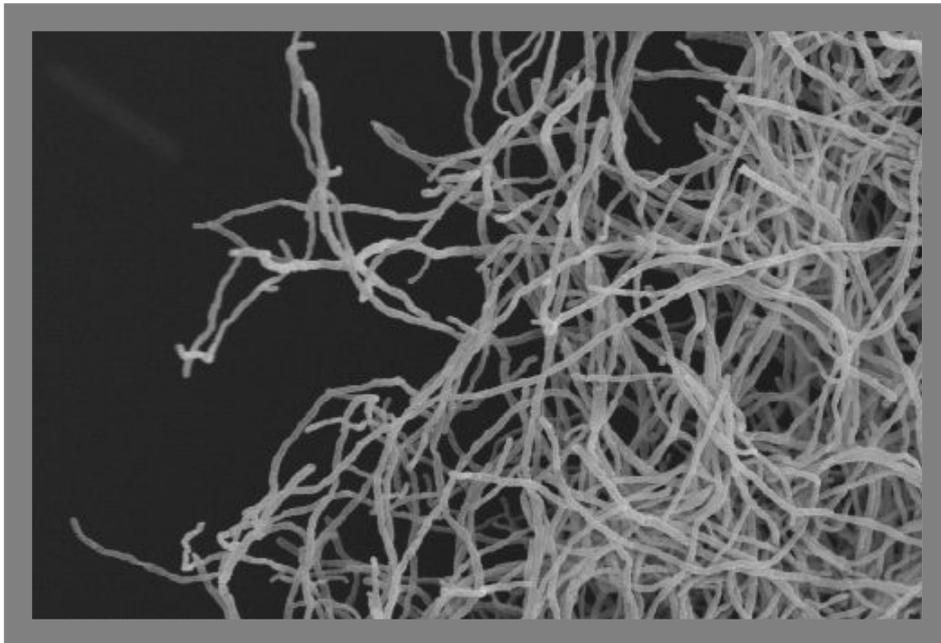


Sociedad Argentina de Microbiología General
SAMIGE

**Tercer Congreso Argentino de
Microbiología General**

*Dedicado a la presentación de trabajos de
investigación básica sobre microorganismos y fermentaciones
industriales*



**Universidad Nacional de Quilmes
5 y 6 de Octubre de 2007**

Comisión Organizadora SAMIGE 2006

Liliana Semorile, Claudio Valverde, Alejandro Pardo, Luis Wall, Axel Hollmann, Angeles Zorreguieta, Nancy López, Adrián Vojnov, Lucrecia Delfederico, Diana Vullo.

Comisión Directiva SAMIGE

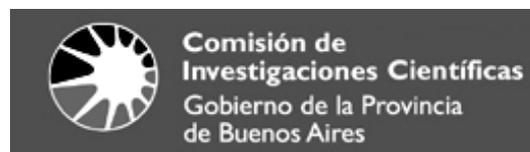
Augusto García (Presidente), Mario Aguilar (Vicepresidente), Héctor Álvarez, Néstor Cortez, Graciela De Antoni, Diego de Mendoza, Marcela Ferrero, Antonio Lagares, Nancy López, Beatriz Méndez, Graciela Salerno, Graciela Savoy, Liliana Semorile, Faustino Siñeriz, Claudio Valverde, Adrián Vojnov, Osvaldo Yantorno y Angeles Zorreguieta.

Comité de Honor

Marcelo Dankert, Gabriel Favelukes y Horacio Pontis

Foto de portada: Micrografía electrónica de barrido de actinomicetes endofíticos fijadores de nitrógeno aislados por primera vez a partir de nódulos radiculares del aliso del cerro.
Gentileza de Luis G. Wall.

Instituciones auspiciantes



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

Empresas auspiciantes



CHEMIT
ARGENTINA S.R.L.

**PROVEEDOR DE INSUMOS Y SERVICIOS
A LABORATORIOS**

Representante de:

 **CARLO ERBA REAGENTI**
◇ REACTIVOS ANALITICOS DE ALTA PUREZA

 **Kartell** ◇ MATERIAL Y ACCESORIOS DE PLASTICO

Arregui 4260 - C1417GNN - Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Tel/Fax: (011) 4566-3989 (rotativas) / 4567-9217 / 4567-7591 / 4639-1844
e-mail: chemitargentina@chemitargentina.com.ar



Biodynamics

Reactivos para Biología Molecular | Cultivo de Células | Plásticos y Pipetas | Equipos para Laboratorio



 **invitrogen™**

The logo for Invitrogen, featuring a stylized DNA double helix icon to the left of the word "invitrogen" in a bold, lowercase, sans-serif font, followed by a trademark symbol (™).

