

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Dirección de Docencia



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL GEN ARSENITO OXIDASA

DE *Pseudomonas* sp. FN-41.

Tesis de Grado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología

Por

CONSUELO PIA BADILLA PINO

2009

RESUMEN

El arsénico es un metaloide altamente tóxico especialmente en estado inorgánico como arsenito [As (III)] y arseniato [As (V)]. Se encuentra ampliamente distribuido en numerosos ambientes, en algunos de ellos puede alcanzar concentraciones peligrosas para los humanos, produciendo diversas afecciones a la salud como problemas vasculares en la piel hasta el desarrollo de cáncer.

Numerosos estudios muestran que existen bacterias, que cumplen un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico del metaloide, cambiando los estados de oxidación, como por ejemplo, transformándolo desde un estado tóxico de arsenito a un estado menos tóxico de arseniato.

Dichos microorganismos, presentan diversos mecanismos de resistencia para contrarrestar la toxicidad del metaloide. Los principales mecanismos de resistencia bacteriana se encuentran asociados a determinantes genéticos, los que otorgan la capacidad de realizar dichas transformaciones del metaloide.

La facultad para oxidar el arsénico se debe fundamentalmente a la presencia de una enzima, arsenito-oxidasa, la cual oxida As (III) a As (V). Se ha informado que en bacterias heterotróficas la enzima se ubica a nivel del periplasma bacteriano, y en bacterias quimiolitotróficas se encuentra en la membrana citoplasmática asociada a la cadena transportadora de electrones.

Ésta enzima, es un heterodímero que consta de una subunidad catalítica mayor, que contiene un centro de molibdeno y un centro HiPIP [3Fe-4S] y una subunidad menor, formada por un centro Rieske [2Fe-2S]. Los genes que codifican para la subunidad menor y mayor de la enzima son los *asoBA*, *aroBA* y *aoxAB*, respectivamente. Estos genes se han detectado en una amplia gama de bacterias y Archae, no obstante, no se habían descrito genes involucrados en la oxidación de arsenito en el género *Pseudomonas*, pero recientemente dos *Pseudomonas* se informó la presencia del gen.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el gen de la enzima arsenito-oxidasa de *Pseudomonas* FN-41, bacteria arsenito-oxidante, aislada de sedimentos del río Camarones, XV región Chile.

Se estudió la ubicación celular de la enzima arsenito oxidasa, mediante la

formación de esferoplastos, ultracentrifugación y ruptura celular por prensa French.

Se investigó la presencia del gen arsenito oxidasa de la cepa en estudio mediante PCR utilizando partidores degenerados (69F y 1374R). El producto de PCR obtenido fue clonado y secuenciado. Posteriormente se realizaron análisis comparativos con secuencias descritas para los genes *asoA*, *aroA* y *aoxB* mediante Blast y ClustalW, determinando la similitud de aminoácidos, análisis filogenéticos y análisis evolutivos.

Los resultados muestran que la arsenito oxidasa de *Pseudomonas* FN-41 tiene ubicación periplasmática. Un 74.8 % de actividad enzimática respecto a la actividad total, fue encontrada en la fracción periplasmática (0.158 μ moles de DCIP/mgproteína/min). Mediante ultra-centrifugación, la región soluble correspondiente al contenido periplásmico, presentó una mayor actividad enzimática, alcanzando un 87.1% (0.203 μ moles de DCIP/mg proteína/min), respecto a la actividad total. Mediante PCR, se obtuvo un producto de 1200 pb aproximadamente, los que corresponden a la amplificación de la primera mitad de la subunidad mayor de la arsenito oxidasa.

El alineamiento de la secuencia aminoacídica de la cepa en estudio con otras secuencias de arsenito oxidasas, permitió determinar los aminoácidos implicados en el sitio de unión del sustrato de la enzima, los cuales corresponden a los residuos H195 y E203. Se identificaron los residuos S98 y A199, que pertenecen a la subunidad catalítica de la enzima. También se identificó el motivo HNRPAYNSE que es altamente conservado en bacterias arsenito oxidante.

Los análisis de similitud aminoacídica de la secuencia en estudio respecto al gen *aoxB* de *Cenibacterium arsenoxidans* reveló ser un 45.1%, con el gen *asoA* de *Alcaligenes feacalis* un 49.6% y con el gen *aroA* de *Rhizobium* sp. NT-26 un 45.1%. Estos resultados permiten concluir que en *Pseudomonas* sp. FN-41 se encuentra una arsenito oxidasa que se ubica en el espacio periplásmico. Presenta el gen que codifica para la arsenito oxidasa y probablemente es distinto a los ya descritos.