

USO DE BIOMONITORES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA *IN SITU*

Hernández León Elia Noemi 1, Rodríguez Domínguez Zaira Alejandra 2, López Ramírez Varinia 3, Álvarez Mejía Cesar 4.

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

2 [Ingeniería ambiental, Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, Abasolo, Guanajuato] | zay_sweet@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 existe una contaminación de origen desconocido en agua potable, con metales pesados y minerales, entre ellos el arsénico (As), lo cual representa un problema de salud. Por ello es importante desarrollar protocolos de identificación oportuno de estos contaminantes. En este trabajo presentamos el desarrollo de diversos protocolos de identificación de As en agua, basados en biomonitores diseñados por el grupo del Dr. Jan Roelof Van der Meer. Los biomonitores bacterianos, contienen los genes reporteros *lacZ* y *gfp*. Los cuales debido a sus características representan sensibilidad y especificidad hacia la detección de arsénico. Los protocolos están enfocados hacia la detección de arsénico de agua potable, monitoreo de agua purificada, y estamos explorando la posibilidad de determinar arsénico en muestras clínicas, así como el diseño de una prueba portátil para la identificación *in situ*. Por el momento, hemos sido capaces de establecer las condiciones para expresión del gen *gfp* y *lacZ*, así como las condiciones de determinación de arsénico en muestras de agua. El desarrollo de la tira reactiva de LacZ ha sido probado en el laboratorio y aun estamos determinando las condiciones adecuadas para esta prueba. El objetivo es realizar análisis de determinación de As cualitativamente en fuentes de agua, estudiar los sitios contaminados y proponer un proceso de descontaminación.

Abstract

In the State of Guanajuato, there is contamination of unknown origin in water with heavy metals and minerals, including arsenic, thereby it represents a potential health issue. We developed different approaches for identification of As, using biomonitors proposed by Dr. Jan Roelof Van der Meer. These bacterial biomonitors, contain genes reporters, such as *lacZ* and *gfp*, because of their features, they show specificities and sensibilities for arsenic detection. The protocols are focused to arsenic detection in water, monitoring different sources of water as a temporal approach the determination *in situ* by a portable test, and we want to use it for arsenic detection in clinical samples. At this moment, we have been able to establish the conditions for the expression of *gfp* and *lacZ* gene and their use for arsenic detection in water. The development of the test strip of LacZ has been tested in the laboratory and we are still checking the condition for arsenic detection. The aim of this work is to detect arsenic in water sources, study polluted sites, and propose a process of decontamination.

Palabras Clave

Arsénico 1; Biomonitoreo 2; GFP 3; Agua 4; LacZ 5. Biosensor

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los contaminantes de tipo inorgánico, provenientes de la actividad minera e industrial juegan un papel importante en el impacto a los sistemas ambientales, y a la salud humana. En el estado de Guanajuato, uno de los principales contaminantes en la región son el cromo, plomo, flúor y arsénico [1]. Este último de origen desconocido, el cual se encuentra presente de manera natural en varias depósitos acuíferos, representando un riesgo a la salud en la población expuesta, como cáncer de hígado y la muerte [2]. La detección del arsénico se realiza principalmente por absorción atómica, está técnica, específica y sensible, también es cara, y debido a esto, no se aplica de manera extensa a esta determinación [3].