PROGRAMA DE LA REUNIÓN

Jueves 5 de Octubre

9.00 – 10.00 Registro

10.00 – 11.00 Apertura

Conferencia Inaugural : Prof. Paul Williams (University of Nottingham, UK).

***Cell-to-cell communication and quorum sensing in prokaryotes:
small talk, straight talk and cross-talk.***

11.00 – 11.30 Intervalo / Café

11.30 – 12.30 Comunicaciones orales: **Bacterias lácticas / Fermentaciones**
Moderador/es: Graciela De Antoni

C1: “Antagonismo de cepas de lactobacilos frente al efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) en cultivos celulares”. Hugo Ayelén (CIDCA, UNLP, La Plata).

C2: “Identificación y tipificación de lactobacilos de kefir, una estrategia polifásica”. Lucrecia Delfederico (Laboratorio de Microbiología Molecular, UNQ, Bernal).

C3: “Impacto del estrés mecánico sobre el nivel de piliación de *Moraxella bovis* en biorreactores agitados”. Claudia Prieto (CINDEFI, UNLP, La Plata).

Almuerzo

14.30 – 16.00 Comunicaciones orales: **Interacciones entre microbios y otros organismos**
Moderador/es: Mario Aguilar – Luis G. Wall

C4: “Estudios sobre la transferencia lateral de genes de nodulación en rizobios nativos nodulantes de maní (*Arachis hypogaea* L.)”. Fernando Ibáñez (Depto. Ciencias Naturales, UNRio Cuarto, Rio Cuarto).

C5: “Influencia de la osmolaridad, pH y aereación sobre las características fisiológicas y moleculares de una especie que nodula soja: *Sinorhizobium fredii*”. Fabiola Pagliero (Depto. Ciencias Exactas y Naturales, UNLa Pampa, Santa Rosa).

C6: “Influencia del *quorum sensing* en el desarrollo de biofilm en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*”. F. Malamud (Fundación Pablo Cassará, Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

C7: “Caracterización de nuevos actinomicetes simbióticos (no-*Frankia*) fijadores de nitrógeno aislados de nódulos radiculares de *Alnus acuminata*”. Danay Valdés (PIIB, UNQ, Bernal).

16.00 – 16.30 Intervalo / Café

16.30 – 17.00 Comunicaciones orales: **Biodiversidad y Biorremediación**
Moderador/es: Diana Vullo – Osvaldo Yantorno

C8: “Aislamiento de bacterias con propiedades promotoras de la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos”. Romina Dias (CINDEFI, UNLP, La Plata).

C9: “Estudio de la degradación de hidrocarburos y respuesta quimiotáctica en microorganismos halófilos”. Sebastián D’Ippólito (IIB, UNMDP, Mar del Plata).

17.00 – 19.00 Sesión de posters.

19.00 Actuación coro UNQ / Vino de honor

Viernes 6 de Octubre

9.00 – 10.30 Comunicaciones orales: **Bioquímica y Biología Molecular**
Moderador/es: Nancy López – Ángeles Zorreguieta

C10: “*NrfA*...¿estas ahí?: buscando a los riboreguladores de *Sinorhizobium meliloti*”. Patricio Sobrero (PIIB, UNQ, Bernal).

C11: “Estudios sobre la regulación de la expresión del gen *gsbB* (la glutatión sintetasa) de *Rhizobium tropici* en condiciones de estrés ambiental”. Cecilia Muglia (IBBM, UNLP, La Plata).

C12: “Colocalización de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la sacarosa en células de filamentos de *Nostoc* sp. pcc 7120 fijando dinitrógeno”. Clarisa Marcozzi (FIBA, Mar del Plata).

C13: “CarO, una proteína de membrana externa vinculada con la resistencia a carbapenemes, forma oligómeros en la membrana externa de *Acinetobacter baumannii*”. Verónica Relling (IBR, UNR, Rosario).

10.30 – 11.00 Intervalo / Café

11.00 – 12.00 Sesión de posters.

