

## Implicación de las arsenito permeasas y arseniato reductasas de *Corynebacterium glutamicum* en los procesos biológicos de desintoxicación de arsénico

Almudena Fernández Villadangos

Directores: **Luís M. Mateos y José A. Gil**

Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León

El arsénico es un elemento de origen natural, íntimamente ligado a la actividad humana a lo largo de la historia y ampliamente distribuido en la naturaleza. Este hecho, unido a su elevada toxicidad lo convierte en un problema de salud de primer orden a nivel mundial.

La actinobacteria *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo saprófito que exhibe una elevada resistencia a arsénico en comparación con el resto de microorganismos analizados. El arsenito es incorporado en *C. glutamicum* por un sistema aún desconocido; el arseniato, al igual que ocurre en otros microorganismos, entra en las células a través de los sistemas de entrada de fosfato. *C. glutamicum* utiliza un sistema de desintoxicación de arsénico basado en la presencia de dos operones *ars* en su cromosoma que contienen genes para arsenito permeasas, arseniato reductasas y los reguladores transcripcionales.

*C. glutamicum* tiene tres genes que codifican para las arsenito permeasas: CgAcr3-1, CgAcr3-2 y CgAcr3-3. Mediante estudios *in vivo* se ha identificado que las proteínas CgAcr3-1 y CgAcr3-2 son funcionales con un grado de participación diferente, siendo CgAcr3-1 la permeasa más importante. Los estudios *in vitro* usando membranas invertidas junto con análisis *in vivo* han revelado que la proteína CgAcr3-1 está exclusivamente ligada al transporte de arsenito utilizando el motivo de fuerza protónica como mecanismo energético. La salida de arsenito va acompañada de una entrada de protones, es decir CgAcr3-1, actúa como una proteína antiportadora de arsenito y protones. Los análisis topológicos de la proteína CgAcr3-1 han mostrado que CgAcr3-1 tiene diez segmentos transmembrana y dos aminoácidos transmembranales (cisteína 129 y glutámico 305) implicados en el proceso de translocación de arsenito.

La reducción de arseniato citoplasmático en *C. glutamicum* es un proceso realizado principalmente por las arseniato reductasas CgArsC1 y CgArsC2 dependientes del sistema redox micotiol/micorredoxina 1. Otros dos genes que codifican para las enzimas arseniato reductasas CgArsC1' y CgArsC4 han sido identificados en el genoma de *C. glutamicum*. Análisis *in vivo* e *in vitro* han permitido estudiar y clasificar a la proteína CgArsC1' dentro de la familia de arseniato reductasas dependientes del par redox tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. Sin embargo, no hemos podido demostrar la presencia de la proteína CgArsC4 en *C. glutamicum*; la sobreexpresión y purificación de CgArsC4 a partir de *Escherichia coli* tampoco ha permitido su acoplamiento

*in vitro* a ninguno de los sistemas redox presentes en *C. glutamicum* ni al sistema glutatión/glutarredoxina de *E. coli*.

Finalmente, como aplicación práctica de los resultados obtenidos se han utilizado diferentes mutantes afectados en los genes de resistencia a arsénico de *C. glutamicum* como bioacumuladores de arsenito y arseniato, con objeto de usar dichos mutantes en procesos de eliminación de arsénico de ambientes contaminados.

## Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Salmonella enterica* de origen animal

Gonzalo Palomo

Directores: **Segundo Píriz Durán, Anselmo Perea Remujo y Alberto Quesada Molina**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura

La salmonelosis es la toxiinfección alimentaria de mayor relevancia para la salud pública en los países del Hemisferio Norte. Debido a su trascendencia clínica se han iniciado sendos planes de control de *Salmonella enterica* en Europa que, comenzando en avicultura, se espera pronto se extiendan a las explotaciones de porcino españolas. De manera paralela, las resistencias a los medicamentos se han convertido en uno de los principales retos sanitarios del siglo XXI. El conocimiento y control de este fenómeno en las enterobacterias, entre las que destacan las salmonelas, podría ser clave para atajar la preocupante pérdida de efectividad de los antimicrobianos.

Mediante la caracterización fenotípica y genotípica de los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos de uso más extendido en medicina humana y veterinaria —especialmente a quinolonas y cefalosporinas— de bacterias aisladas de las más diversas especies animales de distintos regímenes de manejo se ha valorado la relevancia de las distintas serovariedades, fagotipos y estirpes de “*S. enterica*” estudiados para la generación y dispersión de las antibiorresistencias.