Debido a la situación de contaminación en acuíferos en el estado, y la necesidad de determinar la presencia de arsénico, proponemos la aplicación de un método para la determinación de arsénico, basado en biosensores, los cuales han sido desarrollador por el grupo del Dr. Jan Roelof Van der Meer de la Universidad de Laussane [4,5]. Los biosensores fueron optimizados genéticamente para reducir la expresión de fondo en la ausencia de arsénico y en nuestro caso utilizaremos dos tipos de genes reportero, *lacZ* y GFP. El gen reportero *gfp* (pPR-arsR-ABS), produce una proteína que fluoresce a una longitud de onda 400nm [4,5]. El gen reportero *lacZ* (pMVarsR-ABS), cataliza la hidrólisis de beta-galactosidasa, cuyo producto de degradación resulta en un precipitado azul [6]. En este trabajo estamos desarrollando varios protocolos para determinar arsénico en diferentes tipos de muestras, principalmente en agua. Considerando los dos tipos de genes reporteros, cuya expresión es directamente proporcional a la concentración de arsénico, posibilitando la capacidad de cuantificación en niveles cercanos a los reportados en la norma oficial mexicana. Estos protocolos incluyen el diseño de un sistema de análisis masivo de muestras a bajo costo, de manera semicuantitativa en una plataforma de 96 pozos, considerando la fluorescencia o el uso de X-Gal. Con ello, además de la identificación de sitios contaminados con arsénico, que representa un potencial impacto a la salud de la comunidad,

estaremos generando las bases para un análisis temporal de estos sitios y poder seguir la dinámica de arsénico y las condiciones en las cuales podrían variar. En estos momentos tenemos estandarizadas las condiciones para realizar la identificación de arsénico en placas de 96 pozos de PCR o de tipo ELISA, y estamos estableciendo las condiciones para realizar la evaluación en fluorescencia con el mismo número de muestra utilizando GFP como reportero, con este último procedimiento obtendremos mayor sensibilidad en las determinaciones, así como menores costos de operación debido a que no requeriremos algún sustrato especial. También estamos desarrollando un procedimiento *in situ* de manera cualitativa para la determinación externa del arsénico de manera independiente del laboratorio. Consideramos que la determinación de arsénico en el estado de Guanajuato a bajo costo nos permitirá inicialmente localizar los sitios potencialmente peligrosos para la población, y así poder establecer adecuadamente las medidas de remediación y prevención a la población expuesta, para finalmente participar en una mejor administración de este recurso

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del protocolo de detección de arsénico con GFP

Procedimiento de detección está basado en la construcción *E. coli* 1598 (Imagen 1) presente en la cepa, protocolo iniciamos con un paquete celular que se obtuvo de un caldo nutritivo de 250 ml saturado (12hrs a 37°C) la cual como gen reportero tiene el *GFP* (con el antibiótico kanamicina a 50 ug/ml). Los cultivos serán evaluados con un flurómetro con una longitud de onda de 400 nm.

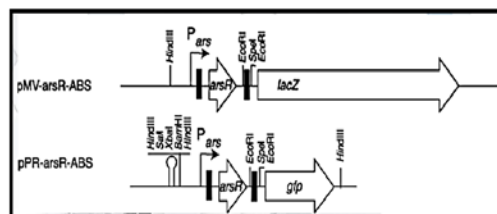


Imagen 1: Gen reportero *lacZ* bajo regulación del gen represor *arsR*. El Gen reportero *gfp* bajo regulación del gen represor *arsR* [].

Establecimiento del protocolo de detección *in situ*

Para determinar arsenito *in situ*, se realizaron pruebas a nivel laboratorito, para establecer un protocolo de detección confiable, que preserve al paquete celular, el cual se obtuvo de un caldo nutritivo de 250 ml saturado (12hrs a 37°C) con la *E. coli* 1595 (Imagen 1), utilizando al gen reportero como gen reportero tiene el *lacZ* (con antibiótico ampicilina a 50 mg/ml), cada paquete conto de 2 ml de cultivo centrifugado por 1rpm retirando el sobrenadante y este paquete celular se lavó con un 1 ml de agua inyectable centrifugado a 1rpm y retirado el sobrenadante, una vez obtenido nuestro paquete celular lavado se agregó 100µl de X-Gal.