Almuerzo

14.00 – 15.00 Comunicaciones orales: **Biotecnología**
Moderador/es: Miguel Ángel Galvagno – Beatriz Méndez

C14: “Estudio de bacterias inmovilizadas como biocatalizadores aplicables al escalado de reacciones de transglicosidación microbiana”. Matías Nóbile (DCyT, UNQ, Bernal).

C15: “Cultivos mixtos: complementación metabólica entre cepas y su relación con la calidad final del vino”. María Eugenia Rodríguez (Lab. de Microbiología, CRUB, UNComahue, Río Negro)

C16: “Caracterización molecular de microorganismos marinos con potencial interés biotecnológico”. Héctor Cristóbal (PROIMI, UNTucumán, Tucumán)

15.00 – 15.15 Intervalo / Café

15.15 – 16.15 Comunicaciones orales: **Interacciones entre microbios y otros organismos / Bioquímica y Biología Molecular**
Moderador/es: Augusto García – Adrián Vojnov

C17: “T-DNA transfer and integration analysis in the genome of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor*”. Minna Kempainen (PIIB, UNQ, Bernal).

C18: “Participacion de la cadena O del LPS y la celulosa en las interacciones celulares de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* durante la formacion de biofilms”. Daniela Russo (Fundación Leloir, UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

C19: “The polyhydroxybutyrate genes of an antarctic *Pseudomonas* strain are situated within a genomic island-like region”. Nicolás Ayub (Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires).

16.15 – 17.15 Conferencia de cierre : Prof. Paul Williams (University of Nottingham, UK).

***Quorum sensing and prokaryotic-eukaryotic interactions:
from biology to biotechnology and medicine***

18.00 Asamblea societaria

COMUNICACIONES ORALES

BACTERIAS DEL ACIDO LACTICO - FERMENTACIONES

C1 Antagonismo de cepas de lactobacilos frente al efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7) en cultivos celulares.

Hugo, Ayelen^{1,3}; Kakisu, E.J.^{1,3}; De Antoni, Graciela L.^{1,2,4}; Pérez, Pablo F.^{1,2,3*}

¹CIDCA. ²Cátedra de Microbiología. Fac. de Cs. Exactas.UNLP. Calle 47 y 116. La Plata (1900). Argentina. Tel/fax: 54 221 4249287. ³CONICET. ⁴CIC. *e-mail: pfp@biol.unlp.edu.ar

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es un patógeno emergente asociado a brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). Los factores de virulencia más importantes caracterizados son la toxina Shiga y la intimina, principal responsable de la lesión attaching/effacing (A/E), en células epiteliales. Algunas cepas de lactobacilos han demostrado su capacidad de actuar como probióticos antagonizando el daño provocado por los patógenos intestinales.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto protector de dos cepas de lactobacilos frente al daño provocado por *E. coli* (EHEC) en cultivos celulares de la línea Hep-2, modelo de la lesión A/E intestinal.

Se utilizó la cepa 69160 de *Escherichia coli* (O157:H7) aislada de un caso de SUH. Las bacterias lácticas empleadas fueron *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* (cepa CIDCA 133) y *Lactobacillus plantarum* (cepa CIDCA 114). Los cultivos celulares de la línea Hep-2 se crecieron hasta confluencia en medio DMEM a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las monocapas fueron incubadas con el sobrenadante del cultivo de EHEC con o sin microorganismos, y en los ensayos de protección se preincubaron con lactobacilos. La asociación bacteriana se determinó por recuento de viables. El desprendimiento celular se evaluó mediante tinción con cristal violeta. El daño por adhesión bacteriana se registró mediante tinción del citoesqueleto con faloidina fluorescente y por microscopía electrónica de barrido.

El desprendimiento de celular luego de la incubación de EHEC en su sobrenadante alcanzó un 50%, la preincubación con los lactobacilos elevó el porcentaje de células adheridas al 80%. El daño provocado al citoesqueleto fue mayor cuando la cepa de EHEC se incubó junto con su sobrenadante y en ambos casos fue significativa la protección de las BAL. La microscopía de barrido confirmó los resultados obtenidos mediante la fluorescencia. La preincubación con lactobacilos sólo disminuyó significativamente la asociación de EHEC a bajas concentraciones de la misma, por lo tanto no sería el principal mecanismo que explique el efecto protector.

