

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



TÍTULO:

**CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANA
QUIMIOLITOTROFICAS ARSENITO-OXIDANTES DE SEDIMENTOS
ENRIQUECIDOS CON ARSENICO (III)**

Tesis de Magíster presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias, mención
Microbiología

Por

CRISTIAN ANDRES VALENZUELA VALENZUELA

2008

RESUMEN

El arsénico es un compuesto altamente toxico especialmente en estado inorgánico (como arsenito [As (III)] o arseniato [As (V)]). Pueden producir diversas afecciones a la salud de las personas, entre ellas problemas vasculares a nivel de la piel, queratosis e hiperqueratosis y entre los más graves esta el desarrollo de cáncer (piel, vejiga o pulmón).

Esta presente en numerosos ambientes, en algunos de ellos este metaloide puede alcanzar concentraciones peligrosas para la salud de las personas, la presencia de este metaloide puede deberse a su uso en numerosos productos como biocidas y preservantes de la madera, o como resultado de algunos procesos industriales tales como la gran minería del cobre.

Numerosos estudios muestran que en estos ambientes existen bacterias capaces de transformar el arsénico reduciéndolo u oxidándolo. La oxidación transforma el arsénico a una especie química 100 veces menos toxica (de arsenito a arseniato) por lo que detoxifican el ambiente, la menor toxicidad se debe a que el As (V) es menos soluble que el As (III), por esta razón la oxidación del arsénico es también el primer paso en la remoción del arsénico del agua, por lo que las bacterias arsenito oxidantes a demás tienen un potencial biotecnológico en la remediación (remoción) del arsénico.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las poblaciones bacterianas quimiolitotróficas presentes en sedimentos enriquecidos con As (III).

Se tomaron muestras de sedimentos superficiales del Río Camarones (15° Región, Norte de Chile). La actividad arsenito oxidante de los sedimentos se determino mediante experimentos en columnas alimentadas con medio de cultivo químicamente definido (MQD) enriqueciendo con As (III) 75 μ M. La determinación de As (III) y As (V) se realizo

mediante HPLC/HG/QAAS. El efecto del enriquecimiento con As (III) sobre las comunidades bacterianas presente en los sedimentos se comprobó mediante PCR-DGGE y analizando los patrones de bandas en forma visual y mediante el programa GelCompare II.

El aislamiento de bacteriano se realizó en placas con MQD solidificado adicionando agar-agar. La detección de las bacterias arsenito-oxidantes se realizó mediante un método de screening utilizando AgNO_3 . La cuantificación de la actividad arsenito-oxidante se realizó cultivando las cepas seleccionadas en matraces con MQD adicionando As (III) 0,5 mM de por un periodo de 4 días luego de los cuales se determinaron las concentraciones de As (III) y As (V) mediante HPLC/HG/QAAS. La identificación de las cepas se realizó determinando algunas de las propiedades bioquímicas y molecularmente mediante la secuenciación parcial del gen ADNr 16S de las cepas en estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que los sedimentos presentaron actividad arsenito-oxidante. La ausencia de esta actividad, en sedimentos previamente esterilizados, permitieron atribuir dicha actividad a la presencia de bacterias capaces de oxidar el arsenito.

La caracterización molecular de los sedimentos mediante PCR-DGGE y posterior análisis de los patrones de banda muestran que las poblaciones bacterianas se vieron afectadas por las condiciones experimentales, especialmente por el enriquecimiento con arsenito.

Posteriormente se aislaron 80 cepas desde los sedimentos enriquecidos y control, estas cepas fueron sometidas a un método de screening con AgNO_3 para identificar las bacterias con capacidad arsenito-oxidante. Se identificaron 10 cepas arsenito oxidantes, las que fueron inicialmente aisladas desde sedimentos enriquecidos. Todas estas cepas excepto la cepa FN-10 fueron capaces de oxidar sobre el 95% del arsenito presente en el medio de

cultivo. Todas las cepas caracterizadas como arsenito oxidantes, excepto la cepa NF-58, presentaron genes codificantes para la subunidad mayor de la arsenito oxidasa. Sin embargo, los partidores utilizados no permiten determinar a cual de los genes descritos: *aro*, *aso* o *aox* corresponden los genes detectados en las bacterias descritas.

Las cepas arsenito-oxidantes fueron representadas en las bandas de DGGE, de los sedimentos enriquecidos. Sin embargo, estas no presentaron gran intensidad indicando que a pesar de poseer actividad arsenito-oxidantes estas no son especies predominantes en los sedimentos. La identificación de las cepas oxidantes utilizando la secuenciación parcial del gen ADNr 16S indico que todas las cepas corresponderían a cuatro especies del genero *Pseudomonas* relacionadas con las especies: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. marginalis* y *P. vancouverensis*. Sin embargo, las propiedades bioquímicas de las cepas en estudio, no corresponden con las propiedades descritas para dichas especies.

