI Asill mM	CMI AsV mM	Plásmido kb
	P26	Ac-9	AN	-	3	300	-
	P25	Ac-8	Lx	arsB	9	300	142
	P24	Ac-7	Lx	arsBC	9	<150	537, 242
	P23	Ac-6	Lx	arsBC	7	400	413
	P22	Ac-5	R	arsBC	9	500	89
	P21	Ac-4	AN	arsB	12	500	163
	P21	Ac-3	AN	arsB	12	500	168
	P20	Ac-2	AN	arsB	3	300	159
	P20	Ac-1	AN	arsBC	3	300	159

AN= Aguas Negras, Lx= Lavado de residuos sólidos municipales, R= Rachocho, kb= Kilobases, mM= milimolar, Ac= *Achromobacter* sp.

7. CONCLUSIONES

1. Las proteobacterias presentan una CMI de hasta 600 mM para AsV y 15 mM para As III. La mayor sensibilidad (15.6 %) se reportó para la forma inorgánica AsV.
2. El 2.22 % del total de las cepas presentaron los tres genes *arsABC*
3. El gen *arsB* fue el que se presentó en mayor porcentaje (86.7 %) dentro de las proteobacterias.
4. Se obtuvieron 28 perfiles en PFGE y existió clonalidad en los diversos géneros analizados excepto *Yersinia* sp.
5. El género *Klebsiella* presentó mayor variabilidad genética, por el contrario *Enterobacter* fue el que presentó menor diversidad en sus patrones de restricción.
6. En la zona del río Mololoa convergen cepas de *Klebsiella* spp. *E. coli* y *Enterobacter* spp, que comparten clonalidad intraespecífica.
7. Los aislados que comparten idéntica clonalidad se encuentran circulando en la ciudad de Tepic, en los lixiviados del basurero municipal y convergen en la zona del río Mololoa.
8. La zona de estudio representa un riesgo a la salud pública.

8. PERSPECTIVAS

1. Realizar la caracterización a nivel proteína del aislado Ec-1, debido a que fue el único que presentó el genotipo *arsABC*, lo que la ubica como el mejor prospecto para en un futuro utilizar sus enzimas en un proceso de biorremediación del área contaminada.

9. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Aaltonen, E.K., Silow, M. 2008. Transmembrane topology of the Acr3 family arsenite transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochimica Biophysica Acta*. 1778:963-973.
- Acosta, I., Moctezuma-Zarate, M.G., Cárdenas, J.F., Gutiérrez, C. 2007. Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomasa fúngica. *Información Tecnológica*. 18:9-14.
- Aguadero, A.V. Tipificación molecular y estudio de clonalidad de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, productores de infecciones intrahospitalarias y extrahospitalarias en extremadura (tesis doctoral). España: Universidad de Extremadura, 2014.
- Alonso, A., Sanchez, P., Martínez, J.L. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*. 3:1-9.
- Anderson, G., Williams, J., Hille, R. 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*. 267:23674-23682.
- Anisimova, L., Siunova, T., Boronin, A. 1993. Resistance to metals gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology*. 62(5):505-508.
- Aschbacher, R., Pagani, L., Doumith, M., Pike, R., Woodford, N., Spoladore, G., Larcher, C., Livermore, D.M. 2011. Metallo- β -lactamases among *Enterobacteriaceae* from routine samples in an Italian tertiary-care hospital and long-term care facilities during 2008. *Clinical Microbiology and Infection*. 17:181-189.
- Atencio, B.L., Álvarez, G.M., Guñez, O.J., Montie, X., Salas, B.M. 2005. *Staphylococcus aureus*: sensibilidad a antibióticos, metales pesados y patrón plasmídico. *Ciencia*. 13:5-13.
- Ausina, R.V., Moreno, G.S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Editorial Medica Panamericana, 2006.
- Avison, M.B., Bennett, P.M. 2005. Bacterial genetics. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (eds), Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections 10th edn: Vol. 1, Bacteriology, Hodder Arnold: London. 80-135.

