

CAPÍTULO

# 1



## Evaluación de la biotransformación de roxarsona

por comunidades bacterianas  
de aguas subterráneas  
y su potencial toxicidad

POR

---

Santiago Xavier **MAFLA ANDRADE**

---

Víctor Leandro **CAMPOS**

---

María Angélica **MONDACA**

---

## Introducción

El arsénico se localiza en el ambiente de forma nativa integrado en sulfuros en agua y suelo. Estudios reportan que los compuestos organoarsenicales se consideran menos tóxicos que los inorgánicos (Suárez et al., 2004). Algunos derivados del arsénico que contienen grupos metilo o fenilo, muy usados en agricultura, causan preocupación por los efectos sobre la salud de animales de experimentación, clasificándose por la US Environmental Protection Agency como un agentes carcinogénicos (Chiou et al., 1995). Entre estos compuestos se encuentran el ácido monometilarsónico (MMA), así como el ácido dimetilarsínico (DMA) y la roxarsona (ácido 4-hidroxi-3 nitrobenzenoarsónico (ATSDR, 2007).

El ácido 3-nitro-4 hidrofénil arsénico, conocido como 3-Nitro<sup>®</sup> (roxarsone), es una droga para uso animal manufacturada por Alpharma y aprobada para ayudar a prevenir la coccidiosis en animales de granja. El 3-nitro<sup>®</sup> (Roxarsone) también está aprobado para el aumento de peso, la eficiencia alimenticia y la mejora en la pigmentación de pollos (Yao et al., 2011). Un estudio de la Food and Drug administration de Estados Unidos indicó la presencia de arsénico inorgánico en el hígado de pollos (Kitchin et al., 2001), por lo cual Alpharma, una subsidiaria de Pfizer, Inc., decidió suspender voluntariamente venta de 3-Nitro<sup>®</sup> en los Estados Unidos en el 2011.

Más del 95 % de la roxarsona dada a los pollos es excretada sin cambios en el estiércol de aves (Garbarino et al., 2003), el cual es regularmente aplicado como fertilizante en granjas aledañas, o utilizado en abonos comerciales (Yao et al., 2010). El arsénico de dichas aplicaciones puede filtrarse desde la superficie hacia las napas de agua. La exposición crónica al arsénico inorgánico es causa conocida de cáncer (Chen et al., 2007) y ha sido relacionada con enfermedades cardíacas, diabetes y nocivo para las funciones cerebrales (Chen et al., 1992).

Stolz et al. (2007) evaluó la transformación de la roxarsona en condiciones anaeróbicas por especies de *Clostridium* presentes en desechos de pollo y en un cultivo puro de una especie de agua dulce (*Clostridium sp.* Cepa OhILAs) que respiran arseniato. Cortinas et al. (2006) mostraron que en ausencia de oxígeno, la roxarsona se transforma rápidamente en la correspondiente amina aromática que es el ácido 4-hidroxi-3-aminofenilarsona (HAPA), la formación de HAPA se atribuía a la reducción del grupo nitro.

No obstante, no se han descrito estudios que indiquen la presencia de microorganismos resistentes al arsénico en cuerpos de agua subterráneos contaminados por la lixiviación de roxarsona, por ello este estudio tiene la finalidad de identificar la presencia de bacterias arsénico resistente y la transformación de roxarsona en un medio aerobio como anaerobio.

## Materiales y métodos

### Obtención de muestras

Se tomaron muestras de agua de pozo en zonas en la comuna de Chillan, región del Bío Bío, Chile, lugar en el cual la tierra ha entrado en contacto con la roxarsona a causa de la producción avícola de la zona. Estas fueron transportadas a 4°C al laboratorio de microbiología ambiental de la facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad de Concepción.

### Preparado de muestras

Ya en el laboratorio, la muestra se dividió en dos. Para el ensayo en condiciones aerobias fueron cultivados en matraz de 250 ml y en condiciones anaerobias en frascos de vidrio para autoclavar (BOECO) de 100 ml, a los cuales se les aireó CO<sup>2</sup> estéril por 45 segundos para obtener las condiciones necesarias.