Los resultados muestran la capacidad de lactobacilos de antagonizar eventos claves en la patogénesis de *E. coli* enterohemorrágica.

C2 Identificación y tipificación de lactobacilos de kefir, una estrategia polifásica.

L Delfederico^{1,3}, A Hollmann^{1,3}, G De Antoni², y L Semorile¹.

¹Laboratorio de Microbiología Molecular, DCyT -UNQ, Roque Sáenz Peña 352, (B1876BXD) Bernal, ²CIDCA, FCE - UNLP, ³CONICET. E-mail: ldelfe@unq.edu.ar

En la formulación de alimentos probióticos, la correcta identificación de las especies y cepas involucradas otorga un valor agregado a estos productos. En este contexto y considerando la tendencia actual que propone criterios taxonómicos polifásicos, basados en características fenotípicas y genómicas reveladas a escala molecular, se propuso lograr una acabada identificación y tipificación de los aislamientos de lactobacilos del sistema en estudio. El objetivo de estudio fue la identificación y evaluación de la diversidad genética de aislamientos de lactobacilos heterofermentadores, obtenidos de gránulos de kefir (cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos CIDCA, FCE-UNLP).

Los resultados obtenidos con las cepas de referencia demostraron que el método ARDRA fue adecuado para diferenciar cada una de las cepas utilizadas, a nivel de especie. En el análisis se incluyeron especies estrechamente relacionadas como *L. kefir*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. hilgardii* y *L. fermentum*, todas pertenecientes al grupo filogenético *L. casei* - *Pediococcus group* así como una menos relacionada, *L. plantarum*.

La amplificación y análisis de secuencia de la región espaciadora ribosomal 16S-23S se utilizó, asimismo, como criterio de identificación. Los perfiles electroforéticos de los productos de PCR mostraron varias bandas y resultaron diferentes entre lactobacilos homo y heterofermentadores pero idénticos entre los miembros de cada grupo. Se obtuvo la secuencia de la banda de amplificación de menor tamaño de todos los aislamientos heterofermentadores, de dos homofermentadores y de cepas de referencia. El dendrograma obtenido a partir de estas secuencias y de secuencias obtenidas del GenBank, agrupó a los aislamientos heterofermentadores con ambas cepas de *L. kefir* y separados de las restantes cepas heterofermentadoras de referencia. Los aislamientos homofermentadores agruparon en la rama más distante, próximos a *L. plantarum* y al resto de las cepas homofermentadoras de referencia.

Para evaluar la diversidad genética de estos lactobacilos se realizó análisis RAPD con primers Coc, ERIC-2, M13 y 1254. El dendrograma UPGMA obtenido por combinación de los perfiles M13, ERIC-2 y 1254, mostró valores de similitud del 75% entre el aislamiento homofermentador y el resto de los lactobacilos, mientras que este valor fue de 79% entre *L. brevis* JCM 1059, los aislamientos heterofermentadores y ambas cepas de referencia de *L. kefir*. La similitud entre los aislamientos heterofermentadores y ambas cepas de referencia de *L. kefir* fue superior al 80%.

Por otro lado y en virtud del status GRAS (*Generally Recognised As Safe*) otorgado a los miembros del género *Lactobacillus*, existe preocupación sobre la resistencia a antibióticos y la recomendación actual es no utilizar en alimentos bacterias que contengan genes transmisibles de resistencia a fármacos utilizados en clínica. Se ha realizado el relevamiento de resistencia a tetraciclina en los aislamientos y cepas de referencia, para lo cual se estandarizó un procedimiento modificado para la determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM). Se determinaron CIMs que oscilan entre 128 y >256 µg/ml para los aislamientos.

Los resultados permiten concluir que todos los aislamientos heterofermentadores pertenecen a la especie *L. kefir* y que los aislamientos homofermentadores secuenciados pertenecen a la especie *L. plantarum*. Asimismo, el análisis de secuencia de la región espaciadora ribosomal 16S-23S mostró ser una herramienta útil y confiable para la rápida identificación de estas especies de lactobacilos.

C3 Impacto del estrés mecánico sobre el nivel de piliación de *Moraxella bovis* en biorreactores agitados.