- 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*. 107:145-156
- Badr, N., Al-Qahtani, K.M. 2013. Treatment of wastewater containing arsenic using *Rhazya stricta* as a new adsorbent. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185(12):9669-9681.
- Badri, S., Fassouane, A., Filliol, I., Hassar M., Cohen, N. 2009. Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from food by pulsed-field gel electrophoresis. *Internet Journal of Food Safety*.11:44-49.
- Berg, M., Stengel, C., Trang, P. T. K., Hung Viet, P., Sampson, M. L., Leng, M., Samreth, S., Fredericks, D. 2007. Magnitude of arsenic pollution in the Mekong and Red River Deltas—Cambodia and Vietnam. *Science of the Total Environment*. 372(2):413-425.
- Branco, R., Francisco, R., Chung, A.P., Vasconcelos, P. 2009. Identification of an *aox* system that requires cytochrome *c* in the highly arsenic-resistant bacterium *Ochrobactrum tritici* SCII24. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(15):5141-5147.
- Branco, R., Chung, A.P., Morais, P.V. 2008. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24^T. *BioMed Central Microbiology*. 8:95.
- Battaglia, B.F., Dictor, M.C., Garrido, F., Crouzet, C., Morin, D., Dekeyser K, Clarens, M., Baranger, P. 2002. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *Journal of Applied Microbiology*. 93:656-667.
- Bens, C.C., Voss, A., Klaassen, C.H. 2006. Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:1875-1876.
- Buchet, J.P., Lison, D. 2000. Clues and uncertainties in the risk assessment of arsenic in the drinking water. *Food and Chemical Toxicology*. 38:81-85.

Butcher, B.G., Rawlings, D.E. 2002. The divergent chromosomal ars operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology*. 148:3983-3992.

Cai, L., Liu, G., Rensing, C., Wang, G. 2009. Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic contaminated soils. *BioMed Central Microbiology*. 9:4.

Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., Mondaca, M.A. 2007. Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la Quebrada camarones, región Pannacota, Chile. *Gayana*. 71(2):150-155.

Castillo-Rodríguez, F. *Biología Ambiental*. Madrid: Editorial Tebar, 2005.

Carabantes, A.G., Femicola, N.A.G.G. de. 2003. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*. 39(4):365-372.

Cardozo-Bernal, A.M., Ramón, L.F., Poutou-Piñales, R.A., Carrascal-Camacho, A.K., Corina, Z.D. 2013. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *University of Science*. 18(2):203-222.

Celis-Limón, C.A. Evaluación de perfiles de resistencia a antimonio y Cadmio, y aislamiento de plásmidos de bacterias aisladas del río Mololoa en Tepic (tesis de licenciatura). Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit, 2013.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A.E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I.L., Rivera-Cano, M.E., et al. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2):203-210.

Chang, J.S., Yoon, I.H., Lee, J.H., Kim, K.R., An, J., Kim, K.W. 2010. Arsenic detoxification potential of aox genes in arsenite-oxidizing bacteria isolated from natural and constructed wetlands in the Republic of Korea. *Environmental Geochemistry and Health*. 32(2):95-105.

Chen, Y., Rosen, B.P. 1997. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. *Journal of Biological Chemistry*. 272:14257-14262.



