

# Bioprospecting arsenite oxidizing bacteria in the soil of the Comarca Lagunera

Bioprospección de bacterias oxidantes de arsenito de suelo de la Comarca Lagunera

Edelweiss A. Rangel-Montoya; Nagamani Balagurusamy\*.

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón.  
Ciudad Universitaria, carretera Torreón-Matamoros, km 7.5. C. P. 27000. Torreón, Coahuila, MÉXICO.  
Correo-e: bnagamani@uadec.edu.mx, tel.: (871) 757 1785 (\*Autor para correspondencia).

## Abstract

Arsenic is one of the most toxic metalloids present in the environment and prolonged exposure to this metal causes chronic health effects. Therefore, the search for environmentally-friendly alternatives for the treatment of arsenic-contaminated water and soil is important. In this study, bacterial strains were isolated from arsenic-containing soils in the Lagunera region to analyze those with arsenite-oxidizing ability. Strains 04-SP1qa and 14-SP1qh with chemolithoautotrophic and chemoheterotrophic metabolism, respectively, had greater activity of the arsenite oxidase enzyme. The optimum growth conditions and enzymatic activity of these strains were investigated. Strain 04-SP1qa had specific enzymatic activity of  $0.162 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) of  $3.37 \mu\text{M}$  and maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) of  $5.20 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  under optimum growth conditions of pH 8.0 at  $40^\circ\text{C}$ . Strain 14-SP1qh showed specific enzymatic activity of  $0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,  $K_m$  of  $3.70 \mu\text{M}$  and  $V_{\text{max}}$  of  $14.39 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  at pH 7.0 and  $40^\circ\text{C}$ . Results of this study demonstrated the presence of arsenite-oxidizing bacteria with enzymatic activity in the soils of the Lagunera region. Thus, the potential exists to develop new bioremediation technologies for treatment of arsenic-contaminated water and soils in the region using native bacterial strains.

**Keywords:** Arsenite oxidase, chemolithoautotrophic, chemoheterotrophic, bioremediation.

## Resumen

El arsénico es uno de los metaloides más tóxicos presente en el ambiente y la exposición prolongada a este metal causa efectos crónicos en la salud. Por ello, la búsqueda de alternativas amigables con el medio ambiente, para el tratamiento de agua y suelos contaminados con arsénico es importante. En este trabajo se aislaron cepas bacterianas de suelos con presencia de arsénico en la Comarca Lagunera, para analizar aquellas con capacidad oxidante de arsenito. Las cepas 04-SP1qa y 14-SP1qh de metabolismo quimiolitoautotrófico y quimioheterotrófico, respectivamente, tuvieron mayor actividad de la enzima arsenito oxidasa. Las condiciones óptimas de crecimiento y la actividad enzimática de dichas cepas se investigaron. La cepa 04-SP1qa presentó actividad enzimática específica de  $0.162 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de  $3.37 \mu\text{M}$  y velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) de  $5.20 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en condiciones óptimas de pH 8.0 y  $40^\circ\text{C}$ . La cepa 14-SP1qh presentó actividad enzimática específica de  $0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,  $K_m$  de  $3.70 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{max}}$  de  $14.39 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  a pH 7.0 y  $40^\circ\text{C}$ . Los resultados demostraron la presencia de bacterias oxidantes de arsenito con actividad enzimática en suelos de la Comarca Lagunera, identificando potencial para desarrollar nuevas tecnologías de biorremediación de aguas y suelos contaminados con arsénico en la región.

**Palabras clave:** Arsenito oxidasa, quimiolitoautotrófico, quimioheterotrófico, biorremediación.

## Introduction

Arsenic (As) is present in the atmosphere, soil, rocks, water bodies, minerals and organisms. The element is found naturally in the environment and is unevenly distributed throughout the world depending on geographical region, geochemical soil characteristics and industrial activity. This metalloid occurs in different oxidation states: arsenate As (V), arsenite As (III), elemental As (0) and arsenide As (-III) (Tsai, Singh, & Chen, 2009). Arsenite is more toxic than arsenate, which is poorly soluble in water and is therefore less bioavailable (Valenzuela, Campos, Yañez, Zarror, & Mondaca, 2009). When there is a greater natural geological presence of arsenic, it is possible to find high levels of the element in groundwater, as is the case with Bangladesh, India, China, Taiwan, Mongolia, Chile, Argentina, Mexico and many places in the United States (Anawar et al., 2003; Campos, Valenzuela, Alcorta, Escalante, & Mondaca, 2007).

In Mexico, the highest arsenic concentrations are found in the Lagunera region in the states of Coahuila and Durango, where concentrations of 0.007-0.740 mg·liter<sup>-1</sup> in agricultural wells and up to 30 µg·g<sup>-1</sup> in soil have been reported (Rosas, Belmont, Armienta, & Baez, 1999). As is mainly held in silt and clay fractions; the soil of the Comarca Lagunera mainly consists of clay with low organic matter content and alkaline pH (> 8.0) (Cebrián, Albores, García-Vargas, & Del Razo, 1994; Del Razo et al., 1994; Rosas et al., 1999). The presence of As in the Comarca Lagunera is mainly due to the geological characteristics of the area. It has been reported that the mobilization of As and high values of this element in groundwater are a product of the dissolution reactions of Fe oxides and desorption due to high pH values (SICYGSA, 2000).

The presence of As causes adverse health effects. The problem of chronic endemic regional hydroarsenicism (CERHA), a disease caused by drinking water contaminated with As, is present in the region. In 1958 the first As poisoning was reported and since then there have been reports of cases due to endemic pollution (Cebrián et al., 1994; Del Razo et al., 1994). There are various treatments for removal of As from water, based on chemical methods that generally require a prior oxidation step to transform the As (III) to As (V), which is usually done using oxygen, ozone, hypochlorite, chlorine, permanganate, hydrogen peroxide and UV radiation. However, these chemical processes can lead to the formation of harmful by-products that are difficult to remove from water. Alternatively, this step can be replaced by biological oxidation using microorganisms due to their high resistance and tolerance to inorganic forms of As and the ability they may have to transform it (Ghurye & Clifford, 2001). Microorganisms transform As (V) to As (III) through three enzyme systems: arsenite oxidase, arsenate reductase and cytoplasmic arsenate

## Introducción

El arsénico (As) está presente en la atmósfera, suelo, rocas, cuerpos de agua, minerales y organismos. El elemento se encuentra de manera natural en el medio ambiente y está distribuido de manera no uniforme por todo el mundo dependiendo de la región geográfica, características geoquímicas del suelo y actividad industrial. Dicho metaloide se encuentra en diferentes estados de oxidación: arseniato As (V), arsenito As (III), elemental As (0) y arseniuro As (-III) (Tsai, Singh, & Chen, 2009). El arsenito es más tóxico que el arseniato, el cual es poco soluble en agua y, por tanto, menos biodisponible (Valenzuela, Campos, Yañez, Zarror, & Mondaca, 2009). Cuando hay mayor presencia geológica natural de arsénico es posible encontrar niveles altos del elemento en aguas subterráneas como es el caso de Bangladesh, India, China, Taiwán, Mongolia, Chile, Argentina, México y numerosos lugares de Estados Unidos de Norteamérica (Anawar et al., 2003; Campos, Valenzuela, Alcorta, Escalante, & Mondaca, 2007).

En México, las mayores concentraciones de arsénico se encuentran en la región de la Comarca Lagunera en los estados de Coahuila y Durango, reportándose concentraciones de 0.007 a 0.740 mg·litro<sup>-1</sup> en pozos agrícolas y hasta 30 µg·g<sup>-1</sup> en el suelo (Rosas, Belmont, Armienta, & Baez, 1999). El As está retenido principalmente en las fracciones de limo y arcilla; el suelo de la Comarca Lagunera está constituido principalmente de arcilla con bajo contenido de materia orgánica y pH alcalino (> 8.0) (Cebrián, Albores, García-Vargas, & Del Razo, 1994; Del Razo et al., 1994; Rosas et al., 1999). La presencia de As en la Comarca Lagunera se debe principalmente a las características geológicas del área. Se ha reportado que la movilización del As y los valores altos de este elemento en el agua subterránea son producto de las reacciones de disolución de óxidos de Fe y desorción debido a los valores altos de pH (SICYGSA, 2000).

La presencia de As provoca efectos nocivos para la salud. En la región existe el problema de hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), una enfermedad producida por el consumo de aguas contaminadas con As. En 1958 se reportó la primera intoxicación por As y desde entonces se habla de casos por contaminación endémica (Cebrián et al., 1994; Del Razo et al., 1994). Existen diversos tratamientos para la remoción de As del agua, basados en métodos químicos que generalmente necesitan de un paso previo de oxidación para transformar el As (III) a As (V), el cual se hace generalmente utilizando oxígeno, ozono, hipoclorito, cloro, permanganato, peróxido de hidrógeno y radiación UV. No obstante, dichos procesos químicos pueden dar lugar a la formación de subproductos perjudiciales que son difíciles de eliminar del agua. Como alternativa, dicha etapa puede sustituirse por una oxidación

reductase (Silver & Phung, 2005). In 1918, Green first described the oxidation of arsenite by bacteria, which are largely heterotrophic organisms; however, some chemolithoautotrophic bacteria can also use As (III) as an electron donor and obtain energy from oxidizing it (Green, 1918; Santini, Sly, Schnagl, & Macy, 2000). The mechanism of oxidation of As involves genes *aioA* and *aioB* (Lett, Muller, Lièvremont, Silver, & Santini, 2012) encoding for the large catalytic molybdopterin subunit and the small Rieske subunit of the arsenite oxidase AioAB, which has a molecular mass of about 100 kDa (Ellis, Conrads, Hille, & Kuhn, 2001; Van Lis et al., 2012).