Claudia Prieto, Rodolfo Értola y Osvaldo Yantorno*

Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI- CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, 47 entre 115 y 116, La Plata (1900), Argentina. *E-mail: yantorno@quimica.unlp.edu.ar

Moraxella bovis es el agente etiológico de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB), enfermedad infectocontagiosa de amplia distribución mundial. Para iniciar la colonización del ojo la bacteria se adhiere a la superficie de la córnea mediante pilis, proteínas filamentosas ancladas a superficie, que constituyen uno de sus principales factores de virulencia. La profilaxis contra esta enfermedad se basa en el empleo de vacunas formuladas a partir de células enteras. La bibliografía internacional señala que la tasa de protección de las vacunas actualmente disponibles es muy baja (20-50%). Esto ha sido asociado a la pérdida de piliación celular durante el cultivo de *M. bovis* en reactores agitados mecánicamente, forma tradicional de producción de vacunas a nivel industrial. Si bien se ha reportado que los pilis podrían ser susceptibles a las fuerzas de corte hidromecánicas, no hay en bibliografía datos cuantitativos sobre estos efectos, como tampoco sobre el empleo de estrategias de cultivo alternativas.

El objetivo de este trabajo fue cuantificar el efecto de la agitación y aereación sobre el nivel de piliación de células enteras de *M. bovis* durante su crecimiento en biorreactores. A tal fin se analizaron de manera comparativa el crecimiento y la piliación en células crecidas bajo diferentes condiciones de operación en: erlenmeyers agitados, fermentadores convencionales provistos con turbina tipo Rushton o con hélice marina, columnas de burbujeo y reactores tipo air-lift. Se estudió además el efecto del agregado de agentes espesantes al medio de cultivo líquido [agar (0.02%) y carboximetilcelulosa (CMC, 0,1; 0,2 o 0,5%)], los cuales al aumentar la viscosidad disminuyen la turbulencia provocando una reducción del daño asociado al shear. Los cultivos fueron realizados en medio BHI a 37°C. Los reactores empleados disponían de electrodos para medición de O₂ disuelto y control automático on-line para mantener el porcentaje de saturación de O₂ a valores fijos. El nivel de piliación celular fue evaluado mediante una técnica de ELISA desarrollada previamente en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos mostraron que en los procesos llevados a cabo en reactores con turbina tipo Rushton, el aumento de la velocidad de agitación (incremento de potencia por unidad de volumen), produce una reducción del nivel de piliación celular. Cuando estos reactores fueron operados con agitación variable para mantener el porcentaje de saturación de O₂ a niveles $\geq 30\%$, el nivel de piliación celular al final del proceso fue $\leq 3\%$. El agregado de CMC al 0,2% disminuyó la pérdida de piliación, obteniéndose en similares condiciones de cultivo un nivel de piliación del orden del 30%. El empleo de hélice tipo marina no resultó efectivo ya que para mantener el porcentaje de saturación de oxígeno a valores no limitantes del crecimiento, se necesitó emplear elevada agitación (1200 rpm) lo cual produjo una reducción en el nivel de piliación celular más pronunciada que la obtenida con la turbina Rushton. La columna de burbujeo demostró que constituye una interesante alternativa como sistema de producción ya que permitió mantener la piliación a valores mayores al 50%.

INTERACCIONES ENTRE MICROBIOS Y OTROS ORGANISMOS

C4 Estudios sobre la transferencia lateral de genes de nodulación en rizobios nativos nodulantes de maní (*Arachis hypogaea* L.).

Ibáñez, Fernando; Fabra, Adriana. Dpto. Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. e-mail: fibanez@exa.unrc.edu.ar.

Arachis hypogaea L. es una especie vegetal que posee una gran relevancia comercial, siendo ampliamente utilizada para la alimentación humana y animal por ser una fuente proteica de gran calidad, y para la producción de aceite y otros productos. Nuestro país constituye uno de los principales exportadores mundiales de esta leguminosa, localizándose el 94% del total de la producción nacional en la zona centro-sur de la provincia de Córdoba.

El maní es una leguminosa que había sido descrita como nodulada eficientemente sólo por rizobios de crecimiento lento, denominados *Bradyrhizobium (Arachis hypogaea)* sp., no habiéndose aún definido las especies. Nuestro laboratorio obtuvo una colección de microsimbiontes nodulantes de maní representativa del área manisera de Córdoba. Estos aislamientos han sido caracterizados fenotípicamente (velocidad de crecimiento, tolerancia a condiciones adversas, eficiencia simbiótica) y genotípicamente (REP-PCR, ERIC-PCR, ARDRA). Estos estudios revelaron que dicha población es heterogénea y que involucra a rizobios de crecimiento lento y rápido (Taurian y col., 2002).

