

DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA POTABLE UTILIZANDO AL GEN REPORTERO *LACZ*

Rodríguez Domínguez Zaira Alejandra¹, Hernández León Elía Noemí², López Ramírez Varinia³,
Álvarez Mejía César⁴.

1 [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Abasolo, Guanajuato] | zay_sweet@hotmail.com

2 [Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Abasolo, Guanajuato] | elianoemihl@hotmail.com

3 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Guanajuato] | varinialr@gmail.com

4 Ingeniería Ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Abasolo, Guanajuato] | cesar.alvarez@tecabasolo.edu.mx

Resumen

En el Estado de Guanajuato se ha reportado presencia de arsénico en agua potable por contaminación antropogénica y geológica, éste es un metaloide tóxico que causa enfermedades, lesiones cutáneas, cáncer, etc. Por ello es importante identificar la presencia de arsénico en agua como una medida de profilaxis. En este trabajo, utilizamos un sistema de monitoreo basado en la expresión del gen reportero *lacZ* bajo el control del gen represor de arsénico *arsR*. Realizamos los ajustes de concentración de Xgal y densidad bacteriana para obtener una señal óptima del gen reportero, así como el volumen de agua de las muestras. Utilizamos la cepa *E. coli* pMmv132-*arsR*-ABS proporcionada por el Dr. Jan Roelof Van der Meer de la Universidad de Lausanne, la cuál ha sido genéticamente modificada insertando un plásmido con resistencia a la carbenilicina, reduciendo la expresión basal del gen *lacZ* ante la ausencia de arsénico. Cuando se añade al medio Xgal en presencia de arsénico, la enzima β -galactosidasa (*LacZ*) lo hidrolizará generando una coloración azul la cuál será variable a distintas concentraciones de arsénico (0.0375 mM-1 mM). Por el momento, hemos podido establecer valores cuantitativos en cuanto a las concentraciones de arsenito, además de obtener resultados cualitativos como una gama de coloración azul que va de menor a mayor de acuerdo a la concentración de arsénico presente..

Abstract

In Guanajuato's State has been reported the presence of arsenic in water, form an unknown source, although the main source could be from geological or anthropogenic activities. Arsenic is a toxic metalloid that causes disease, skin lesions, cancer, etc. Therefore, it is important to identify its presence in water as a prophylactic measure. In this work, we use a bacterial monitoring system for arsenic detection, based on the expression of *lacZ* reporter gene, under the control of the repressor gene *arsR*. We adjust the concentration of Xgal and bacterial density cell, to obtain a good signal of the reporter gene and to test volume in tap water. We used the strain *Escherichia coli* pMmv132-ARSR-ABS provided by Dr. Jan Roelof van der Meer of the University of Lausanne; *lacZ* gene product hydrolyzes Xgal and generates a blue color precipitated that can be monitored spectrophotometrically and its intensity depends of arsenic concentrations (0.0375-1mM). At the moment, we have set quantitative values regarding concentrations of arsenite, in addition to obtaining qualitative results as a range of blue color that goes from low to high according to the concentration of arsenic.

Palabras Clave.

Gen reportero; *lacZ*; Biosensor; Arsénico; Gen represor.

INTRODUCCIÓN.

El arsénico (As) es un metaloide que se encuentra distribuido en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera. Por ser un metaloide puede asociarse a moléculas orgánicas e inorgánicas. Desde la Edad Media se han utilizado los compuestos arsenicales como uso medicinal en la aplicación en lesiones cutáneas, además de usarlo como un agente venenoso por su gran alto de toxicidad. [1] El arsénico proviene de fuentes naturales (meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas), también se encuentran de manera antropogénica en los procesos industriales (minería, en la industria metalúrgica, pesticidas, conservantes de la materia; [2]). El mecanismo de acción de los compuestos arsenicales trivalentes es su afinidad por los grupos sulfihilo de las proteínas. El arsénico (V) inhibe el ciclo de Krebs e interrumpe el proceso para la producción de ATP y la síntesis de ADN. La contaminación por arsénico en los últimos años ha crecido gracias al aumento de la industrialización ocasionando la contaminación como la quema de carbón y la industria metalúrgica [3]. Éste contamina el agua, el aire y el suelo. Los organismos marítimos como algas, fitoplacton, moluscos y peces absorben el arseniato convirtiéndolos en pequeños compuestos orgánicos como el ácido metilarsónico que es excretado al ambiente. En la última década se han desarrollado herramientas para el monitoreo ambiental de contaminantes a partir de bioreporteros que la mayoría de veces son especies modificadas genéticamente que permiten detectar la presencia de analitos específicos [2].