El diseño del ensayo en condiciones aerobias y anaerobias se dividió en 4 experimentos: **1)** Un volumen de 100 ml del agua de pozo, adicionando roxarsona a una concentración de 0,5 mM. **2)** Una alícuota de 2 ml de agua de pozo en 100 ml de medio Stolz como control positivo **3)** Una alícuota de 2ml de agua de pozo en 100 ml de medio Stolz condicionado con roxarsona 0,5 mM **4)** y finalmente, 100 ml de medio Stolz con roxarsona 0,5 mM; como control negativo.

El medio STOLZ (Stolz J.F., 1999) contiene 0,1544 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 4,2 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g de extracto de levadura, 10 ml de elementos traza y 2,4 ml de lactato (10 mM) en un litro de agua miliQ.



**FIGURA 1**  
Preparación de muestras **a)** condiciones aerobias, **b)** condiciones anaerobias

## Extracción y amplificación de ADN 16s

Se extrajo el ADN de los cultivos bacterianos, tanto en condiciones aerobias (AE1, AE2, AE3) como en condiciones anaerobias (AN1, AN2, AN3). Se ocupó el kit de extracción de ADN Ultra Clean® Microbiocal DNA Isolation Kit de MO BIO laboratories Inc. siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue amplificado con universal primers EUB 9-27 y EUB 1542 (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCAG-3') y (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3) (Brosius et al., 1978), lo que consistió en un ciclo de denaturación de 94 °C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos cada uno de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 64 °C y 1:30 minutos a 72 °C, finalmente, una elongación a 72 °C por 10 minutos. Terminado se observó la presencia de bandas por medio de una electroforesis en agarosa al 2% a 90 voltios por 30 minutos.

## DGGE

La DGGE fue desarrollada con DGGE 1001 system (C.B.S. Scientific Company Inc.). 15 µl de la PCR anidada, producto de la región V3, fue colocado directamente en un gel de bis acrilamida al 6% (p/v) con un gradiente de Denaturación del 40 al 80%, donde el 100% del agente denaturante contiene 7 M de urea y 40% de formamida. La electroforesis se desarrolló a un voltaje de 90V a 60°C por 12 horas.

## Análisis de perfiles de DGGE

Las bandas se analizaron usando el software Gel-Pro Analyzer 4.0 (Applied Math) definiendo las bandas como aquellas que poseían al menos 5% de intensidad de la banda más intensa, anotándose como presencia o ausencia de las bandas en cada posición del gel. Para la comparación se construyó una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda individual por cada línea. La matriz de distancia fue usada para la construcción de un diagrama de escalamiento multidimensional (MDS) el cual es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde cada fingerprint de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas. Clustering analysis y MDS se llevaron a cabo con el PRIMER V6 software package (Clarke y Gorley, 2001).

## Degradación de roxarsona

Se tomó 2 ml de muestra de los ensayos. Estas muestras fueron filtradas por medio de un filtro para jeringa milipore de 2 µm. De este filtrado se colocaron en placas para lectura de espectrofotómetro de 96 pocillos. Las placas se dividieron en dos, en la primera sección se midió la degradación de roxarsona (0,5 mM) en 100 ml de agua de pozo, usando como blanco agua miliq y como control positivo el agua de pozo filtrada más roxarsona (0,5 mM); en la segunda parte se midió la degradación de roxarsona (0,5 mM) en presencia de medio Stolz (100 ml) adicionado 2 ml de agua de pozo, como blanco se usó el medio Stolz y como control positivo el medio Stolz mas roxarsona (0,5 mM). La degradación de roxarsona, se midió por medio de espectrofotometría en el equipo EPOCH (Bioteck), usando el Gen5 Data Analysis software, a una longitud de onda entre 310-500 nm.