Para ampliar la caracterización genotípica de esos aislamientos, se analizaron los genes *rrs* (ADNr 16S), *nodC* y *nifH* en los aislamientos NCHA22 y NET30. Para el aislamiento NCHA22, las filogenias inferidas a partir de las secuencias de estos genes son congruentes. Los genes *rrs*, *nodC* y *nifH* de este aislamiento poseen elevado porcentaje de homología con los correspondientes a cepas que pertenecen al grupo IIB de la especie *Rhizobium tropici*.

En contraste, para el aislamiento NET30, la filogenia construida a partir de la secuenciación del gen *rrs* no es consistente con la obtenida a partir de la secuenciación del gen *nodC*. El gen *rrs* de este aislamiento posee elevada similitud con el de *R. giardinii* H152; mientras que su gen *nodC* posee un alto porcentaje de homología con cepas de *R. tropici* IIB y con NCHA22. Esta inconsistencia sugiere que el gen *nodC* fue adquirido por este aislamiento a través de algún mecanismo de transferencia horizontal, probablemente mediada por el pasaje de un plásmido simbiótico. Por otra parte, ensayos de *Southern Blot* demostraron que NET30 no posee copias del gen *nifH*, hecho que se vincula con las relaciones filogenéticas inferidas a partir de su gen *rrs*, ya que las cepas de *R. giardinii* bv. *giardinii* carecen del operón *nifHDK*. El análisis del perfil plasmídico de los aislamientos reveló que NCHA22 posee al menos tres plásmidos (~225Kb, ~410Kb y >1Mb), mientras que el aislamiento NET30 contiene sólo uno (>1Mb). En NCHA22, los genes de nodulación se encuentran localizados en el plásmido de ~410Kb. Se determinó la trasmisibilidad de este elemento, revelando una frecuencia de transferencia de $\sim 5 \cdot 10^{-7}$ por célula receptora. La transferencia de un plásmido simbiótico a partir de un rizobio portador de los genes de nodulación de *R. tropici* IIB hacia NET30, y la posterior recombinación de los genes simbióticos en este fondo genético, podrían haberle conferido a este aislamiento la capacidad de nodular maní.

Subsidiado por CONICET, FONCyT, SECyT-UNRC.

C5 Influencia de la osmolaridad, pH y aereación sobre las características fisiológicas y moleculares de una especie que nodula soja: *Sinorhizobium fredii*.

Fabiola Pagliero; Carolina Castaño; M. Delia Pastor y Graciela Lorda. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. Av. Uruguay 151. (6300) Santa Rosa. La Pampa. Argentina.

Las bacterias agrupadas bajo el nombre de rizobios establecen una relación simbiótica con las leguminosas. Los rizobios y las raíces de las leguminosas intercambian señales que resultan en la formación de nódulos, donde se lleva a cabo el proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. El mismo depende de la cepa de rizobio, del cultivar hospedante, y de los factores ambientales, que afectan tanto al microsimbionte como a la planta y al funcionamiento del sistema.

La obtención de inoculantes con alta concentración celular, producidos en diferentes condiciones, conduce a establecer condiciones de proceso que aseguren preparados efectivos con relación a la sobrevivencia y capacidad simbiótica de los microorganismos; a fin de poder obtener un producto que pueda ser utilizado bajo distintas condiciones de clima y suelo. El objetivo de este trabajo fue obtener suspensiones microbianas de la cepa *Sinorhizobium fredii* USDA205, con un alto contenido de biomasa, que puedan ser utilizados en un amplio rango de condiciones, manteniendo las características de infectividad y efectividad de la cepa.

La hipótesis planteada fue que se pueden aprovechar las respuestas fisiológicas de *S. fredii* a diferentes condiciones de pH, osmolaridad y aeración, para aumentar la velocidad de nodulación, frente a la variedad vegetal específica, favoreciendo el establecimiento de una simbiosis efectiva, en condiciones adversas.