El círculos de papel filtro de aproximadamente 0.5 cm de diámetro que fueron sujetos a cinta testigo, fueron colocadas las distintas concentraciones de arsenito (0.076ppm, 0.038ppm, 0.019ppm, 0.00961ppm, 0.00576ppm y de 0.00288ppm.) a una cantidad de 5 µm y 5 µm del paquete celular-X-Gal y una testigo utilizando agua destilada y se dejó pasar un tiempo aproximado de 30 minutos. Como control se realizó el mismo procedimiento ya mencionado pero ahora en una tira de tubos eppendorf para PCR pero con dos paquetes celulares en 20 µl de X-Gal y 100 µl de cada una de las distintas concentraciones de arsenito ya mencionadas en la anterior determinación (Imagen 3).

Establecimiento de un protocolo para determinar concentraciones de arsénico por espectrofotometría.

Para la determinación de concentración de arsénico en espectrometría se realizó con dos paquetes celulares en 20 µl de X-Gal en 1 ml de las distintas concentraciones de arsénico ya nombradas con anterioridad, después de 30 minutos y que estas presentaran la tonalidad por la presencia de arsénico cada una de las muestra se diluyo en 2ml de agua inyectable, esta determinación dilucida fue vertida en las cubetas y el espectrofotómetro a 595 nanómetros, así arrojando las absorbancia de cada muestra (Imagen 4).

Determinación de arsénico por medio de LacZ.

Este procedimiento de identificación se está realizando en conjunto con la estudiante Rodríguez Domínguez Zaira Alejandra, la cual es la responsable y encargada de determinar la presencia de arsénico en agua potable. Zaira Rodríguez ha establecido las condiciones para la determinación de arsénico utilizando volúmenes de hasta 0.1 ml de muestra.

A partir de estas condiciones, nosotros aplicaremos su procedimiento (publicado en esta misma revista) en la adaptación de la determinación de arsénico en diferentes muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de arsénico *in situ*

En los primeros ensayos de la determinación de arsénico *in situ*, fue realizado en círculos de papel de circunferencia de 5 mm, los cuales se muestran en la imagen 2. Los resultados de esta prueba mostraron señal de arsénico de manera constitutiva, aun en ausencia de arsénico (Imagen 2, muestra A), debido principalmente a que las bacterias fueron cultivadas en medios de cultivo que fueron preparados con agua de la llave, la cual posteriormente se demostró que contenía arsénico, provocando una inducción constante de nuestro gen reportero sin presentar una modulación ante diferentes concentraciones, presentando falsos positivos.

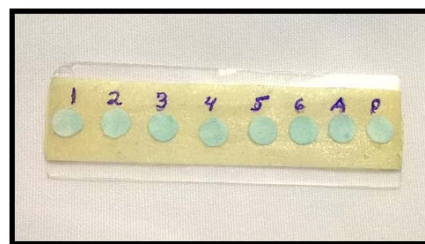


Imagen 2: Determinación de arsénito, mayor a menor concentración en papel filtro.

La evaluación en papel fue para determinar este soporte como una parte importante en el diseño de una tira reactiva, por la absorción de los componentes X-Gal y las células. Aún estamos determinando la viabilidad de las células, ya que su mantenimiento son importante en la actividad de LacZ, así como la fotosensibilidad del sustrato X-Gal. De esta manera estamos desarrollando un sistema vbasado en un soiporte de papel en una tira de polietileno, liofilizado y guardado en un empaque oscuro, como una propuesta para la generación de este dispositivo. También empezamos a evaluar otros soportes del tipo isopo estéril.

Determinación de Arsénico con X-Gal

La determinación de arsénico por medio lacZ se muestra en la imagen 3. En esta imagen se describe la dosis respuesta de la expresión del gen reportero *lacZ* en presencia de diferentes concentraciones de arsénico, con ello podemos definir que se puede realizar cuantificaciones de este analíto, así como los volumnes, para un mejor detalle de esta sección, referirse al trabajo de Zaira Rodríguez "Determinación de Arsénico en agua potable utilizando al gen reportero *lacZ*"



Imagen 3: Curva control de arsénico a diferentes concentraciones, utilizando LacZ.