- Chen, C.J., Wu, T.L., Lu, P.L., Chen, Y.T., Fung, C.P., Chuang, Y.C., Lin, J.C., Siu, L.K. 2014. Closely Related NDM-1-Encoding Plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One*, 9(8):e104899.
- Chiroles-Rubalcaba, S., González-González, M.I., Torres, R.T., Valdez, A.M., Domínguez, M.I. 2007. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*. 7:222-227.
- Coll, P., Coque, M.T., Domínguez, M.A., Vázquez, J., Vila, J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: métodos moleculares de tipificación epidemiológica en Bacteriología, 2005.
- Croal, L.R., Galnick, J.A., Malasam, D., Newman, D.K. 2004. The genetics of geochemistry. *Annual Review of Genetics*. 38:175-202.
- Cuevas, M., Villafane, A., McBride, M., Yee, N., Bini, E. 2011. Arsenate reduction and expression of multiple chromosomal *ars* operons in *Geobacillus kaustophilus* A1. *Microbiology*. 157:2004-2011.
- DeMel, S., Shi, J., Martin, P., Rosen, B.P., Edwards, B.F.P. 2004. Arginine 60 in the ArsC arsenate reductase of *E. coli* plasmid R773 determines the chemical nature of the bound As(III) product. *Protein Science*. 13:2330-2340.
- Diono, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., Dubow, S.M. 1995. An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved. *Journal of Bacteriology*. 177(8):2050-2056.
- Echeverri-Toro, L.M., Cataño-Correa, J.C. 2010. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia* 23(3): 240-249.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R., Kuhn, P. 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.
- Escudero, G.L. Estudio de los genes implicados en el metabolismo del arsénico en cultivos y en sistemas naturales (tesis doctoral). Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, 2009.
- Eppinger, M., Radnedge, L., Andersen, G., Vietn, N., Severson, G., Mou, S., Ravel, J., Worsham, P.L. 2012. Novel plasmids and resistance phenotypes

- in *Yersinia pestis*: unique plasmid inventory of strain java 9 mediates high levels of arsenic resistance. *Plos One*. 7(3):911.
- Fernández, M., Udaondo, Z., Niqui, J.L., Duque, E., Ramos, J.L. 2014. Synergic role of the two ars operons in arsenic tolerance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*. doi:10.1111/17582229.12167.
- Fanoy, E., Helmhout, L.C., Van der Vaart, W.L., Weijdemans, K., Santen-Verheuevel, M.G., Thijsen, S.F., de Neeling, A.J., van Wamel, W.J., Manaskova, S.H., Kingma-Thijssen, J.L. 2009. An outbreak of non-typeable MRSA within a residential care facility. *Euro Surveillance*. 14.
- Fu, H.L., Barry, P., Rosen, B., Bhattacharjee, H. 2010. Biochemical characterization of a novel ArsA ATPase complex from *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 584:3089-3094.
- Funnell, B.E. 2005. Partition-mediated plasmid pairing. *Plasmid*. 53:119-125.
- García-Fernández, A., Villa, L., Carta, C., Venditti, C., Giordano, A., Mancini, C., Venditti, M., Carattoli, A. 2012. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(4):2143-2145.
- Gebel, T.W. 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 203:249-252.
- Goering, R.V. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(7):866-875.
- Gómez, H.S. Perfiles de resistencia de *Enterococcus faecalis* a diversos metales pesados (tesis de licenciatura). Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit, 2008.
- Gutiérrez-Meza, J.J. Determinación de los genes de virulencia *asa1*, *gelE*, *hyl* y *esp* en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados del río Mololoa (tesis de licenciatura). Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit, 2013.
- Heller, I., Grift, K., Orth, D. 2012. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing

- Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. *Journal of Medical Microbiology*. 61: 567-571.
- Hille, R. 1996. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chemical Reviews* 96:2757-2816.
- Hoke, K.R., Cobb, N., Armstrong, F.A., Hille, R. 2004. Electrochemical studies of arsenite oxidase: an unusual example of a highly cooperative two-electron molybdenum center. *Biochemistry*. 43:1667-1674.
- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Van, D.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T., Ribot, E. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use for the pulse-field gel electrophoresis protocols: converting the national database to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(3):1045-1050.
- Huang, X.Z., Frye, J.G., Chahine, M.A., Glenn, L.M., Ake, J.A., Su, W. 2012. Characteristics of plasmids in multi-drug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated during prospective surveillance of a newly opened hospital in Iraq. *Plos One*. 7(7): e40360.
- Jáuregui, M.C., Ramírez, H.S., Espinosa, R.M.A., Tovar, R.R., Quintero, H.B., Rodríguez, C.I. 2007. Impacto de la descarga de aguas residuales en la calidad del río Mololón (Nayarit, México) y propuesta de solución. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 3:65-73.
- Johnson, J., Russo, T. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. 295:383-404.
- Karbasizadeh, V., Badami, N., Emthazi, G. 2004. Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2(10):379-383.
- Kashyap, D.R., Botero, L.M., Franck, W.L., Hassett, D.J., McDermott, T.R. 2005. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 188:1081-1088.