In 1992 an enzyme capable of oxidizing arsenite was purified from the  $\beta$  proteobacteria *Alcaligenes faecalis*. The expression of this enzyme called arsenite oxidase was induced by the presence of As (III) in the growth medium (Anderson, Williams, & Hille, 1992; Lebrun et al., 2003). In this context, and because the presence of As in water has a negative impact on human health, the aim of this work was to study the ability of the bacteria isolated from the region to transform As (III) to As (V). The use of microorganisms, as an alternative in the remediation of As in soil and water, can be developed as a treatment technology that does not lead to secondary pollution.

## Materials and methods

### Isolation and selection of arsenite-oxidizing bacteria

Soil samples from the Lagunera region were collected at sites previously reported by Rosas et al. (1999) to have high As concentrations: Ejido San Rafael el de Arriba (SR1), Carretera San Pedro-Torreón, Mirador neighborhood (SP1), San Pedro de las Colonias (SP2), located at coordinates 25° 45' 32" N - 102° 59' 04" W; and in the Obrera Francisco I. Madero neighborhood (FM1), located at 25° 46' 31" N - 103° 16' 23" W. Sampling was done randomly at a soil depth of 5-10 cm. Each sample was diluted from  $10^1$  to  $10^{-4}$  in 0.85 % saline solution. Bacteria were isolated by the spread-plate seeding technique in agar plates with minimal salts (MS) medium supplemented with sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ; 5 mM). The plates were incubated at  $35 \pm 2$  °C for 48-72 h. MS medium supplemented with 5 mM arsenite (As-MS) was used for isolation of chemolithoautotrophic bacteria, according to Santini et al. (2000). Chemolithoautotrophic bacteria were isolated with MS-As medium supplemented with 0.1 % glucose.

Arsenic-tolerant bacteria and their ability to oxidize As (III) to As (V) or reduce As (V) to As (III) were verified using the  $\text{AgNO}_3$  method described by Simeonova et al. (2004). Isolated strains grew in 50 mL of MS medium without arsenite in the dark for 72 h at  $30 \pm 2$  °C and 200 rpm. Subsequently, the cultures were centrifuged

biológica mediante la utilización de microorganismos debido a su alta resistencia y tolerancia hacia las formas inorgánicas del As y a la capacidad que pueden tener para transformarlo (Ghurye & Clifford, 2001). Los microorganismos transforman el As (V) a As (III) a través de tres sistemas enzimáticos: arsenito oxidasa, arseniato reductasa y arseniato reductasa citoplasmática (Silver & Phung, 2005). En 1918, Green describió por primera vez la oxidación del arsenito por bacterias, las cuales son en su mayoría organismos heterotróficos; no obstante, algunas quimiolitoautotróficas pueden utilizar también el As (III) como un donador de electrones y obtener energía de la oxidación de éste (Green, 1918; Santini, Sly, Schnagl, & Macy, 2000). El mecanismo de oxidación del As involucra a los genes *aioA* y *aioB* (Lett, Muller, Lièvremont, Silver, & Santini, 2012) que codifican para la subunidad grande catalítica molibdopterina y la subunidad pequeña tipo Rieske de la enzima arsenito oxidasa AioAB, la cual tiene una masa molecular aproximadamente de 100 kDa (Ellis, Conrads, Hille, & Kuhn, 2001; Van Lis et al., 2012).

En 1992 fue purificada una enzima capaz de oxidar arsenito a partir de la  $\beta$  proteobacteria *Alcaligenes faecalis*. La expresión de esta enzima llamada arsenito oxidasa fue inducida por la presencia de As (III) en el medio de crecimiento (Anderson, Williams, & Hille, 1992; Lebrun et al., 2003). En tal contexto, y debido a que la presencia de As en el agua tiene impacto negativo en la salud humana, el objetivo de este trabajo fue estudiar bacterias aisladas de la región que mostraran capacidad de transformar As (III) a As (V). El uso de microorganismos, como alternativa en la remediación de As en suelo y agua, puede desarrollarse como una tecnología de tratamiento que no conduce a la contaminación secundaria.

## Materiales y métodos

### Aislamiento y selección de bacterias oxidantes de arsenito

Las muestras de suelo de la Comarca Lagunera se colectaron en sitios reportados con altas concentraciones de As por Rosas et al. (1999): Ejido San Rafael el de Arriba (SR1), Carretera San Pedro-Torreón colonia Mirador (SP1), San Pedro de las Colonias (SP2), ubicados en las coordenadas 25° 45' 32" N - 102° 59' 04" O; y en colonia Obrera Francisco I. Madero (FM1), localizada en 25° 46' 31" N - 103° 16' 23" O. El muestreo se hizo aleatoriamente a una profundidad de 5 a 10 cm del suelo. Cada muestra se diluyó de  $10^1$  a  $10^{-4}$  en solución salina al 0.85 %. Las bacterias se aislaron mediante la técnica de sembrado por extensión en placa en agar de medio mínimo de sales (MS) enriquecido con arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$ ; 5 mM). Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 48 a 72 h. El medio MS enriquecido con arsenito 5 mM (MS-As) se utilizó para el aislamiento

at 10,000 rpm for 15 min and washed three times with sterile distilled water. The pellet obtained was suspended in 1.5 mL of sterile distilled water. Then 20  $\mu$ L of the cell suspension were added to the bottom of a well in a MS-As agar plate with 80  $\mu$ L of Tris-HCl 0.2 M buffer (pH 7.4). The inoculated plates were incubated at  $30 \pm 2$  °C for 48-72 h. Finally, the color reaction was performed by adding 100  $\mu$ L of  $\text{AgNO}_3$  (0.1 M) in each of the wells. This test involves the reaction of  $\text{AgNO}_3$  with the As (III) or As (V) present in the medium with Tris-HCl. This reaction forms a brown precipitate which indicates the presence of As (V), whereas a yellow precipitate indicates the presence of As (III).

### Growth kinetics of arsenite-oxidizing strains

The growth of the strains was measured by optical density at 600 nm in a Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis spectrophotometer (USA) to determine the exponential phase of each strain. Growth was also measured through quantification of cellular protein using the Coomassie Blue method (Bradford, 1976).

### Determination of the enzymatic activity of the arsenite oxidase enzyme

**Cell-free extract.** Extraction of the arsenite oxidase enzyme was performed according to the method described by Anderson et al. (1992). Selected strains grew in 50 mL of MS medium with  $\text{NaAsO}_2$  (5 mM) for 24 h at  $30 \pm 2$  °C and 200 rpm. Subsequently, the cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C. The formed pellet was washed three times with Tris-HCl buffer (20 mM), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 0.6 mM), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM) and NaCl (0.9 %) at pH 8.4, centrifuged after each wash at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The final pellet was suspended in 100  $\mu$ L of buffer containing Tris-HCl (20 mM), EDTA (0.6 mM) and PMSF (0.1 mM), adding  $\text{MgSO}_4$  (20 mM) and  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (100 mM). The cell suspension was sonicated with a Vibra-Cell™ VCX-130 ultrasonic processor (USA). Sonication conditions were previously evaluated for each strain to determine the best: five 2.5-min cycles with 5-min cooling intervals between each cycle for chemoheterotrophic strains; and two 2.5-min cycles with 5-min cooling intervals for the chemolithoautotrophic strains. The broken cell suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The cytosolic fraction was collected in a fresh tube and the membrane fraction was resuspended in 500  $\mu$ L of suspension buffer. Enzymatic activity was measured in the whole-cell and membrane fraction suspensions.

**Enzymatic assay.** The assay was based on the reduction of DCPIP (2,6-dichlorophenol indophenol), an artificial electron acceptor, in Tris-HCl buffer at pH 7.0. The kinetics of the crude extract was determined by adding

de bacterias quimiolitioautotróficas, de acuerdo con Santini et al. (2000). Las bacterias quimioheterotróficas se aislaron con el medio MS-As enriquecido con 0.1 % de glucosa.