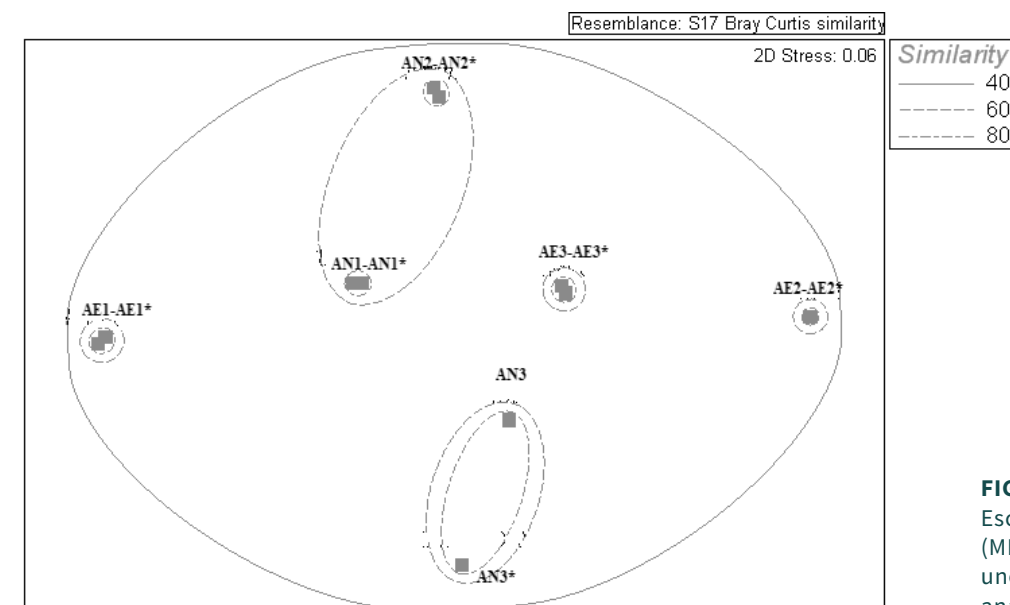
## Resultados y discusión

Las bandas del perfil de DGGE u OTUs se analizaron usando la correlación de Bray-Curtis. Usando una matriz de distancia se pudo calcular y analizar un escalamiento multidimensional (MDS) (Araya et al., 2008), lo cual demostró que los ensayos con mayor porcentaje de similitud fueron dos, agua de pozo con roxarsona y agua de pozo con medio las dos en condiciones anaeróbicas (AN2 y AN3), con un 60% de similitud, en comparación con el resto de ensayos (AE1, AE2, AE3 y AN1) que poseen un 40% de similitud en la estructuración bacteriana entre ellos incluyendo al grupo conformado por (AN2 y AN3) como se muestra en la **FIGURA 2**.

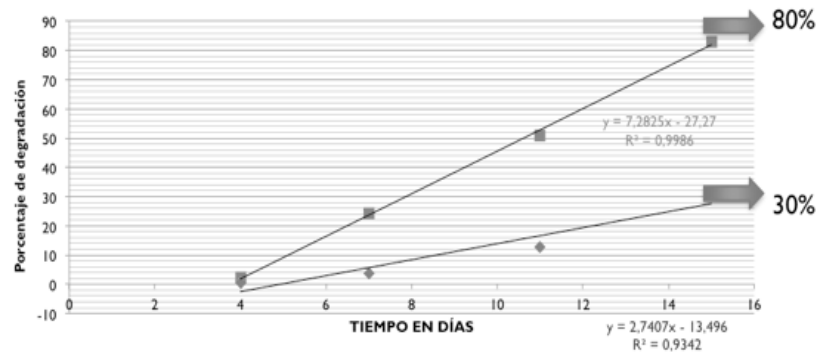
Además se hizo un análisis de Tukey para H' con un intervalo de confianza de 95%, los cuales revelan una gran diversidad entre los ensayos para AE1 (P=0,0003), AE2 (P=0,0002), AE3 (P=0,0002), AN1 (P=0,0003), AN2 (P=0,0002), AN3 (P=0,0002). El índice J' muestra una idéntica equidad en todos los ensayos, salvo en la réplica del ensayo anaeróbico (AN3). De igual forma el índice Simpson no muestra dominancia alguna para ninguno de los ensayos, esto es coherente ya que los ensayos se realizan en laboratorio con condiciones controladas.