- Koechler, S., Cleiss-Arnold, J., Proux, C., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Gouhen-Chollet, F., Hommais, F., Lièvremon, D., Arsène-Ploetze, F., Jean-Yves Coppée J.Y., Bertin N.P. 2010. Multiple controls affect arsenite oxidase gene expression in *Herminiimonas arsenicoxidans*. *BioMed Central Microbiology*. 10(53):1471-1484.
- Kaur, S., Kamli, M. R., Ali, A. 2009. Diversity of Arsenate Reductase Genes (arsC Genes) from Arsenic-Resistant Environmental Isolates of *E. coli*. *Current Microbiology*. 59, 288-294.
- Kotzé, A.A. Analysis of arsenic resistance in the biomining bacterium, *Acidithiobacillus caldus* (tesis de maestría). Stellenbosch: University of Stellenbosch, 2006.
- Lee, Y., Kim, B.S., Chun, J., Yong, J.H., Lee, Y.S., Yoo, J.S., Yong, D., Hong, S.G., D'Souza, R., Thomson KS, Lee, K., Chong, Y. 2014. Clonality and resistome analysis of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in Korea using whole genome sequencing. *BioMed Research International*. 2014:352862. doi: 10.1155/2014/352862.
- Leist, M., Casey, R.J., Caridi, D. 2000. The management of arsenic wastes: problems and prospects. *Journal of Hazardous Materials*. 76:125-138.
- Lett, M.C., Muller, D., Lièvremon, D., Silver, S., Santini, J.M. 2012. Unified nomenclature for genes involved in prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *Journal of Bacteriology*. 194:207-208.
- Liao, V.H.C., Chu, Y.J., Su, Y.C., Hsiao, S.Y., Wei, C.C., Liu, C.W., Liac, C.M., Shen, W.H., Chang, F.J. 2011. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*. 123:20-29.
- Lin, Y.F., Yang, J., Rosen, P.B. 2007a. ArsD residues Cys12, Cys13, and Cys18 form an As(III)-binding site required for arsenic metallochaperone activity. *Journal of Biological Chemistry*. 282:16783-16791.
- Lin, Y.F., Yang, J., Rosen, P.B. 2007b. ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 39:453-458.
- Maciaszczyk, D.E., Wawrzyczna, D., Wysocki, R. 2012. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *International Journal of Molecular Sciences* 13(3):3527-3548.

- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 58:201-235.
- Mansour, N.M., Sawhney, M., Tamang, D.G., Vogl, C., and Saier, M.H.Jr. 2007. The bilearsenite/bioflavin transporter (BART) superfamily. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 274:612-629.
- Martin, P., DeMel, S., Shi, J., Gladysheva, T., Gatti, L.D., Rosen, P.B., Edwards, F.P. 2001. Insights into the structure, solvation, and mechanism of Arsc arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure*. 9:1071-1081.
- McCarthy, A.J., Lindsay, J.A. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BioMed Central Microbiology*. 12(1):104.
- Mateos, L.M., Ordoñez, E., Letek, M., Gil, J.A. 2006. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *International Microbiology*. 9:207-215.
- Mathema, B., Kurepina, N.E., Bifani, P.J., Kreiswirth, B.N. 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(4):658-685.
- Mayorga-Moreno, M.P. Arsénico en aguas subterráneas su transferencia al suelo y a la planta (tesis doctoral). Valladolid: Universidad de Valladolid, 2013.
- Mellado, C., Campos, V., Mondaca, M.A. 2011. Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana*. 75(2):131-137.
- Meng, Y.L., Liu, Z., Rosen, P.B. 2004. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 279:18334-18341.
- Messens, J., Silver, S. 2006. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *Journal of Molecular Biology*. 362:1-17.
- Mondragón, J.V., Llamas-Pérez, D.F., González-Guzmán, G.E., Márquez-González, A.R., Padilla-Noriaga, R., Durán-Avelar, M.D., Franco, B. 2011.

Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa river in Tepic, Nayarit, México. *Environmental Monitoring and Assessment*. 183:329-340

- Mondragón-Jaimes, V.A., García-Calzada, A.Y., López-Gaytán, S.B., Quintero-Castañeda, A., Rodríguez-Aguilar, D.E., Peña-Sandoval, G.R., Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., Lozano-Muñiz, S. 2012. Characterization of arsenic and mercury resistant bacteria from contaminated site in Nayarit, México. In Biotechnology Summit 2012, Mérida, Yucatán, Mexico, 12-21 March 2012. (pp. 15-20). CinVestav.
- Montuelle, B., Latour, X., Volat, B., Gounet, A. 1994. Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53:753-758.
- Moraga, R., Merino, C., Mondaca, M.A. 2003. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marítimas Valparaíso*. 31(1):91-95.
- Morgan, A. Health and ecological criteria division. Exposure and health effects. Office of Water, Office of Science and Technology United States Environmental Protection Agency, Washington DC 2001. Chapter 3.
- Mukhopadhyay, R., Shi, J., Rosen, B.P. 2000. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *Journal of Biological Chemistry*. 275:21149-21157.
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P. 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environmental Health Perspectives*. 110(5): 745-748.
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T., Silver, S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. 26: 311-325.
- Muller, D., Liévreumont, D., Simeonova, D.D., Hubert, J.C., Lett, M.C. 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *Journal of Bacteriology*. 185:135-141.
- Muller, D., Simeonova, D.D., Riegel, P., Manganot, S., Koechler, S., Liévreumont, D., Bertin, P.N., Lett, M.C. 2006. *Herminiimonas arsenicoxydans* sp. nov., a

- metalloresistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1765-1769.
- Nakajima, T., Hayashi, K., Nagatomi, R., Matsubara, K., Moore, J.E., Millar, B.C., Matsuda, M. 2013. Molecular identification of an arsenic four-gene operon in *Campylobacter lari*. *Folia Microbiology*. 58:253-260.
- Nascentes, G.N., Chiarni, E., Destro, M.T., De Aguilar, F.M., Nero, L.A. 2012. PFGE characterization and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science*. 92:635-643.
- Ordoñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J.A., Mateos, L.M. 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10):6206-15.
- Ordoñez, A.E. Mecanismos implicados en la resistencia a arsénico en *Corynebacterium glutamicum* (tesis doctoral). León: Universidad de León, 2009.
- Oremland, R.S., Hoefft, S.E., Santini, J.M., Bano, N., Hollibaugh, R.A., Hollibaugh, J.T. 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4795-4802.
- Páez, E.D., Tamames, J., Lorenzo, V., Cánovas, D. 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*. 22:117-130.
- Pacheco-González, G., Mondragón-Jaimes, V.M., Velázquez-Fernández, J.B. 2013. Oxidación del arsenito regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Revista Bio Ciencias*. 2(3):92-97.
- Paiva, S.L. Estudio de biomonitorización de una población de trabajadores expuestos al arsénico y caracterización de los posibles factores moduladores del daño genotóxico (tesis doctoral). Barcelona: Universidad de Barcelona, 2007.
- Pérez, J.R., DeFraia, C., Young, L.Y. 2005. Arsenate respiratory reductase gene (*arrA*) for *Desulfosporosinus* sp. strain Y5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338:825-829.

- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7):3325-3327.
- Quéménéur, M., Heinrich-Salmeron, A., Muller, D., Liévreumont, D., Jauzein, P., 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*. 74:4567-4573.
- Quintero-Castañeda, A. Identificación y análisis de secuencias del gen *aoxB* en una colección de proteobacterias resistentes a arsénico (tesis de maestría). Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit, 2014.
- Rasko, D.A., Webster, D.R., Sahl, J.W., Bashir, A., Boisen, N., Scheutz, F., Waldor, M.K. 2011. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New England Journal of Medicine*. 365(8):709-717.
- Ribot, M.E., Fair, M.A., Gautam, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:h7, *Salmonella*, and *Shigella* for pulsenet. *Foodborne Pathogens and Disease*. 3:59-67.
- Rokbani-Achour, A., Cordi, A., Poupin, P., Bauda, P., Billard, P. 2010. Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant *Micobacterium* sp. Strain A33. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(3):948-955.
- Rokbani-Achour, A., Bauda, P., Billard, P. 2007. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology*. 158: 128-137.
- Roos, G., Buts, L., Van, B.K., Brosens, E., Geerlings, P., Loris, R., Wyns, L., Messens, J. 2006. Interplay between ion binding and catalysis in the thioredoxin-coupled arsenate reductase family. *Journal of Molecular Biology*. 360:826-838.
- Rosen, P.B. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 529:86-92.