Las bacterias tolerantes al arsénico y su habilidad para oxidar As (III) a As (V) o reducir As (V) a As (III) se verificaron mediante el método  $\text{AgNO}_3$  descrito por Simeonova et al. (2004). Las cepas aisladas crecieron en 50 mL de medio MS sin arsenito en la oscuridad durante 72 h a  $30 \pm 2$  °C y a 200 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. El pellet obtenido se suspendió en 1.5 mL de agua destilada estéril. Después, 20  $\mu$ L de la suspensión de células se agregaron al fondo de un pocillo en una placa de agar MS-As con 80  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 0.2 M (pH 7.4). Las placas inoculadas se incubaron a  $30 \pm 2$  °C durante 48 a 72 h. Finalmente, la reacción de color se llevó a cabo mediante la adición de 100  $\mu$ L de  $\text{AgNO}_3$  (0.1 M) en cada uno de los pocillos. Esta prueba consiste en la reacción del  $\text{AgNO}_3$  con el As (III) o As (V) presentes en el medio con Tris-HCl. En esta reacción se forma un precipitado de color marrón que indica la presencia de As (V), mientras que un precipitado de color amarillo indica la presencia de As (III).

### Cinéticas de crecimiento de las cepas oxidantes de arsenito

El crecimiento de las cepas se midió por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis Thermo Scientific., EE. UU), para determinar la fase exponencial de cada cepa. El crecimiento también se midió a través de la cuantificación de proteína celular usando el método azul de Coomassie (Bradford, 1976).

### Determinación de la actividad enzimática de la enzima arsenito oxidasa

**Extracto libre celular.** La extracción de la enzima arsenito oxidasa se realizó de acuerdo con el método descrito por Anderson et al. (1992). Las cepas seleccionadas crecieron en 50 mL de medio MS con  $\text{NaAsO}_2$  (5 mM) durante 24 h a  $30 \pm 2$  °C a 200 rpm. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min a 4 °C. El pellet formado se lavó tres veces con buffer Tris-HCl (20 mM), EDTA (ácido etilendiaminotetracético, 0.6 mM), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0.1 mM) y NaCl (0.9 %) a pH 8.4, centrifugando después de cada lavado a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet final se suspendió en 100  $\mu$ L de buffer que contenía Tris-HCl (20 mM), EDTA (0.6 mM) y PMSF (0.1 mM), añadiendo  $\text{MgSO}_4$  (20 mM) y  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  (100 mM). La suspensión de células se sonicó con un Ultrasonic Processors Vibra-Cell VCX-130 (EE. UU). Las condiciones de sonicación fueron evaluadas previamente para cada cepa hasta



the arsenite oxidase enzyme to 1 mL of reaction buffer at pH 7.0 reaction, which contained DCPIP (60  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NaAsO}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ) and Tris-HCl (50 mM). Changes in absorbance were monitored at 600 nm in a Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis spectrophotometer (USA) every minute for 5 min (Anderson et al., 1992). One unit of enzymatic activity of arsenite oxidase was defined as the amount of enzyme necessary to reduce 1  $\mu\text{mol}$  of DCPIP $\cdot\text{min}^{-1}$ .

### Determination of optimum growth and enzymatic activity conditions

Growth and enzymatic activity of the selected strains were evaluated in various concentrations of As (5, 10, 20 and 30 mM), temperatures (25, 30, 40 and 55 °C) and pH conditions (6.0, 7.0, 8.0, 9.0). The effect of temperature was evaluated by incubating the enzyme extract at different temperatures for 1 h; the extract was added to the reaction buffer, which was also previously incubated for 5 min. The enzymatic activity of the arsenite oxidase was measured by adding different concentrations (100, 150 and 200  $\mu\text{L}$ ) of the enzyme (crude extract and whole-cell) in the reaction buffer. Each parameter was evaluated separately.

### Determination of kinetic parameters ( $V_{\text{max}}$ and $K_m$ ) of the arsenite oxidase enzyme

The kinetic parameters of maximum velocity ( $V_{\text{max}}$ ) and the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) were determined using the Hanes-Woolf equation since it is the most advisable linearization for data obtained at equidistant substrate increases:

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}$$

Where:

[S] = Substrate concentration ( $\mu\text{M}$ )

$V_0$  = Reaction velocity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )

$K_m$  = Michaelis-Menten constant ( $\mu\text{M}$ )

$V_{\text{max}}$  = Maximum velocity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )

The initial velocity of the enzyme was determined under different concentrations of arsenite (25, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$ ). From the Hanes-Woolf equation,  $V_{\text{max}}$  was calculated with the inverse of the slope and the  $K_m$  of the intercept to the origin multiplied by the  $V_{\text{max}}$  obtained.

### Statistical analysis

The experiments in this study were performed in duplicate. The results of the enzymatic activity of the bacterial strains and the difference in the activity of whole cells and cell-free extract (membrane fraction)

determinar las mejores: cinco ciclos de 2.5 min con intervalos de enfriamiento de 5 min entre cada ciclo para las cepas quimioheterotróficas; y dos ciclos de 2.5 min con intervalos de 5 min de enfriamiento para las cepas quimiolitoautotróficas. La suspensión de células rotas se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C. La fracción citosólica fue colectada en un tubo nuevo y la fracción membranal fue resuspendida en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de suspensión. La actividad enzimática fue medida en la suspensión de células completas y de la fracción membranal.

**Ensayo enzimático.** El ensayo se fundamentó en la reducción de DCPIP (2,6-diclorofenol indofenol), un aceptor de electrones artificial, en buffer Tris-HCl a pH 7.0. La cinética del extracto crudo se determinó mediante la adición de la enzima arsenito oxidasa a 1 mL del buffer de reacción a pH 7.0, el cual contenía DCPIP (60  $\mu\text{M}$ ),  $\text{NaAsO}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ) y Tris-HCl (50 mM). Los cambios en absorbancia se monitorearon a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Vis Thermo Scientific., EE. UU) cada minuto durante 5 min (Anderson et al., 1992). Una unidad de actividad enzimática de la arsenito oxidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1  $\mu\text{mol}$  de DCPIP $\cdot\text{min}^{-1}$ .

### Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento y actividad enzimática

El crecimiento y la actividad enzimática de las cepas seleccionadas se evaluaron en diferentes concentraciones de As (5, 10, 20 y 30 mM), temperatura (25, 30, 40 y 55 °C) y condiciones de pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0). El efecto de la temperatura se evaluó incubando el extracto enzimático a las diferentes temperaturas durante 1 h; el extracto se adicionó en el buffer de reacción, el cual también fue incubado previamente por 5 min. La actividad enzimática de la arsenito oxidasa se midió agregando diferentes concentraciones (100, 150 y 200  $\mu\text{L}$ ) de la enzima (extracto crudo y célula completa) en el buffer de reacción. Cada parámetro se evaluó por separado.

### Determinación de parámetros cinéticos ( $V_{\text{max}}$ y $K_m$ ) de la enzima arsenito oxidasa

Los parámetros cinéticos de velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) y la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) se determinaron con la ecuación de Hanes-Woolf, ya que es la linearización más recomendable para datos obtenidos a incrementos equidistantes de sustrato:

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} + \frac{[S]}{V_{\text{max}}}$$

Donde:

[S] = Concentración de sustrato ( $\mu\text{M}$ )

were analyzed by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ) using Statgraphics Plus, version 5.1 (1992).

## Results and discussion

### Isolation and selection of arsenite-oxidizing bacteria

Twenty-five strains, of which 13 were chemolithoautotrophic bacteria and 12 chemoheterotrophic bacteria, were isolated. Of the isolated strains, those capable of transforming arsenic ions by the  $\text{AgNO}_3$  test were selected (Simeonova et al., 2004). Of the 13 chemolithoautotrophic strains, only three were positive to the oxidation of As (III) to As (V), whereas 12 chemoheterotrophic strains were positive. Table 1 shows the 15 strains selected for their ability to transform arsenic ions.

$V_o$  = Velocidad de reacción ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )

$K_m$  = Constante de Michaelis-Menten ( $\mu\text{M}$ )

$V_{max}$  = Velocidad máxima ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )

La velocidad inicial de la enzima se determinó bajo diferentes concentraciones de arsenito (25, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ). A partir de la ecuación de Hanes-Woolf se calculó la  $V_{max}$  con el inverso de la pendiente y la  $K_m$  de la ordenada al origen multiplicada por la  $V_{max}$  obtenida.

### Análisis estadístico

Los experimentos de este estudio se realizaron por duplicado. Los resultados de la actividad enzimática de las cepas bacterianas y la diferencia de la actividad de células completas y extracto libre celular (fracción membranal) fueron analizados mediante ANOVA y

**Table 1. Bacteria isolated from the soil of the Comarca Lagunera capable of transforming arsenite by the  $\text{AgNO}_3$  test. Cuadro 1. Bacterias aisladas del suelo de la Comarca Lagunera con capacidad de transformar arsenito mediante la prueba  $\text{AgNO}_3$ .**

Strain/Cepa	Metabolism/Metabolismo	Oxidation of As III/Oxidación de As III
01-SP1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
02-SP1 qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
03-SP1 qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
04-SP1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	+
05-SP2qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	+
06-SP2qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
07-SP2qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
08-FM1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
09-FM1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
10-FM1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
11-SR1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
12-SR1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	+
13-SR1qa	Chemolithoautotrophic/Quimiolitoautotrófico	-
14-SP1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
15-SP1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
16-SP1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
17-SP2qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
18-SP2qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
19-SR1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
20-SR1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
21-SR1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
22-FM1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
23-FM1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
24-FM1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+
25-SP1qh	Chemoheterotrophic/Quimioheterotrófico	+

Presence (+) or absence (-) of arsenite to arsenate transformation activity.