## Degradación de roxarsona

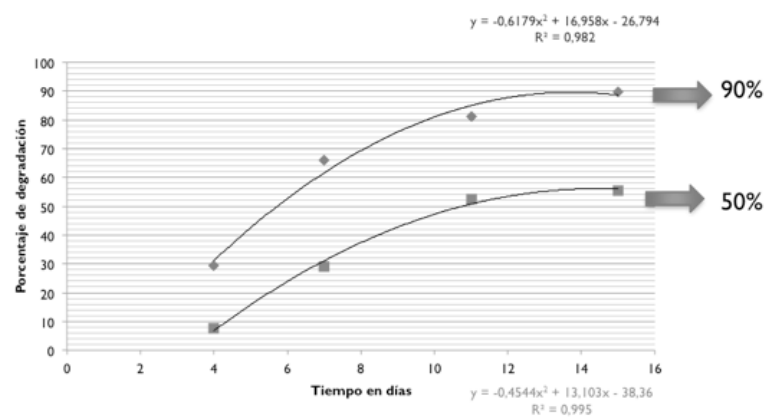
En condiciones aerobias se alcanzó un porcentaje de degradación máximo del 83,3% en 15 días, siendo el ensayo que fue condicionado con medio Stolz, el porcentaje máximo de degradación sin suplemento fue de 33,1% a los 15 días, lo que indicaría que al suplementar a las bacterias con un medio de fácil biodisponibilidad son más aptas para adaptarse y poder reducir la concentración de roxarsona en un medio acuático (**FIGURA 3 Y 4**).



**FIGURA 2**  
Escalamiento multidimensional (MDS) del gel de DGGE para cada uno de los ensayos aerobios y anaerobios



**FIGURA 3**  
Degradación de roxarsona en condiciones aeróbicas en agua de pozo (microcosmo 1) y roxarsona en agua de pozo+MDQ (microcosmo 3)



**FIGURA 4**  
Degradación de roxarsona en condiciones anaeróbicas en agua de pozo (microcosmo 1) y en agua de pozo+MDQ (microcosmo 3)

## Análisis de molecular

Indicando así una diferencia significativa, entre los ensayos, en términos de cantidad de OTUs registrados en el DGGE (Brinkhoff et al., 1998). Además existe una similitud del 80% entre los duplicados de cada uno de los ensayos, lo que es consistente ya que no debe existir una diferencia significativa entre duplicados. El 20% de diferencia existente en un mismo ensayo se debe al factor del error humano en la ejecución de la técnica. Si bien es cierto cada una de las bandas puede representar una especie (Muyzer et al., 1993), en este estudio se toman en cuenta las unidades taxonómicas organizacionales (OTUs), ya que no se hizo la identificación por especie ni su presencia in vivo de ellas, sino que se quería demostrar cómo el arsénico puede afectar en un ecosistema microbiano y las implicaciones de la pérdida de diversidad (Valdés et al., 2008).

El índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) muestra una mayor diversidad en el caso del ensayo AE3 y AN3, lo que concuerda con el desarrollo del experimento, ya que estos ensayos poseen el medio Stolz que ayuda a la adaptación de las bacterias con la roxarsona; seguidas de los ensayos AN1 y AN2, lo que demostraría que las bacterias en condiciones anaerobias son más tolerantes a la presencia de arsénico en su medio y que estas pueden usar al arsénico como aceptor de electrones, caso que no sucede en condiciones aerobias como muestra la **TABLA 1**.

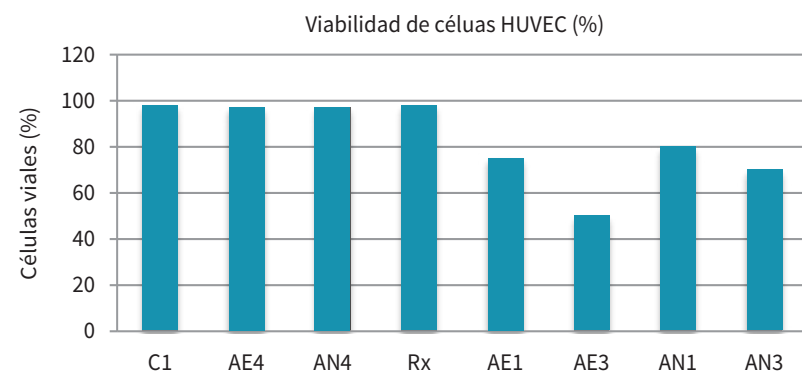
**TABLA 1.** Índice ecológico obtenido del perfil de las bandas de DGGE para el ADNr 16s, N abundancia, Rr índice de riqueza, H Shannon-Weaver, J Pielou,  $\lambda$  Simpson. \* las muestras que poseen el signo son las repeticiones de cada ensayo.