Las relaciones clonales (PFGE) entre las distintas cepas han confirmado el consabido contraste entre la gran diversidad genética de ciertas serovariedades como Typhimurium frente a la homogeneidad de otras como Enteritidis. Las primeras bacterias, asociadas mayormente al ganado porcino, se mostraron especialmente resistentes (CMI) a los antimicrobianos ensayados más antiguos entre los que se incluyen la ampicilina, la estreptomina, la tetraciclina y las sulfamidas que, junto al cloranfenicol, son indicadores de la presencia de elementos genéticos mobilizables como los muy prevalentes y diversos integrones de tipo 1. Dichos integrones, al igual que ciertos serotipos y fagotipos, se presentan asociados al ganado porcino, tanto blanco/intensivo como ibérico/extensivo, pero raramente encontramos semejanzas a estos niveles entre ambos troncos raciales o sistemas de producción. La fauna silvestre desempeña un im-

portante papel en la diseminación entre los distintos hospedadores tanto de estos como de otros mecanismos de resistencia típicos de las salmonelas.

La resistencia frente a las quinolonas se ha limitado básicamente a estirpes de origen avícola y a aquellas cepas de *S. Typhimurium* más multi-resistentes —no así las provenientes de porcino ibérico— que además mostraron cierta pérdida de sensibilidad a las cefalosporinas. Tanto en un caso como en otro se han detectado unos pocos mecanismos responsables en distinta medida de los niveles de antibiorresistencia. Tan sólo se han hallado, gracias a la PCR y posterior secuenciación, variantes alélicas asociadas indudablemente a la resistencia, tanto a ácido nalidíxico como a fluoroquinolonas, en las QRDR de *gyrA*: D87Y, S83F, D87N y, sobre todo, S83Y. Sin embargo, no se puede decir lo mismo de las únicas beta-lactamasas detectadas —más allá de la PSE codificada en un perfil de integración concreto—: TEM y OXA. Pues, aunque se observan relaciones estadísticamente significativas de ambas enzimas en cuanto a su influencia en la pérdida de sensibilidad a algunas cefalosporinas, la literatura consultada nos hace pensar que esta resistencia se pudiera deber a otros mecanismos subyacentes por lo que harían falta ensayos más concluyentes.

## Evolución de la microbiota y de las características sensoriales de carne de ave expuesta a varios compuestos antimicrobianos bajo diferentes condiciones de aplicación. Utilidad de la prueba de la p-nitroanilina

José Alfredo Guevara Franco

Directores: **Carlos Alonso Calleja y Rosa Capita González.**  
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

A diferencia de lo que ocurre en otras áreas geográficas, los tratamientos descontaminantes o antimicrobianos de la carne no están autorizados en la Unión Europea. Ello ha sido en base al Principio de Precaución, por considerar las autoridades sanitarias que los datos disponibles son insuficientes para realizar una correcta evaluación científica de su efectividad y seguridad para el consumidor. Para obtener nuevos datos se ha realizado esta Tesis Doctoral, cuyos objetivos principales han sido determinar el grado de contaminación microbiana de la carne de pollo en el momento de su obtención en el matadero y durante el almacenamiento en refrigeración, así como evaluar el efecto de varios tratamientos químicos, aplicados a diferentes temperaturas, sobre los niveles de 10 grupos microbianos y sobre las características sensoriales de este alimento. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la aplicación de “barreras múltiples” (envasado a vacío o en atmósferas modificadas y adición de aceite esencial de orégano) sobre ambos grupos de parámetros. Finalmente, se ha pretendido

conocer la utilidad de la prueba de la *p*-nitroanilina para evaluar la calidad (microbiológica y sensorial) y la vida útil de la carne de pollo.

La carne de pollo recién obtenida presentó un elevado grado de contaminación microbiana superficial. Además, a pesar del mantenimiento de las muestras en refrigeración se observaron, a partir del tercer día de almacenamiento, incrementos significativos en los recuentos de todos los grupos microbianos estudiados. Ambos hechos aconsejan la aplicación de tratamientos descontaminantes que permitan reducir la carga microbiana de este alimento y contribuyan así a mejorar su calidad higiénico-sanitaria. Los compuestos que ejercieron un mayor efecto antimicrobiano, prolongando en dos días la vida útil de la carne de pollo respecto a las muestras control (no tratadas), fueron el fosfato trisódico, el clorito sódico acidificado y el ácido cítrico, seguidos por los peroxiácidos. Los tratamientos con dióxido de cloro y con agua no permitieron reducir los recuentos microbianos en relación con las muestras control. La efectividad de los tratamientos estuvo relacionada con la temperatura de aplicación, por lo que este es un aspecto que debería ser tenido en cuenta al diseñar procedimientos de descontaminación. El tipo de tratamiento influyó no solo en los niveles, sino también en las sucesiones de microorganismos psicrotrofos presentes en la carne durante el almacenamiento. Es de destacar el hecho de que los tratamientos usados no afectaron negativamente a las características sensoriales del alimento, e incluso las mejoraron al cabo de varios días de almacenamiento.