Un biosensor es un dispositivo de medición que es capaz de detectar cambios ya sean físicos o químicos haciendo que se produzca una señal. En este trabajo utilizaremos un biosensor celular ya que son más específicos y se puede observar más fácilmente los cambios que se puedan presentar ya sean los físicos o químicos [4]. Utilizaremos el gen reportero *lacZ*, que codifica para una enzima beta-galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de Xgal (un análogo de lactosa) y cuya expresión está controlada por la presencia del gen represor *arsR*. En presencia de arsénico el represor es removido y el gen reportero es expresado [5]. La expresión de este gen reportero lo podemos monitorear por medio de X-gal como sustrato que al ser

degradado produce un color azul, que puede ser cuantificado por espectroscopia visible, y relacionar esta coloración con la concentración de arsénico, lo que nos permite la identificación de arsénico en diferentes muestras, como el agua. Nosotros estamos aplicando esta metodología para la determinación de arsénico en agua potable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de las condiciones de cultivo.

Se incubo la cepa de *E.coli* 1595 que contiene el plásmido *pmv-ars-ABS*. En dicho plásmido está clonado el gen reportero de *lacZ* bajo el control del represor *arsR* (Imagen 1), en caldo nutritivo suplementado con antibiótico (50 µg/mL de carbenicilina) a temperatura ambiente y en agitación por 24 horas. Los cultivos se colectaron por centrifugación (1 mL) y se lavaron con agua destilada estéril dos veces (1 mL), este paquete celular fue utilizado de manera independiente para hacer las determinaciones.

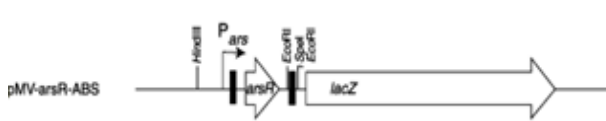


Imagen 1: Gen reportero *lacZ* bajo regulación del represor *arsR*. El promotor es constitutivo.

Preparación de las muestras.

Los paquetes celulares fueron resuspendidos en diferentes volúmenes (50 y 100 µL) de solución de X-gal (1 mg/mL) y se probaron diferentes volúmenes de estas mezclas para determinar el volumen mínimo para la detección de arsénico (0.1, 0.2 y 1.0 mL de una solución de arsénico, 0.0375, 0.075, 0.125 y 0.5 mM) como control usamos solamente el paquete celular sin arsénico, lo que observamos fue que nuestra cepa 1595 tomó una coloración azul con una alta coloración azul. Los parámetros que determinamos fue la densidad celular y las condiciones que debería

presentar nuestro cultivo (saturado de toda la noche) posteriormente debería ser lavado con 1 mL de agua destilada y el empleo de X-Gal (10, 20, 100 μ L) hasta observar una coloración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Determinación de las condiciones de detección de arsénico.

En un primer ensayo, fuimos capaces de observar la expresión de *lacZ* en presencia de arsénico, en un volumen de 2 mL de cultivo bacteriano (Imagen 2), con esto comprobamos que el sistema es capaz de responder a arsénico, por lo tanto, decidimos realizar los ensayos en diferentes concentraciones de X-gal y cultivo bacteriano afín de determinar un volumen óptimo para una correcta detección del metalode.



Imagen 2. Presencia de color para la detección de arsénico, en 2 mL de muestra.