Se estudió el desarrollo de suspensiones bacterianas de una cepa de *Sinorhizobium fredii* USDA 205 en diferentes condiciones de medio y operación, y su consiguiente influencia, por un lado sobre la biosíntesis de exopolisacáridos (EPSs) y los perfiles de lipopolisacáridos (LPSs), y por el otro sobre la capacidad simbiótica de la cepa. Se formularon medios de cultivo con diferentes condiciones de pHs iniciales (desde 5 a 10), osmolaridad (de 2 mM NaCl a 700 mM NaCl) y, utilizando diferentes niveles de aeración (relaciones de volumen de medio/volumen de frasco: 1/2,5; 1/5; 1/10 y 1/15). A continuación se estudió la influencia de éstas condiciones sobre el establecimiento de una simbiosis efectiva. Los parámetros que se evaluaron fueron concentración celular, concentración de EPSs, perfiles de LPSs, capacidad simbiótica (infectividad y efectividad) y velocidad de nodulación, frente a la variedad vegetal específica. Se logró obtener suspensiones celulares de alta concentración, adaptadas a las diferentes condiciones de estrés. Se determinó además que en dichas condiciones los perfiles de LPSs celulares, no se modificaron. Sin embargo, la concentración de EPSs biosintetizado aumentó a medida que las condiciones de crecimiento se alejaban del óptimo. Por otra parte, estas suspensiones celulares no reunieron las condiciones necesarias para ser utilizadas como inoculantes. Esto fue debido a la incapacidad demostrada para infectar a la variedad vegetal específica, si bien se observó un efecto promotor del crecimiento. En estudios futuros se podrían repetir estos ensayos con la

finalidad de evaluar nuevamente la capacidad simbiótica entre esta y otras cepas de *S. fredii* y *Glycine max*

C6 Influencia del quorum sensing en el desarrollo de biofilm en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Malamud F.; Torres P.; Rigano L.; Marano M.R.; Castagnaro A.; Zorreguieta A.; Vojnov A. Fundación Pablo Cassará, Saladillo 2452, 1440 Buenos Aires, Argentina. fmalamud@fundacioncassara.org.ar

La síntesis de enzimas extracelulares y exopolisacáridos (EPS) en la enfermedad putrefacción negra de las crucíferas causada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) es regulada por un cluster de 9 genes, *rpfA-I* (del inglés "regulation of pathogenicity factors"). Muchos de estos genes están involucrados en la regulación mediada por una molécula de estructura lipídica de 12 átomos de carbono denominada *DSF* (del inglés "diffusible signal factor"). Trabajos anteriores demostraron que mutaciones (mediante la inserción de un trasposón) tanto en el gen *rpfF* como en el *rpfB* alteraron la producción de *DSF*, mientras que mutaciones en el gen *rpfC* provocaron a una sobreproducción de este compuesto. Además en medio L líquido se vio que estas mutantes crecían formando agregados recubiertos por una matriz, mientras que la cepa silvestre crecía en forma dispersa.

En este trabajo mostramos que la cepa silvestre en medio mínimo es capaz de formar una nueva estructura tridimensional ordenada del tipo *biofilm*, mientras que las cepas mutantes no lo son. Los experimentos se realizaron mediante la utilización de un microscopio confocal (CLSM) que permitió el análisis de las bacterias que expresan GFP en forma constitutiva. Se observó el crecimiento y el desarrollo de las microcolonias en *Xcc* hasta la formación del *biofilm*.

Una mutante incapaz de sintetizar EPS no logró formar estas estructuras. Complementaciones extracelulares de cultivos mixtos confirmaron el rol esencial del compuesto *DSF* en la modulación de la estructura *biofilm*. Cultivos mixtos de las mutantes EPS⁻ y RPF⁻ formaron estructuras típicas de *biofilm* incorporando a ambos tipos de bacterias.

C7 Caracterización de nuevos actinomicetes simbióticos (no-*Frankia*) fijadores de nitrógeno aislados de nódulos radiculares de *Alnus acuminata*.

Danay Valdés y Luis Wall

¹Programa de Investigación en Interacciones Biológicas, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. dvhens@unq.edu.ar.