Presencia (+) o ausencia (-) de actividad de transformación de arsenito a arseniato.

## Growth kinetics of arsenite-oxidizing strains

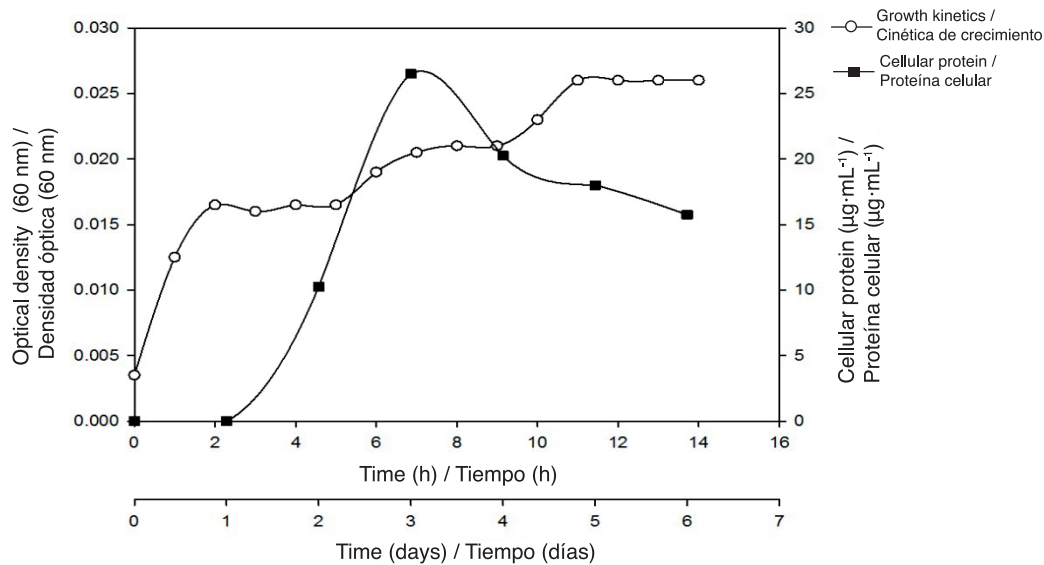
According to the growth kinetics, the growth rate of the chemolithoautotrophic strain SP1qa-04 was  $0.016 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ , presenting more stable growth than strains 05-SP2qa and 12-SR1qa. Figure 1 shows the growth rate and protein quantification of strain 04-SP1qa. The generation time was 18.29 h, so that the protein was quantified for seven days; the greatest amount of cellular protein was generated on day three.

prueba de rangos múltiples por el método de Duncan ( $P < 0.05$ ) usando Statgraphics Plus, versión 5.1 (1992).

## Resultados y discusión

### Aislamiento y selección de bacterias oxidantes de arsenito

Se aislaron 25 cepas de las cuales 13 fueron bacterias quimiolitotróficas y 12 bacterias



**Figure 1. Growth kinetics (hours of evaluation, optical density 600 nm) and protein quantification (days of evaluation) of chemolithoautotrophic strain 04-SP1qa in MS-As medium (minimal salts agar medium supplemented with  $\text{NaAsO}_2$ ) at  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .**

**Figura 1. Cinética de crecimiento (horas de evaluación, densidad óptica 600 nm) y cuantificación de proteína (días de evaluación) de la cepa quimiolitotrófica 04-SP1qa en medio MS-As (agar de medio mínimo de sales enriquecido con  $\text{NaAsO}_2$ ) a  $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .**

Figure 2 shows the growth kinetics and protein quantification of the 12 chemoheterotrophic strains. Strain 21-SR1qh had the lowest generation time (2.16 h) with a growth rate of  $0.139 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ , while strain 24-FM1qh had the highest generation time (6 h) with a rate of  $0.115 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  (Figure 2A). Regarding cellular protein quantification, the maximum amount of protein was recorded around hour 20 of growth in the 12 strains (Figure 2B).

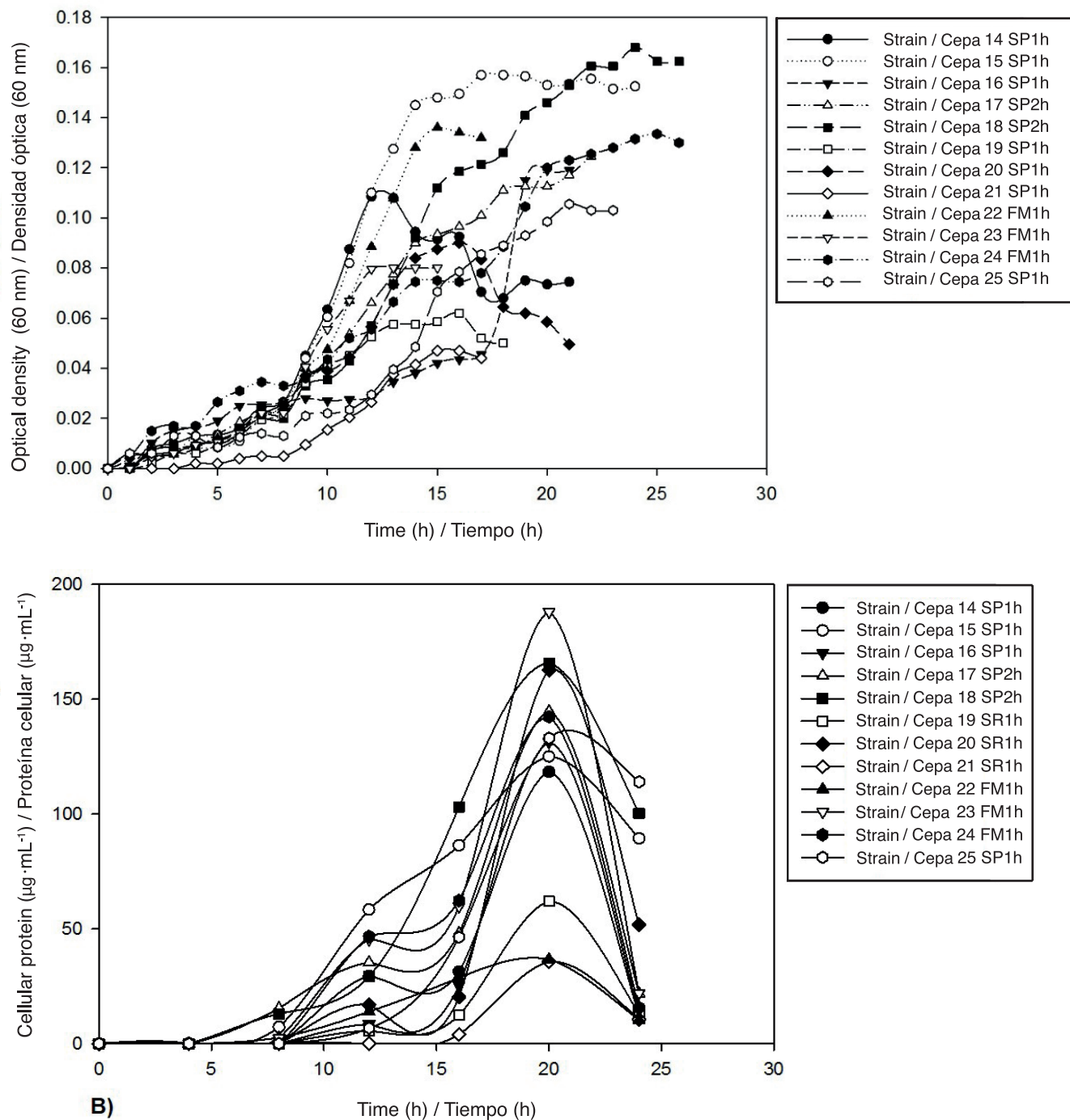
### Arsenite oxidase: Enzymatic activity and location

The enzymatic activity of the 12 strains with chemoheterotrophic metabolism and the strain with chemolithoautotrophic metabolism was measured in the membrane fraction and whole cell under conditions of pH 7.0, at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  in MS-As medium, in order to select the highest specific enzymatic activity.

quimioheterotróficas. De las cepas aisladas se seleccionaron aquellas con capacidad de transformar los iones de arsénico mediante la prueba de  $\text{AgNO}_3$  (Simeonova et al., 2004). De las 13 cepas quimiolitotróficas solamente tres fueron positivas a la oxidación de As (III) a As (V), mientras que las 12 cepas quimioheterotróficas fueron positivas. El Cuadro 1 presenta las 15 cepas seleccionadas por su capacidad para transformar los iones de arsénico.