| Muestra | N  | Rr     | J     | H     | $\lambda$ |
|---------|----|--------|-------|-------|-----------|
| AE1     | 15 | 90,00  | 1     | 2,708 | 1         |
| AE1*    | 15 | 90,00  | 1     | 2,708 | 1         |
| AE2     | 15 | 90,00  | 1     | 2,708 | 1         |
| AE2*    | 15 | 90,00  | 1     | 2,708 | 1         |
| AE3     | 26 | 270,40 | 1     | 3,258 | 1         |
| AE3*    | 25 | 250,00 | 1     | 3,219 | 1         |
| AN1     | 18 | 129,60 | 1     | 2,89  | 1         |
| AN1*    | 20 | 160,00 | 1     | 2,996 | 1         |
| AN2     | 16 | 102,40 | 1     | 2,773 | 1         |
| AN2*    | 17 | 115,60 | 1     | 2,833 | 1         |
| AN3     | 22 | 193,60 | 1     | 3,091 | 1         |
| AN3*    | 32 | 409,60 | 0,875 | 2,746 | 0,9093    |

Se observó que las bacterias en el MQD suplementado con roxarsona produjeron una transformación mayor al 90% en condiciones anaeróbicas y un 80% en condiciones aeróbicas; en comparación al 50% en condiciones anaeróbicas y 30% en condiciones aeróbicas sin agregar el MQD; todos estos resultados fueron medidos a un tiempo final de 15 días (**FIGURAS 2 Y 3**). Adicionalmente, las bandas del perfil de DGGE u OTUs se analizaron usando la correlación de Bray-Curtis. Usando una matriz de distancia se pudo calcular y analizar un escalamiento multidimensional (MDS) (**FIGURA 5**) (Araya et al., 2008), el cual demostró que los microcosmos con mayor porcentaje de similitud fueron agua de pozo con roxarsona y agua de pozo con MQD, ambos en condiciones anaeróbicas (microcosmo 2 y 3), con un 60% de similitud, versus los ensayos (microcosmo 1), 2), 3) en condiciones aeróbicas y microcosmo 1) en condiciones anaeróbicas) que poseen un 40% de similitud, indicando una diferencia significativa de cantidad de OTUs registrados en el DGGE (Brinkhoff et al., 1998).

El índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) muestra una mayor diversidad en el caso del microcosmo 3) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, lo que concuerda con el desarrollo del experimento, ya que estos ensayos poseen el MDQ que ayuda a la adaptación de las bacterias con la roxarsona; seguidas de los microcosmos 1) y 2) en condiciones anaeróbicas, demostrando que las bacterias en condiciones anaeróbicas son más tolerantes a la presencia de arsénico en su medio y que estas pueden usar al arsénico como aceptor de electrones, caso que no sucede en condiciones aeróbicas.

De igual forma, el índice Simpson no muestra dominancia alguna para ninguno de los ensayos, y esto es coherente ya que los ensayos se realizan en laboratorio con condiciones controladas.

**FIGURA 5**

Toxicidad de los microcosmos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. AE1: agua de pozo + roxarsona, AE3: agua de pozo + MQD + roxarsona, AE4: MQD + roxarsona, AN1: agua de pozo+roxarsona, AN3: agua de pozo + MQD+roxarsona, AN4: MQD + r oxarsona; C1: control

Posteriormente se realizó una secuenciación de ADN de las principales bandas extraídas del análisis de DGGE, encontrando como principales grupos bacteriales: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes* y *Spirochaetes*.

La actividad tóxica de roxarsona y compuestos derivados de la biotransformación fue medida por medio de ensayo de toxicidad en células HUVECs, demostrando que los productos de degradación de los microcosmos 1) y 3) en condiciones aeróbicas presentaron aproximadamente un 25 % y 50 % de toxicidad respectivamente; en condiciones anaeróbicas, los microcosmos 1) y 3) presentaron aproximadamente un 20% y 30% de toxicidad, demostrando así que la comunidad bacteriana presente en aguas subterráneas transforma la roxarsona en productos tóxicos (FIGURA 4).

## Conclusiones

Las bacterias presentes en suelo obtuvieron un mayor porcentaje de transformación de la roxarsona (57,85%) en comparación con la transformación de roxarsona por parte del microcosmo de estiércol (22,97%) y el microcosmo formado por las bacterias de suelo y estiércol (23,39%).