- Rosen, P.B., Bhattacharjee, H., Zhou, T., Walmsley, R.A. 1999. Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1491:207-215.
- Rubinos-Gonzalez, D.A. Utilización de lodos rojos de bauxita en la contención e inactivación de residuos tóxicos y peligrosos (tesis doctoral). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela, 2007.
- Salkov, C.W., Olson, B.H. 2002. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:280-288.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA. 1989.
- Sandegren, L., Linkevicius, M., Lytsy, B., Melhus, Å., Andersson, D.J. 2012. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67:74-83
- Santini, M.J., Vanden, H.R.N. 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolitho- autotrophic arsenite oxidizer NT-2. *Journal of Bacteriology*. 186(6):1614-1619.
- Schreckinger, M.E. Genotipificación de cepas de *Escherichia coli* enteropatógena aisladas en una región rural de la costa ecuatoriana mediante el uso de la electroforesis de campo pulsado (tesis de licenciatura). Quito: Universidad de Quito, 2008.
- Segura-Bransford, C.E. Detección del gen de virulencia *cylA* y determinación de la resistencia a metales pesados y antibióticos en aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (tesis de licenciatura). Nayari: Universidad Autónoma de Nayari, 2010.
- Shen, S., Li, X.F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, C. 2013. Arsenic binding to proteins. *Chemical Reviews*. 113:7769-7792
- Silver, S., Phung, L.T. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial Oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71:599-608.

- Silver, S., Walderharg, M. 1992. Gene regulation of plasmid and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*. 56:195-238.
- Singh, A., Goering, R., Simjeu, S., Foley, S., Zervos, M. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 19:512-530.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. 2002. A Review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*. 17:517-568.
- Song, B., Chyun, E., Jaffe R.P., Ward, B.B. 2009. Molecular methods to detect and monitor dissimilatory arsenate respiring bacteria (DARB) in sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 68:108-117.
- Suárez, P., Reyes, R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. 27(4):160-164.
- Sultana, M., Vogler, S., Zargar, K., Schmidt, A.C., Saltikov, C., Seifert, J., Schlömann, M. 2012. New clusters of arsenite oxidase and unusual bacterial groups in enrichments from arsenic-contaminated soil. *Archives of Microbiology* 194:623-635.
- Sunita-Lakshmi, M.S., Prashant, S., Bramha-Chari, P.V., Rao, S.N., Balaravi, P., Kavi-Kishor, P.B. 2012. Molecular identification of arsenic-resistant estuarine bacteria and characterization of their ars genotype. *Ecotoxicology* 21:202-212.
- Tanaro, J.D., Leotta, G.A., Lound, L.H., Deza, N., Ledn S.E., Carbonari C., Piaggio M.C., Rivas, M. 2013. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de bovinos, agua ambiental y muestras clínicas (Guaqueyachú, entre ríos). *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*. 3(3):1-17.
- Tapio, S., Grosche, B. 2006. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutation Research* 612: 215-246.
- Taylor, D.E., Grant, R.B. 1977. Incompatibility and surface exclusion properties of H1 and H2 plasmids. *Journal of Bacteriology*. 131(1):174-178.
- Tchounwou, P.B., Centeno, J.A., Patiolla, A.K. 2004. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis--a health risk assessment and management approach. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 255:47-55

- Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., S., Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:2233-2239.
- Thorsen, M., Di, Y., Tangemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der, D.C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R., Tamás, M.J. 2006. The MAPK Hog1p modulates Fp51p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 17:4400-4410.
- Torres-Escribano, S. Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico (tesis doctoral). Valencia: Universidad de Valencia, 2011.
- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tull, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J.M. 2007. Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in Biotechnology*. 25:158-165.
- Valero-Leal, J.K. Caracterización, capacidad enterotoxigénica y resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche y queso en tres municipios del estado Zulia (tesis doctoral). Caracas: Universidad Central de Venezuela, 2012.
- Valencia-Cano, P.A. Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales (tesis de licenciatura). Quito: Universidad San Francisco de Quito, 2009.
- Versalovic, J., Lupski, R. 2002. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends in Microbiology*. 10:S15-21.
- Vilchez, G., Alonso, G. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29:6-12.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., Carattoli, A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65(12):2518-2529.
- Villadangos, F.A., Fu, H.L., Gil, A.J., Messens, J., Rosen, P.B., Mateos, M.L. 2012. Efflux Permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* an arsenite-specific antiporter. *The Journal of Biological Chemistry*. 287:723-735.

- Wu, S. Bioinformatics analysis and preliminary functional study of proteins associated with arsenic metabolism and resistance (tesis de maestría). Wollongong: University of Wollongong, 2007.
- Yang, J., Rawal, S., Stemmer, L.T., Rosen, P.B. 2010. Arsenic Binding and Transfer by the ArsD As(III) Metallochaperone. *Biochemistry*. 49(17): 3658-3666.
- Yang, Y., Yu, X., Zhang, R. 2013. Draft genome sequence of *Ochrobactrum pseudogrignonense* strain CDB2, a highly efficient arsenate-resistant soil bacterium from arsenic-contaminated cattle dip sites. *Genome Announcements*. 1(2):e00173-13.
- Zambrano-Cárdenas, R.M., González, T.L., Aranguré-Zuñiga, F.J., Espinosa-Rodríguez, M.A., Paredes-Limas, J.C. 2011. ¿Arsénico en Tepic? *Revista Fuentes*. 3(6):25-30.
- Zhou, T., Radaev, S., Rosen, P.B., Gatti D.L. 2000. Structure of the ArsA ATPase: the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *EMBO Journal*. 19:4838-484.
- Zurfluh, K., Power, K. A., Klumpp, J., Wang, J., Fanning, S., Stephan, R. 2014. A Novel Tn 3-Like Composite Transposon Harboring bla VIM-1 in *Klebsiella pneumoniae* sp. *trifluorometano* Isolated from River Water. *Microbial Drug Resistance*.

10. ANEXOS

Anexo 1. Clave de los aislamientos ambientales

Clave	Núm. de cepa en el laboratorio	Clave	Núm. de cepa en el laboratorio
Kleb-1	94	En-4	21
Kleb-2	62	En-5	49
Kleb-3	19	En-6	10
Kleb-4	20	En-7	13
Kleb-5	12	En-8	15
Kleb-6	14	Ac-1	136
Kleb-7	95	Ac-2	162
Kleb-8	97	Ac-3	158
Kleb-9	123	Ac-4	159
Kleb-10	46	Ac-5	8
Kleb-11	81	Ac-6	56
Kleb-12	36	Ac-7	48
Kleb-13	63	Ac-8	149
Ec-1	23	Ac-9	161
Ec-2	30	Ac-10	57
Ec-3	131	Cf-1	84
Ec-4	54	Cf-2	85
Ec-5	152	Ye-1	45
Ec-6	155	Ye-2	47
Ec-7	127	Kc-1	51
En-1	4	Yr-1	53
En-2	5	Ps-1	31
En-3	16		

Anexo 2. Soluciones utilizadas en Electroforesis de campos pulsados (PFGE)

1M Tris·HCl, pH 8.0

121 g Tris base

Disolver en 650-700 mL de agua ultrapura

Adicionar aproximadamente 80 mL de HCl 6N

Permita que la solución llegue a temperatura ambiente

Hacer ajuste de pH, diluir a 1000 mL con agua ultrapura y esterilizar por autoclave.

10 N NaOH

400 g NaOH

Cuidadosamente disolver en 800 mL de agua ultrapura

Permita que la solución lleque a temperatura ambiente

Diluir a 1000 mL con agua ultrapura y esterilizar por autoclave.