### Cinéticas de crecimiento de las cepas oxidantes de arsenito

De acuerdo con las cinéticas de crecimiento, la velocidad de crecimiento de la cepa quimiolitotrófica 04-SP1qa fue  $0.016 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ , presentando crecimiento más estable con respecto a las cepas 05-SP2qa y 12-SR1qa. La Figura 1 muestra la velocidad de crecimiento y



**Figure 2. Growth kinetics (A) and protein quantification (B) of chemoheterotrophic strains in MS-As medium (minimal salts agar medium supplemented with NaAsO<sub>2</sub>) at 37 ± 2 °C.**

**Figura 2. Cinética de crecimiento (A) y cuantificación de proteína (B) de cepas quimioheterotróficas en medio MS-As (agar de medio mínimo de sales enriquecido con NaAsO<sub>2</sub>) a 37 ± 2 °C.**



The selected strains were 04-SP1qa and 14-SP1qh; strain 04 SP1qa had enzymatic activity of  $0.088 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the membrane fraction and  $0.078 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the whole cell, while strain 14-SP1qh had activity of  $0.06 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  and  $0.035 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the membrane fraction and whole cell respectively. Based on the above, the enzyme is bound to the membrane since it was in this fraction where it showed greater activity; however, no significant difference ( $P < 0.05$ ) between whole cells and the membrane fraction was observed. Table 2

la cuantificación de proteína de la cepa 04-SP1qa. El tiempo de generación fue 18.29 h, por lo que la proteína se cuantificó durante siete días; la mayor cantidad de proteína celular se generó el día tres.

La Figura 2 presenta la cinética de crecimiento y cuantificación de proteína de las 12 cepas quimioheterotróficas. La cepa 21-SR1qh presentó el menor tiempo de generación (2.16 h) con velocidad de crecimiento de  $0.139 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ , mientras que la cepa

**Table 2. Specific enzymatic activity of arsenite-oxidizing strains.**

**Cuadro 2. Actividad enzimática específica de las cepas oxidantes de arsenito.**

Strain/Cepa	Specific enzymatic activity ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) in the membrane fraction/ Actividad enzimática específica ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en la fracción membranal	Specific enzymatic activity ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) in the whole cell/ Actividad enzimática específica ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) en la célula completa
04-SP1qa	0.088	0.078
14-SP1qh	0.060	0.035
15-SP1qh	0.046	0.034
16-SP1qh	0.050	0.030
17-SP2qh	0.006	0.008
18-SP2qh	0.047	0.032
19-SR1qh	0.003	0.005
20-SR1qh	0.040	0.031
21-SR1qh	0.036	0.012
22-FM1qh	0.030	0.022
23-FM1qh	0.033	0.023
24-FM1qh	0.030	0.017
25-SP1qh	0.005	0.004

There was no statistically significant difference between the specific enzymatic activity of the membrane fraction and whole cell ( $P < 0.05$ ).

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la actividad enzimática específica de la fracción membranal y la célula completa ( $P < 0.05$ ).

reports the specific enzymatic activity of the 13 strains evaluated.

24-FM1qh presentó el mayor tiempo de generación (6 h) con velocidad de  $0.115 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  (Figura 2A). Respecto a la cuantificación de proteína celular, la máxima cantidad de proteína se registró alrededor de la hora 20 de crecimiento en las 12 cepas (Figura 2B).

### Optimum conditions for growth of bacterial strains and enzymatic activity of arsenite oxidase

### Arsenito oxidasa: Actividad enzimática y localización

**Effect of temperature and arsenite on growth.** The growth of selected strains 04-SP1qa and 14-SP1qh was evaluated under different arsenite concentrations and temperatures. Optimum growth conditions for strain 04-SP1qa were  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $10 \text{ mM}$  arsenite, adding  $0.04 \%$  yeast extract to stimulate the growth rate according to Santini et al. (2000). On the other hand, strain 14-SP1qh required a temperature of  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  at  $10 \text{ mM}$  arsenite. In both strains, growth was inhibited at  $30 \text{ mM}$  arsenite.

La actividad enzimática de las 12 cepas con metabolismo quimioheterotrófico y la cepa con metabolismo quimioautotrófico se midió en la fracción membranal y en la célula completa bajo condiciones de  $\text{pH } 7.0$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en medio MS-As, con el fin de seleccionar las de mayor actividad enzimática específica. Las cepas seleccionadas fueron 04-SP1qa y 14-SP1qh; la cepa 04 SP1qa presentó actividad enzimática de  $0.088 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en la fracción membranal y  $0.078 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en la célula completa, mientras que la cepa 14-SP1qh tuvo actividad de  $0.06 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  y  $0.035 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en la fracción membranal y célula completa, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, la enzima se localiza ligada a la membrana pues fue en dicha fracción donde

### Effect of arsenite, enzyme, pH and temperature on enzymatic activity of arsenite oxidase

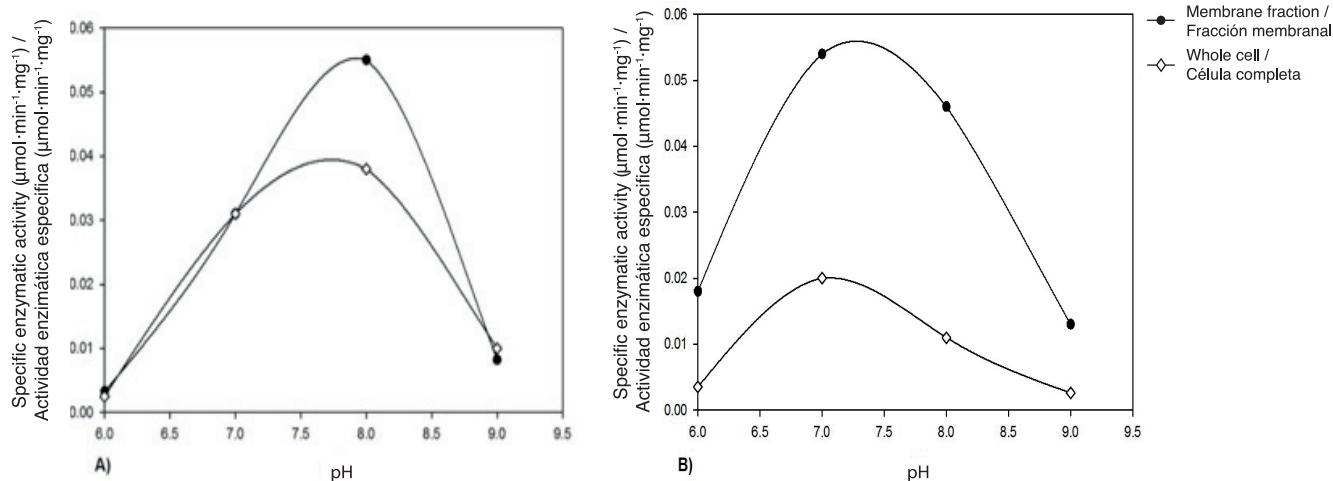
Strains 04-SP1qa and 14-SP1qh were cultured at two arsenite concentrations ( $5 \text{ mM}$  and  $10 \text{ mM}$ ) in order

to determine the concentration which results in greater enzymatic activity, which was 10 mM in both strains. The enzymatic activity of arsenite oxidase was also measured by adding different concentrations of the enzyme (crude extract and whole cell) in the reaction buffer. The greatest arsenite oxidase activity was recorded at the concentration of 100  $\mu$ L in the two strains evaluated. Regarding the effect of pH on the enzymatic activity of arsenite oxidase, it was determined that the optimum pH for strain 04-SP1qa was 8.0 (Figure 3A), and for strain 14-SP1qh it was 7.0 (Figure 3B). Previously, Anderson et al. (1992) evaluated *A. faecalis* and reported optimum pH of 6.0, as did Prasad, Subramanian, and Paul (2009) for a species of *Arthrobacter*. On the other hand, Santini et al. (2000) found that the chemolithoautotrophic strain NT-26, isolated from a gold mine in Australia, had optimum pH of 5.5. The optimum pH levels obtained for the two

mostró mayor actividad; sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre células completas y la fracción membranal. El Cuadro 2 reporta la actividad enzimática específica de las 13 cepas evaluadas.

### Condiciones óptimas de crecimiento de las cepas bacterianas y actividad enzimática de arsenito oxidasa

**Efecto de la temperatura y arsenito en el crecimiento.** El crecimiento de las cepas seleccionadas 04-SP1qa y 14-SP1qh se evaluó bajo diferentes concentraciones de arsenito y temperatura. Las condiciones óptimas de crecimiento para la cepa 04-SP1qa fueron 30 °C a 10 mM de arsenito, agregando extracto de levadura al 0.04 %, para estimular la tasa de crecimiento de acuerdo con Santini et al. (2000). Por



**Figure 3. Effect of pH on specific enzymatic activity of arsenite-oxidizing bacterial strains: A) Strain 04 SP1qa and B) Strain Cepa-14 SP1qh.**

**Figura 3. Efecto del pH en la actividad enzimática específica de las cepas bacterianas oxidantes de arsenito: A) Cepa 04 SP1qa y B) Cepa-14 SP1qh.**