En las condiciones ensayadas, el tratamiento combinado de envasado a vacío o en atmósferas modificadas junto con la adición de aceite esencial de orégano ejerció un escaso efecto antimicrobiano sobre los niveles de microorganismos patógenos y alterantes presentes en carne picada de pollo. Finalmente, se comprobó que la determinación de la actividad aminopeptidasa (prueba de la *p*-nitroanilina) es una prueba rápida (2,5 a 3 horas), exacta, sencilla y poco costosa económicamente, que permite la estimación de la calidad microbiológica y sensorial de la carne

de pollo sin envasar durante el almacenamiento en refrigeración.

## Caracterización de la lacasa de *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 y aproximación al estudio de su potencial oxidativo y función biológica

Raquel Moya Lobo

Directores: M<sup>a</sup> Enriqueta Arias Fernández y Manuel Hernández Cutuli

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá

Las lacasas son metaloproteínas con actividad L-fenoloxidasas que se incluyen en el grupo de las oxidasas multicobre. Catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos aromáticos en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua. Su presencia ha sido descrita en plantas, hongos, insectos, bacterias y arqueas, habiendo sido implicadas en multitud de procesos biológicos diferentes. El hecho de que estas enzimas posean una gran versatilidad catalítica, potenciada por la participación de compuestos mediadores de oxidación, ha suscitado entre los investigadores un gran interés debido a su potencial aplicación en numerosas industrias tecnológicas así como en otros procesos de interés medioambiental.

En este trabajo se ha abordado el estudio del potencial oxidativo de la cepa *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, productor de una lacasa denominada SclA, tanto a través de la puesta a punto de sistemas lacasa-mediador, como mediante la inducción de radicales hidroxilo a través de un ciclo redox de quinonas, considerado este último como un proceso microbiano de oxidación avanzada. Para este fin se eligieron como compuestos

modelo colorantes textiles de tipo azo. Ambas estrategias demostraron ser altamente eficaces en la degradación de los colorantes textiles. Además, el proceso microbiano de oxidación avanzada permitió la completa destoxificación de los colorantes seleccionados.

El interés biotecnológico y medioambiental suscitado por la lacasa SclA, nos condujo a su posterior caracterización molecular y sobreexpresión heteróloga. Una vez obtenida la secuencia del gen codificante para esta enzima, se realizó un análisis comparativo con otras lacasas mediante el empleo de diversas herramientas informáticas, lo que reveló la presencia de motivos característicos de las oxidasas multicobre, es decir, las cuatro regiones de unión al cobre y tres dominios de tipo cupredoxina. Además, la ausencia de un péptido señal en la secuencia, confirmó el carácter intracelular de esta enzima.

A continuación, el gen *sclA* se sobreexpresó de forma heteróloga en *Escherichia coli* utilizando un sistema de tipo pET. De esta forma se pudo disponer de una pequeña cantidad de la enzima recombinante en forma soluble, lo que permitió su posterior purificación y caracterización físico-química y cinética. Esta caracterización puso de manifiesto la estabilidad de la enzima en un amplio rango de pH y temperatura, destacando asimismo el incremento de afinidad por el sustrato ABTS respecto a la enzima nativa. Por otro lado, la enzima recombinante mostró capacidad oxidativa frente a compuestos de tipo no fenólico, a través de un mediador como la acetosiringona.

Por último, la obtención de un mutante no productor de lacasa (SclA-) mediante la técnica de disrupción génica, permitió abordar el estudio de la posible implicación de la lacasa en procesos de morfogénesis, en la pigmentación de esporas, en procesos de resistencia al cobre y en la degradación de la lignina. Los resultados obtenidos en este estudio, no revelaron diferencias significativas entre la cepa silvestre y mutante en ninguno de los ensayos realizados con este fin, lo que impidió atribuir de manera concluyente una función biológica a esta enzima en ninguno de los procesos estudiados.

### Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

Actualidad SEM publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas o dirigidas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM o al Director por correo electrónico, siguiendo el formato: *Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación* (si es distinto) y *Resumen* (máximo, unas 500 palabras). El resumen que se envía a la base de datos Teseo es apropiado también.

Actualidad SEM se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la microbiología.

## Socios que deben actualizar datos

- Bordes Benítez, Ana
- Fernández Orts, Eva María
- Jorge Blanco, José Carmelo
- Lafarga Capuz, Bernardo
- López Ponce, Francisco José
- Rubio Vallejo, Manuel Francisco
- Sesma Bea, Begoña
- Yáñez Ruiz, David Rafael
- Vázquez Domínguez, Evaristo

Los datos correspondientes a cambios de dirección o de la domiciliación bancaria deben enviarse a la Secretaría de la SEM por correo electrónico, normal o fax (ver [www.semicrobiologia.org](http://www.semicrobiologia.org)).