0.5 M EDTA, pH 8.0

186.1 g. Na₂EDTA·2H₂O

Adicionar 800 mL de agua ultrapura, mezclar y ajustar el pH a 8.0 con aproximadamente 50 mL de NaOH 10 N.

Buffer Fosfato Salino (PBS), 0.01 M, pH 7.2-7.4.

137 mM NaCl - 8 g.

2.7 mM KCl - 0.2 g.

10 mM Na₂HPO₄ - 0.24 g.

Disolver en aproximadamente en 800 mL de agua ultrapura, mezclar y ajustar el pH a 7.2-7.4 con HCl. Llevar a un volumen final de 1000 mL con agua ultrapura, esterilizar en autoclave por 20 min a 15 lb/sq.

20 % Dodecilsulfato sódico (SDS)

20 g SDS

80 mL de agua ultrapura estéril

Añadir cuidadosamente el SDS al agua en un recipiente estéril; disolver y mezclar suavemente y calentar a 35 - 45°C.

20 mg/mL Solución Stock Proteinasa K

100 mg de Proteinasa K

5 mL de agua ultrapura estéril

Mezclar y hacer alícuotas de 500-600 µL en tubos de microcentrifuga.

Guardar a -20°C.

10 % N- Lauroylsarcosine sodium (Sarcosil)

10 g Sarcosil

90 mL de agua ultrapura estéril

Añadir cuidadosamente el SDS al agua en un recipiente estéril; disolver y mezclar suavemente, calentar a 50°- 60°C.

Bromuro de Etidio

10 mg/mL de solución stock

Diluir 1:10000 con agua ultrapura (10 µL en 100 mL de agua).

Buffer (TE) Tris:EDTA, pH 8.0

10 mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0

10 mL 1M Tris HCl, pH 8.0

2 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0

Llevar a un volumen final de 1000 mL con agua ultrapura.

Buffer Suspensión Celular (CSB)

100 mM Tris-HCl: 100 mM EDTA, pH 8.0

10 mL de 1 M Tris-HCl, pH 8.0

20 mL de 0.5 M EDTA, pH 8.0

Llevar a un volumen final de 100 mL con agua ultrapura estéril.

Buffer de lisis celular

50 mM Tris-HCl: 50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% N-lauroyl-Sarcosine, Sodium salt (Sarcosil)

Añadir 0,1 mg/mL de Proteinasa K, justo antes de su uso.

12.5 mL 1 M Tris-HCl, pH 8.0

25 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0

25 mL 10 % Sarcosil

Llevar a un volumen final de 500 mL con agua ultrapura estéril.

Nota: añadir 25 μ L solución stock de Proteinasa K (20 mg/mL) para 5 mL de buffer de lisis.

Se usa para la lisis celular de los bloques de agarosa de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella sonnei*, *Campylobacter jejuni*, y *C. perfringens* para PFGE. Los bloques de agarosa son lisados en 50 mL de Buffer CBS contenido en un tubo Falcon de 50 mL.

Buffer TBE 0.5X

200 mL 5X Buffer TBE o 100 mL 10X Buffer TBE

Llevar a un volumen final de 2000 mL con agua ultrapura.

Nota: el agua utilizada para diluir el buffer TBE concentrado de 5X o 10X a TBE 0,5X no tiene que ser estéril.

Agarosa para los bloques de agarosa 50 mL:

1% Seakem Gold Agarosa: 1% SDS: Buffer TE (10 mM Tris: 1mM EDTA)

Pesar 0.50 g de Agarosa Seakem en un frasco de vidrio con tapón de rosca de 250 mL; añadir 47.0 mL de Buffer TE, agitar suavemente para dispersar la agarosa, fundir con ayuda del microondas durante 30 segundos, se hacen intervalos de 10 seg. Antes de agregar el SDS una temperatura entre 55-60 °C en baño maría. Añadir 2.5 mL de SDS al 20 % (precalentado a 55 °C) mezclar bien, se debe evitar crear burbujas. Colocar en baño maría a una temperatura de 55-60 °C hasta su uso.