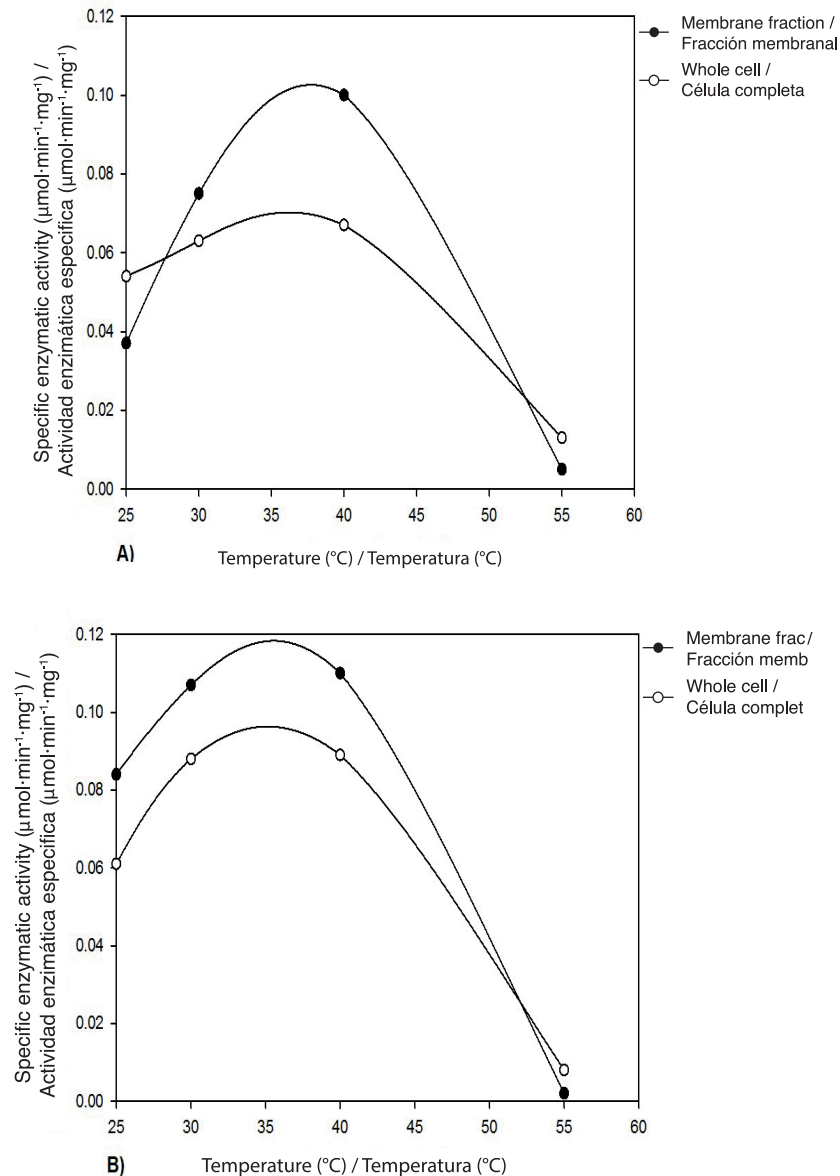
strains isolated in the present study may be due to the alkaline pH (approximately 8.0) present in the soil of the Lagunera region, as has been pointed out by Rosas et al. (1999).

The effect of temperature on enzymatic activity was also evaluated. The optimum temperature for both 04-SP1qa and 14-SP1qh was 40 °C (Figure 4). This temperature is higher than that reported by Anderson et al. (1992) of 25 °C, probably due to the arid climate of the Lagunera region, which leads to the strains having greater resistance to high temperatures.

otra parte, la cepa 14-SP1qh requirió temperatura de 40 °C a 10 mM de arsenito. En ambas cepas el crecimiento fue inhibido a los 30 mM de arsenito.

### Efecto del arsenito, enzima, pH y temperatura sobre la actividad enzimática del arsenito oxidasa

Las cepas 04-SP1qa y 14-SP1qh se cultivaron a dos diferentes concentraciones de arsenito (5 mM y 10 mM), para evaluar la concentración a la cual se presenta mayor actividad enzimática, la cual correspondió a 10 mM en ambas cepas. La actividad enzimática de la arsenito



**Figure 4. Effect of temperature on specific enzymatic activity of arsenite-oxidizing bacterial strains: A) Strain 04-SP1qa and B) Strain 14-SP1qh.**

**Figura 4. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática específica de las cepas bacterianas oxidantes de arsenito: A) Cepa 04-SP1qa y B) Cepa 14-SP1qh.**

### Enzymatic activity of arsenite oxidase under optimum conditions

The specific enzymatic activity of strains 04-SP1qa and 14-SP1qh was evaluated according to the optimum pH, temperature and enzyme and arsenite concentration parameters for arsenite oxidase enzyme activity. Strain 04-SP1qa cultured in MS-As medium at a concentration of 10 mM arsenite, 0.04 % yeast extract, pH 8.0, at 30 °C for 24 h, had enzymatic activity of 0.162  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the membrane fraction. The specific enzymatic activity of 04-SP1qa is greater than that reported by

oxidasa también se midió agregando diferentes concentraciones de la enzima (extracto crudo y célula completa) en el buffer de reacción. La mayor actividad de la enzima arsenito oxidasa se registró a la concentración de 100  $\mu\text{L}$  en las dos cepas evaluadas. Con respecto al efecto del pH sobre la actividad enzimática del arsenito oxidasa se determinó que el pH óptimo para la cepa 04-SP1qa fue 8.0 (Figura 3A) y para la cepa 14-SP1qh fue 7.0 (Figura 3B). Anteriormente, Anderson et al. (1992) evaluaron *A. faecalis* y reportaron pH óptimo de 6.0, al igual que Prasad, Subramanian, y Paul (2009) para una especie de *Arthrobacter*. Por otro

Santini et al. (2000), who evaluated the crude extract of the chemolithoautotrophic strain *Rhizobium* sp. NT-26. The authors reported that the specific enzymatic activity of this strain was  $0.06 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , using 0.04 % yeast extract in the MS culture medium supplemented with 5 mM arsenite. Santini et al. (2000) found the arsenite oxidase of strain STNT-26 in the periplasmic space.

On the other hand, strain 14-SP1qh was cultured in MS-As medium at a concentration of 10 mM arsenite, pH 8.0 and incubation at 30 °C for 24 h, after which the enzymatic activity was measured, obtaining  $0.16 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in the membrane fraction. The specific enzymatic activity of strain 14-SP1qh was higher than levels reported in chemoheterotrophic strains. Anderson et al. (1992) evaluated crude extract of *A. faecalis*, adding 0.04 % yeast extract to the culture medium supplemented with 5 mM arsenite and finding the enzyme linked to the membrane. These authors reported specific enzymatic activity of  $0.023 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . vanden Hoven and Santini (2004) reported activity of  $0.09 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  in crude extract of *Hydrogenophaga* sp. using MS culture medium supplemented with 5 mM arsenite, and found the enzyme in the periplasmic space. For their part, Prasad et al. (2009) evaluated *Arthrobacter* sp., finding the arsenite oxidase enzyme bound to the membrane, and reported specific enzymatic activity of the crude extract of  $0.01 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Table 3 shows a comparison of the enzymatic activities in different microorganisms.

### Kinetic parameters ( $V_{\max}$ and $K_m$ ) of the arsenite oxidase enzyme

Figure 5 shows the Hanes-Woolf plot of arsenite oxidase activity. Strain 04-SP1qa had  $V_{\max}$  of  $3.37 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $K_m$  of  $5.2 \mu\text{M}$ , while strain 14-SP1qh presented  $V_{\max}$  of  $3.7 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $K_m$  of  $14.39 \mu\text{M}$ .

Anderson et al. (1992) analyzed *A. faecalis* and reported that the arsenite oxidase enzyme had  $V_{\max}$  and  $K_m$  values of  $2.88 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $8 \mu\text{M}$ , respectively. Santini et al. (2000) evaluated *Rhizobium* sp. str. NT-26 with chemolithoautotrophic metabolism and reported  $V_{\max}$  of  $2.4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $K_m$  of  $61 \mu\text{M}$ , while Vanden Hoven y Santini (2004) evaluated *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14 and reported  $V_{\max}$  and  $K_m$  values of  $6.1 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $35 \mu\text{M}$ , respectively. For their part, Prasad et al. (2009) analyzed *Arthrobacter* sp., reporting  $V_{\max}$  and  $K_m$  values of  $2.45 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $26 \mu\text{M}$ , respectively (Table 3). Comparing the values described above it can be seen that strains 04-SP1qa and 14-SP1qh, isolated from soil in the Comarca Lagunera, had a higher  $V_{\max}$  value than the other microorganisms, except *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14. Regarding  $K_m$  values, strain 04 SP1qa had higher substrate specificity than the previously reported strains, whereas strain 14

lado, Santini et al. (2000) encontraron que la cepa NT-26 quimiolitotoautotrófica, aislada de una mina de oro en Australia, tuvo pH óptimo de 5.5. Los pH óptimos obtenidos para las dos cepas aisladas en este trabajo pueden deberse al pH alcalino (aproximadamente 8.0) presente en el suelo de la Comarca Lagunera, de acuerdo con lo señalado por Rosas et al. (1999).

El efecto de la temperatura también se evaluó en la actividad de la enzima. La temperatura óptima de 04-SP1qa y 14-SP1qh fue 40 °C (Figura 4). Esta temperatura es más alta que la reportada por Anderson et al. (1992) de 25 °C, debido probablemente al clima árido de la Comarca Lagunera, lo cual conlleva a que las cepas presenten mayor resistencia a las temperaturas elevadas.