El ensayo con células HUVEC demostró que la roxarsona no presenta toxicidad para células eucariotas, pero al presentar una transformación por parte del ensayo AN1 comienza a disminuir la viabilidad celular en un 20 %; de igual forma, en el ensayo de agua de pozo AN3 (bacterias de agua de pozo en condiciones anaeróbicas) disminuyeron la viabilidad celular en un 30%; y en el ensayo AE3, que contenía bacterias de estiércol, suelo y agua, la viabilidad celular fue disminuida en un 50%. Esto demuestra nuevamente que los compuestos originados de la biotransformación de la roxarsona por comunidades bacterianas pueden producir compuestos tóxicos nocivos para el hombre reduciendo el porcentaje de viabilidad.

El análisis filogenético indicó que los principales *phylum* encontrados en los ensayos de transformación de roxarsona en condiciones anaeróbicas fueron: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* y *Spirochaetes*

## Referencias

- ATSDR (2007) *Toxicological profile for arsenic. Draft for Public Comment*. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Available at URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.html>. Last accessed 1.14.08
- ARAYA, R.; LEIVA, J. C.; VALDES, J. (2008) *Caracterización molecular de las comunidades bacterianas asociadas a sedimentos de un sistema costero del norte de la corriente de Humboldt, bahía de Mejillones del Sur, Chile*. Rev. biol. mar. oceanogr. vol.43, n.3
- Brinkhoff T, C.M.; Santegoeds, K.; Sahm, J.; Kuever G.M. (1998) *A poyphasic approach to study the diversity and vertical distribution of sulfur-oxidizing thiomicrospira species in coastal sediments of the german Wadden sea*. Applied and Environmental Microbiology 64: 4650-4657.
- Chen C.J, Chen C.W., Wu, M. M., Kuo, T.L. (1992) *Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water*. Br J Cancer 66:888-92.
- Chen, Y.; Factor-Litvak, P.; Howe, G.R.; Graziano, J.H.; Brandt-Rauf, P.; Parvez F. (2007) *Arsenic exposure from drinking water, dietary intakes of B vitamins and folate, and risk of high blood pressure in Bangladesh: a population-based, cross-sectional study*. American Journal of Epidemiology 165:541-552.
- Clarke K.; Gorley, R. (2001) PRIMER v5: user manual/tutorial PRIMER-E. Plymouth, UK
- Garbarino J.R., Bednar A.J., Rutherford D.W., Beyer R.S.; Wershaw R.L. (2003) *Environmental fate of Roxarsona in poultry litter*. I. Degradation of Roxarsona during composting. Environ. Sci. Technol. 37:1509-1514.
- Muyzer, G.; Waal, E.C.; Uitterlinden A.G. (1993) *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology 59: 695-700.
- Pielou, E.C. (1975) *Ecological Diversity*. John Wiley and Sons. New York, pp 165.
- Yao, S. (2011) *Pfizer will voluntarily suspend sale of animal drug 3-Nitro Media Inquiries*.
- Stolz, J.F., Oremland, R.S. (1999) Bacterial respiration of arsenic and selenium oxyanions. ASM Conference on Microbial Biodiversity, Chicago, August 5-8.
- Stolz, J.F.; Perera, E.; Kilonzo, B.; Kail, B.; Crable, B.; Fisher, E. (2007) *Biotransformation of 3-nitro-4-hydroxybenzene arsonic acid (roxarsona) and release of inorganic arsenic by Clostridium species*. Environmental Science & Technology 41:818-823.
- Suárez Solá, M.L.; González-Delgado, F.J.; González Weller, D.; Rubio Armendáriz, C.; Hardisson de la Torre, A. (2004) *Análisis, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones arsenicales*. Cuadernos de Medicina Forense (35), 05-14. Recuperado en 19 de septiembre de 2017, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-76062004000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-76062004000100001&lng=es&tlng=es).
- Valdes, J.D.; Roman, G.; Álvarez, L.; Ortlieb Guinez, M. (2008) *Metals content in surface waters of an upwelling system of the northern Humboldt Current (Mejillones Bay, Chile)*. Journal of Marine Systems 71: 18-30.