En los ensayos realizados en laboratorio, se observaron resultados positivos para presencia de arsénico, además que se adecuó el protocolo de manera que se utilizara menos X-gal para la obtención de una coloración azul que se muestra en la (Imagen 3). Por lo tanto, nuestro sistema es específico a arsénico y la intensidad de coloración

sería directamente proporcional a la concentración del metal.



Imagen 3. Detección de arsénico a través del desarrollo de color en presencia de arsénico, en 100 μ L de muestra.

Determinación de Arsénico en agua.

Con los parámetros establecidos del cultivo bacteriano y volumen de X-Gal, realizamos una determinación en agua de la llave y agua de garrafón, comparándolo con una curva control de arsénico (Imagen 4), donde se observa que el agua de garrafón presento una coloración azul semejante a la que tendría con arsénico, este resultado nos puede indicar que estas muestras tienen arsénico o que el tratamiento de purificación podría estar generando una señal de falso positivo, por el momento estamos estudiando las probables interferencias de detección de arsénico en agua de garrafón.

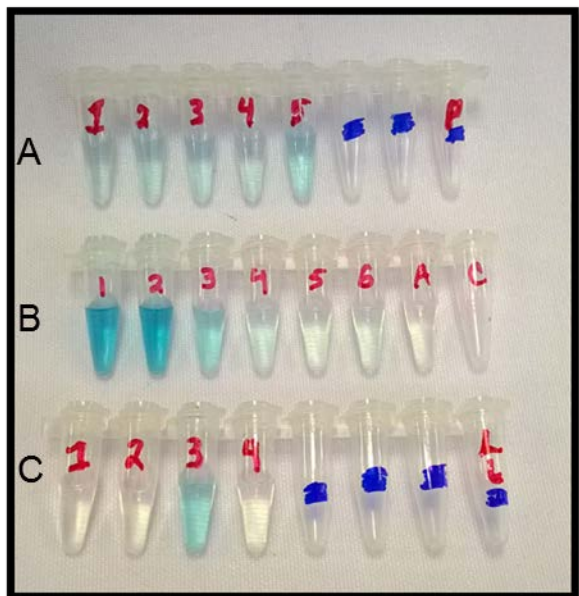


Imagen 4. Se aumentó a cantidad del paquete celular con X-gal a 20 μM con 100 μL de las concentraciones de arsénico. A) Agua de garrafón, B) Curva control C) Agua de la llave

También se observa en la Imagen 4, que fuimos capaces de detectar arsénico en agua de la llave de un pozo de Pueblo Nuevo (Muestra 3, panel C), este resultado demuestra que el sistema de detección de arsénico está listo para realizarse a volúmenes de 100 μL de muestra de agua de la llave, los resultados positivos serán reanalizados para confirmar la presencia de arsénico.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos implementado un sistema de biomonitorio de arsénico de bajo costo, que nos permitirá evaluar la presencia de este metaloide en agua potable, también encontramos señal de arsénico en algunas muestras de agua de garrafón, lo que podría indicar que las purificadoras de agua no estarían eliminando el arsénico, aún falta en este caso evaluar si la señal de arsénico proviene de alguna otra reacción química que resulte en falsos positivos, o que el agua donde se obtuvo estas muestras provengan de otro origen diferente al de las potabilizadoras.

En este trabajo determinamos la presencia de arsénico en agua de la llave, en concentraciones altas en el agua del ITESI, por lo que se puede usar este sistema en la determinación de arsénico en otras fuentes de agua con confianza y a bajo costos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato por las facilidades para realizar las determinaciones iniciales de arsénico y al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo por el apoyo en la realización y continuidad de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] Litter, M. I., & Armienta, M. A. (n.d.). Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos.
- [2] Scott, D. L., Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). Genetic Alloy Engine
- [3] Ke, A. U. (2003). Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for a Quantitative and Rapid Assessment of Arsenite and Arsenate in Potable Water, 4743–4750.
- [4] Scott, D. L., Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). Genetic Alloy Engine and Biocatalysis: Electrochemical Sensing Systems for Antimonia and Arsenite, 69(1), 16–20.
- [5] Diesel, E., & Schreiber, M. (2016). Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters, (February). <http://doi.org/10.1007/s00216-009-2785-x>