### Actividad enzimática del arsenito oxidasa bajo condiciones óptimas

La actividad enzimática específica de las cepas 04-SP1qa y 14-SP1qh se evaluó de acuerdo con los parámetros de pH, temperatura y concentración de enzima y arsenito óptimos para la actividad de la enzima arsenito oxidasa. La cepa 04-SP1qa cultivada en medio MS-As a una concentración de 10 mM de arsenito, extracto de levadura al 0.04 %, pH 8.0, a 30 °C durante 24 h, tuvo actividad enzimática de  $0.162 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en la fracción membranal. La actividad enzimática específica de 04-SP1qa es mayor que la reportada por Santini et al. (2000), quienes evaluaron el extracto crudo de la cepa quimiolitotoautotrófica *Rhizobium* sp. NT-26. Los autores reportaron que la actividad enzimática específica de dicha cepa fue  $0.06 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , utilizando extracto de levadura 0.04 % en el medio de cultivo MS enriquecido con 5 mM de arsenito. Santini et al. (2000) encontraron la arsenito oxidasa de la cepa NT-26 en el espacio periplásmico.

Por otra parte, la cepa 14-SP1qh se cultivó en medio MS-As a una concentración de 10 mM de arsenito, pH 8.0 e incubación a 30 °C durante 24 h, posteriores a las cuales se midió la actividad enzimática obteniendo  $0.16 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en la fracción membranal. La actividad enzimática específica de la cepa 14-SP1qh fue mayor que las reportadas en cepas quimioheterotróficas. Anderson et al. (1992) evaluaron extracto crudo de *A. faecalis*, agregando extracto de levadura 0.04 % al medio de cultivo enriquecido con 5 mM de arsenito y encontrando la enzima ligada a la membrana. Dichos autores reportaron actividad enzimática específica de  $0.023 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Vanden Hoven y Santini (2004) reportaron actividad de  $0.09 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  en el extracto crudo de *Hydrogenophaga* sp. utilizando medio de cultivo MS enriquecido con 5 mM de arsenito, y encontrando la enzima en el espacio periplásmico. Por su parte, Prasad et al. (2009) evaluaron



Table 3. Specific arsenite oxidase activities, reported in different microorganisms.  
Cuadro 3. Actividades específicas de arsenito oxidasa, reportadas en diferentes microorganismos.

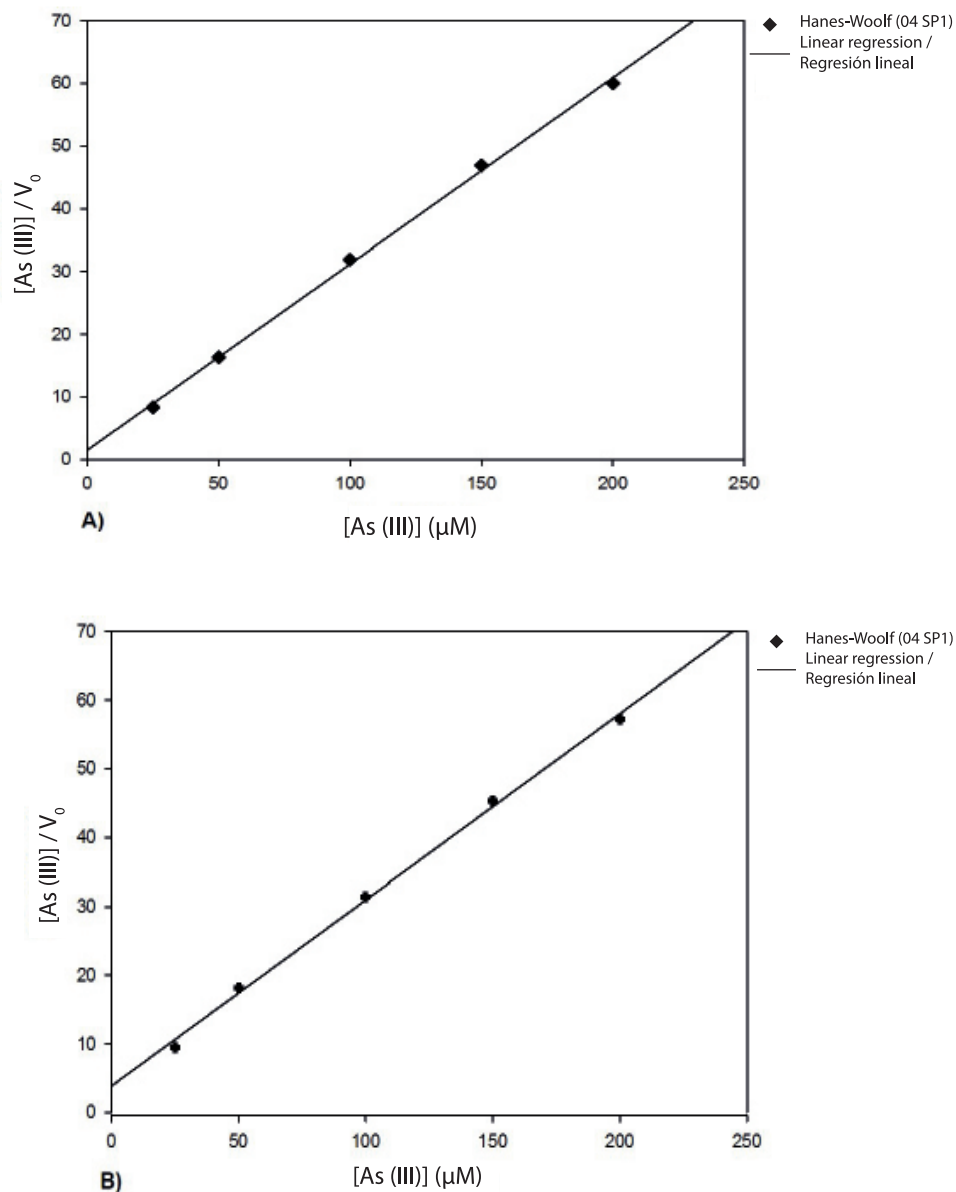
Microorganism / Microorganismo	Metabolism / Metabolismo	Specific enzymatic activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) / Actividad enzimática específica ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Optimal conditions / Condiciones óptimas		$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	Location / Localización
			pH	Temperature (°C) / Temperatura (°C)			
<i>Alcaligenes faecalis</i> <sup>a</sup>	Chemoheterotrophic / Quimioheterotrófico	0.023 (enzyme extract)	6.0	25	2.88	8.0	Membrane / Membrana
		2.88 (purified enzyme) / 0.023 (extracto enzimático)					
		2.88 (enzima purificada)					
		0.06 (enzyme extract [0.04 % yeast extract in MS]) / 0.24 (enzyme extract [MS]) / 0.06 (extracto enzimático [0.04 % extracto de levadura en MS]) / 0.24 (extracto enzimático [MS])					
<i>Rhizobium</i> sp. (str. NT-26) <sup>b</sup>	Chemolithoautotrophic / Quimiofotoautotrófico	0.09 (enzyme extract) 5.6 (purified enzyme) / 0.09 (extracto enzimático) 5.6 (enzima purificada)	5.5	-	6.10	35.0	Periplasmic space / Espacio periplásmico
		0.01 (enzyme extract) 16 (purified enzyme) / 0.01 (extracto enzimático) 16 (enzima purificada)					
<i>Hydrogenophaga</i> sp. (str. NT-14) <sup>c</sup>	Chemoheterotrophic / Quimioheterotrófico	0.01 (enzyme extract) 16 (purified enzyme) / 0.01 (extracto enzimático) 16 (enzima purificada)	6.0	25	2.45	26.0	Membrane / Membrana
		0.162 (enzyme extract) / 0.162 (extracto enzimático)					
04-SP1qa <sup>e</sup>	Chemolithoautotrophic / Quimiofotoautotrófico	0.16 (enzyme extract) / 0.16 (extracto enzimático)	8.0	40	3.37	5.20	Membrane / Membrana
14-SP1qh <sup>e</sup>	Chemoheterotrophic / Quimioheterotrófico	0.16 (enzyme extract) / 0.16 (extracto enzimático)	7.0	40	3.70	14.39	Membrane / Membrana

<sup>a</sup>Anderson et al. (1992), <sup>b</sup>Santini et al. (2000), <sup>c</sup>vanden Hoven & Santini (2004), <sup>d</sup>Prasad et al. (2009); <sup>e</sup>Present study.

(-) Optimum temperature not reported. MS: Minimal salts agar medium.

<sup>a</sup>Anderson et al. (1992), <sup>b</sup>Santini et al. (2000), <sup>c</sup>vanden Hoven & Santini (2004), <sup>d</sup>Prasad et al. (2009); <sup>e</sup>Presente estudio.

(-) No reportaron temperatura óptima. MS: Agar de medio mínimo de sales.