Determinación de la concentración de arsénico por espectrofotometría.

Se están realizando las adecuaciones necesarias para la determinación y cuantificación de arsénico por medio de espectrofotometría, considerando las concentraciones de muestra, agua y X-Gal descritas en el trabajo de Zaira Rodríguez. En este tipo de determinación existe interferencia por las densidad celular, presente en cada muestra, por ello, estamos ajustando los parámetros de densidad para reducir esta interferencia, y poder tener una mejor definición de la señal producida por el gen reportero *lacZ*.

En la Imagen 4 observamos la relación entre la señal producida por LacZ en forma de color azul y la interferencia del color azul, producto de la degradación del X-Gal, en una absorbancia a 595 nm. En esta imagen se aprecia el control con agua, que presenta una densidad de 1.23, relacionado con la absorbancia por la densidad celular. Por ello, las densidades arriba de esta 1.23, serían consideradas como la adición de la absorbancia debido al color azul, producido por la hidrólisis de X-gal como se muestran para otras determinaciones que contienen arsénico. Aún estamos ajustando la generación de dosis respuesta para obtener una curva control confiable y poder cuantificar la concentración de arsénico con mayor confianza. Este análisis aún está en una fase de adaptación en la condiciones del volumen de lectura, ya que el volumen propuesto por celda es de 3 ml y trataremos de realizarlo con 1 ml y así abaratar costos por el consumo de X-Gal in perder sensibilidad en la determinación.

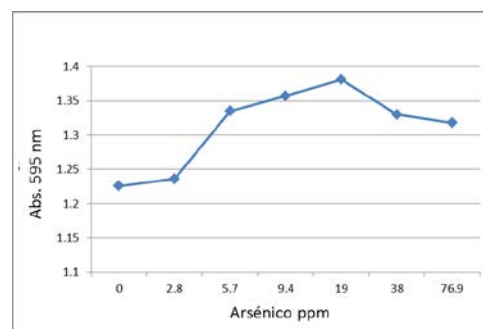


Imagen 4. Dosis-respuesta de LacZ en presencia de diferentes concentraciones de arsénico.

CONCLUSIONES

En este proyecto hemos podido ser capaces de establecer un sistema para la determinación de arsénico por biomonitores en diferentes concentraciones de arsénico y con diferentes muestras. Aún falta establecer la determinación de la cuantificación de arsénico por medio de espectroscopia, debido a la interferencia de la densidad celular a 595 nm de absorbancia. Estamos a punto de realizar las determinaciones de arsénico utilizando GFP en placas de 96 pozos y poder abaratar costos usando fluorescencia. Está técnica es adecuada para la determinación de arsénico y puede ser aplicada en su determinación en diferentes condiciones de acceso a la muestra y diferentes sensibilidades.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- [1] Estado, E., Hidr, P., & Mar, S. (n.d.). Comisión Estatal de Agua de Guanajuato (CEAG) Programa Hidrológico de Guanajuato, 53–60.
- [2] Litter, M. I., & Armienta, M. A. (n.d.). *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*.
- [3] Rosas, O. V. (28 de 03 de 2012). *Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* . Obtenido de Evaluacion de la concentracion de arsenico en agua empleando biosensores microbianos:
<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9216/121.pdf?sequence=1>
- [4] Ke, A. U. (2003). *elop m en t of a S et of S im p le arcterial B iosen sors for u an titativ e an ap id easu rem en ts of A rsen ite an d rsen ate in P otab le W ater*, 4743–4750.
- [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>

- [6] Scott, D. L., Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P., & Daunert, S. (1997). *Gene t ic a lly Engine e red B ac t eria : Ele c t roc he m ic a l Se nsing Syst e m s for Ant im onit e a nd Arse nit e*, 69(1), 16–20.