**Figure 5. Hanes-Woolf plot of arsenite oxidase activity: A) Strain 04-SP1qa and B) 14-SP1qh.**

**Figura 5. Representación Hanes-Woolf de la actividad arsenito oxidasa: A) Cepa 04-SP1qa y B) 14-SP1qh.**

SP1qh showed substrate specificity only lower than that of strain *A. faecalis*.

### Conclusions

In this paper we describe for the first time bacteria able to transform arsenite to arsenate in the Comarca Lagunera. Of the 25 isolated strains, strains 04-SP1qa and 14-SP1qh with chemolithoautotrophic and chemoheterotrophic metabolism, respectively, showed higher activity of the arsenite oxidase enzyme, which is bound to the membrane. The two strains had similar  $K_m$  values, being  $3.37 \mu M$  for strain 04-SP1qa and  $3.7 \mu M$  for strain 14-SP1qh. On the other hand, the

*Arthrobacter* sp., encontraron la enzima arsenito oxidasa ligada a la membrana y reportaron actividad enzimática específica del extracto crudo de  $0.01 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . El Cuadro 3 muestra un cuadro comparativo de las actividades enzimáticas en diferentes microorganismos.

### Parámetros cinéticos ( $V_{\max}$ y $K_m$ ) de la enzima arsenito oxidasa

La Figura 5 muestra la representación Hanes-Woolf de la actividad arsenito oxidasa. La cepa 04-SP1qa tuvo  $V_{\max}$  de  $3.37 \mu M \cdot \text{min}^{-1}$  y  $K_m$  de  $5.2 \mu M$ , mientras que la cepa 14-SP1qh presentó  $V_{\max}$  de  $3.7 \mu M \cdot \text{min}^{-1}$  y  $K_m$  de  $14.39 \mu M$ . Anderson et al. (1992) analizaron *A. faecalis* y reportaron

chemoheterotrophic strain 14-SP1qh showed higher  $V_{max}$  than chemolithoautotrophic strain 04-SP1qa with values of  $5.2 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  and  $14.39 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectively. The study of the arsenite oxidase enzyme is of great importance because it will generate more knowledge about the mechanisms used by bacteria to overcome the toxic effects of arsenite. Thus, new bioremediation technologies for treating arsenic-contaminated water and soil, which contribute to environmental conservation, can be developed.

#### End of English version

## References / Referencias

- Anawar, H., Akai, J., Komaki, K., Terao, H., Yosioka, T., Ishizuka, T., Safiullah, S., & Kikuo, K. (2003). Geochemical occurrence of arsenic in the groundwater of Bangladesh sources and mobilization processes. *Journal of Geochemical Exploration*, 77(2-3), 109–131. doi: 10.1016/S0375-6742(02)00273-X
- 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(33), 23674–23682. Obtenido de <http://www.jbc.org/content/267/33/23674.full.pdf+html>
- Braford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Campos, V., Valenzuela, C., Alcorta, M., Escalante, G., & Mondaca, M. (2007). Isolation of arsenic resistance bacteria from volcanic rocks of Quebrada Camarones, Parina Region, Chile. *Gayana*, 71(2), 150–155. doi: 10.4067/S0717-65382007000200003
- Cebrián, M. E., Albores, A., García-Vargas, G., & Del Razo, L. M. (1994). Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico. In J. O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the environment, Part II: Human health and ecosystem effects* (pp. 93–107). USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Del Razo, L., Hernández, J., García-Vargas, G., Ostrosky-Wegman, P., Cortinas de Nava, C., & Cebrián, M. (1994). Urinary excretion of arsenic species in a human population chronically exposed to arsenic via drinking water. A pilot study. In C. O. Abernathy, W. R. Chappell, & C. R. Cothorn (Eds.), *Arsenic. Exposure and health* (pp. 91–100). Norwood, UK: Science and Technology Letters.
- Ellis, P., 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(2), 125–132. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00566-4

que la enzima arsenito oxidasa tuvo valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de  $2.88 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $8 \mu\text{M}$ , respectivamente. Santini et al. (2000) evaluaron *Rhizobium* sp. str. NT-26 con metabolismo quimiolitotrófico y reportaron  $V_{max}$  de  $2.4 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $K_m$  de  $61 \mu\text{M}$ , mientras que Vanden Hoven y Santini (2004) evaluaron *Hydrogenophaga* sp. NT-14 y reportaron valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  de  $6.1 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $35 \mu\text{M}$ , respectivamente. Por su parte, Prasad et al. (2009) analizaron *Arthrobacter* sp. reportando valores de  $V_{max}$  de  $2.45 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y  $K_m$  de  $26 \mu\text{M}$  (Cuadro 3). Comparando los valores anteriormente descritos se puede observar que las cepas 04-SP1qa y 14-SP1qh, aisladas de suelo de la Comarca Lagunera, presentaron  $V_{max}$  mayor que el resto de los microorganismos a excepción de *Hydrogenophaga* sp. NT-14. Con respecto a los valores de  $K_m$ , la cepa 04 SP1qa presentó especificidad mayor de sustrato que las cepas reportadas anteriormente, mientras que la cepa 14 SP1qh mostró especificidad de sustrato solamente menor que la cepa *A. faecalis*.

## Conclusiones

En este trabajo se describen por primera vez bacterias con capacidad de transformar arsenito a arseniato en la región de la Comarca Lagunera. De las 25 cepas aisladas, las cepas 04-SP1qa y 14-SP1qh de metabolismo quimiolitotrófico y quimiheterotrófico, respectivamente, presentaron mayor actividad de la enzima arsenito oxidasa, la cual se localizó unida a la membrana. Ambas cepas exhibieron valores  $K_m$  similares, siendo de  $3.37 \mu\text{M}$  para la cepa 04-SP1qa y  $3.7 \mu\text{M}$  para la cepa 14-SP1qh. Por otro lado, la cepa quimiheterotrófica 14-SP1qh presentó mayor  $V_{max}$  con respecto a la cepa quimiolitotrófica 04-SP1qa con valores de  $5.2 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  y  $14.39 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente. El estudio de la enzima arsenito oxidasa es de gran importancia, ya que de esta manera se tendrá mayor conocimiento sobre los mecanismos utilizados por las bacterias para superar los efectos tóxicos del arsenito. De esta forma se podrán desarrollar nuevas tecnologías de biorremediación para el tratamiento de aguas y suelo con presencia de arsénico, que contribuyan a la conservación del medio ambiente.

Fin de la versión en español

- Ghurye, G. & Clifford, D. (2001). Laboratory study on the oxidation of As (III) to As (V). Houston, TX: U. S Environmental Protection Agency.
- Green, H. H. (1918). Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *South African Journal of Science*, 14, 465–467.
- Lebrun, E., Brunga, M., Baymann, F., Muller, D., Lievremont, D., Lett M-C., & Nitschke, W. (2003). Arsenite Oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 686–693. doi: 10.1093/molbev/msg071
- Lett, M-C., Muller, D., Lièvremont, D., Silver, S., & Santini, J. (2012). Unified nomenclature for genes involved in Prokaryotic aerobic arsenite oxidation. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 207–208. doi: 10.1128/JB.06391-11
- Prasad, K., Subramanian, V., & Paul, J. (2009). Purification and characterization of arsenite oxidase from *Arthrobacter* sp. *Biometals*, 22(5), 711–721. doi: 10.1007/s10534-009-9215-6
- Rosas, I., Belmont, R., Armienta, A., & Baez, A. (1999). Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 112(2), 133–149. doi: 10.1023/A:1005095900193
- Santini, J., Sly, L., Schnagl, R., & Macy, J. (2000). A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 92–97. doi: 10.1128/AEM.66.1.92-97.2000
- SICYGSA. (2000). Estudio de la contaminación difusa del acuífero de la Comarca Lagunera, Coahuila. México, D. F.: Subdirección General Técnica, Gerencia de Aguas Subterráneas, CONAGUA.
- Silver, S., & Phung, L. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 599–608. doi: 10.1128/AEM.71.2.599-608.2005
- Simeonova, D., Lièvremont, D., Lagarde, F., Muller, D., Groudeva, V., & Lett, M-C. (2004). Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 249–253. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09703.x
- Statgraphics (1992). Statgraphics Plus, version 5.1. Reference Manual, Manugistics. Rockville, MD: Statpoint Technologies, Inc. Obtenido de [http://www.statgraphics.com/statgraphics\\_plus.htm](http://www.statgraphics.com/statgraphics_plus.htm)
- Tsai, S., Singh, S., & Chen, W. (2009). Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Chemical Biotechnology*, 20(6), 659–667. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.013
- Valenzuela, C., Campos, V., Yañez, E., Zarror, C., & Mondaca, M. (2009). Isolation of arsenite-oxidizing bacteria from arsenic-enriched sediments from Camarones River, Northern Chile. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(5), 593–596. doi: 10.1007/s00128-009-9659-y
- Van Lis, R., Nitschke, W., Warelow, T., Capowiez, L., Santini, J., & Schoepp-Cothenet, B. (2012). Heterologously expressed arsenite oxidase: A system to study biogenesis and structure/function relationships of the enzyme family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(9), 1701–1708. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.06.001
- Vanden Hoven, R. & Santini J. (2004). Arsenite oxidation by the heterotrophy *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: The arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1656(2), 148–155. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.03.001