A partir de nódulos radiculares de *Alnus acuminata* conservados a -20 °C y desinfectados superficialmente se obtuvieron actinomicetes fijadores de nitrógeno. Los mismos fueron capaces de deformar pelos radiculares en raíces de *Alnus acuminata* y algunos de ellos indujeron división celular en la corteza de la raíz y fueron capaces de desarrollar escasos nódulos cuando fueron inoculados en alta dosis en *A. acuminata*. De uno de estos nódulos se ha podido reaislar un actinomicete morfológicamente idéntico al originalmente utilizado en el inóculo. Morfológicamente, al microscopio óptico, estos actinomicetes no muestran el esporangio multiloculado típico del género *Frankia*. Algunos de los actinomicetes aislados estimulan la nodulación cuando son inoculados en una relación de 10:1 con la cepa de *Frankia* Arl3, infectiva en *Alnus*. Cuando algunos de estos actinomicetes se coinoculaban en *A. acuminata* en una relación 1:1 con la cepa heteróloga de *Frankia* BCU110501 aislada de *Discaria trinervis* y no infectiva en *Alnus*, encontramos que el aislamiento Aal4 se complementó fisiológicamente con la cepa BCU110501 para desarrollar nódulos maduros mientras que la inoculación control simple sólo desarrolló prenódulo en las raíces. En forma similar la coinoculación del aislamiento Aal5 con BCU110501 aumentó su infectividad y capacidad de nodulación. Para obtener una mejor caracterización morfológica los aislamientos Aal4 y Aal5 se cultivaron en medio con y sin nitrógeno y se estudiaron por Microscopía Electrónica de Barrido. El análisis de Aal4 y Aal5 reveló morfologías similares: filamentos de diferentes grosores, algunos con largas extensiones segmentadas, otros con ramificaciones de distinto largo, esporas lisas en forma de bacilo de largo variable dispuestas en pequeñas cadenas a veces ramificadas semejanado una mano o ramillete. En los cultivos sin nitrógeno, se observó en forma característica estructuras esféricas de 3 a 5 micrones de diámetro ubicadas en posición intermedia y en posición terminal en los filamentos que recuerdan las vesículas de *Frankia* o los heterocistos de las cianobacterias. La observación por Microscopía Electrónica de Transmisión de los nódulos inducidos por estos aislamientos reveló la presencia de vesículas septadas en células infectadas, indistinguibles de las vesículas descritas para *Frankia*. El análisis de la secuencia del gen 16s ARN de los aislamientos Aal4 y Aal5 demostró que están estrechamente relacionados con diferentes especies de *Nocardia*, sin embargo la morfología general no se corresponde con la descrita para este género, en particular la encontrada en medio sin nitrógeno. Nuestros resultados sugieren fuertemente el descubrimiento de un nuevo grupo de actinomicetes simbióticos con la capacidad de fijar nitrógeno, complementarse fisiológicamente para la nodulación con *Frankia* y desarrollar nodulación por sí solos en *Alnus acuminata* y otras especies de *Alnus*.

BIODIVERSIDAD Y BIORREMEDIACIÓN

C8 Aislamiento de bacterias con propiedades promotoras de la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Dias*, Romina L., Morelli, Irma S., Del Panno, María T.

CINDEFI-CONICET-UNLP. Calle 50 y 115 (1900) La Plata, Argentina. *rdias@biotec.org.ar.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) son contaminantes ambientales de relevancia por su toxicidad, mutagénesis y carcinogénesis. Su biodegradación en suelos es afectada por su baja solubilidad en agua y tendencia a adsorberse al material orgánico. Al aumentar su tiempo de residencia en suelo disminuye su disponibilidad, afectando su degradación y transporte. El éxito de la biorremediación de un suelo contaminado con PAH puede requerir del uso de bacterias degradadoras que promuevan la transferencia de sustratos hidrofóbicos mediante la producción de biosurfactantes, la presencia de sistemas de captura con alta afinidad por el sustrato, la adhesión a superficies hidrofóbicas o la actividad quimiotáctica. Si bien los cultivos de enriquecimiento en medio líquido han sido muy utilizados para seleccionar bacterias degradadoras, el aporte del sustrato en fase sólida podría permitir la selección de cepas con diferentes propiedades degradativas.

En este trabajo se estudió el crecimiento, propiedades superficiales, actividad quimiotáctica y degradadora de cepas aisladas de la superficie de una membrana de Teflón con fenantreno (FE) y pireno (PI) adsorbido, y de 2 aisladas del medio líquido. Las bacterias F1III, P3III y F13(2) se aislaron de la membrana-PAH, incubada 1 mes a 30°C con el sobrenadante de una suspensión de tierra en medio mineral líquido (MML). Las bacterias *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA (cortesía Coppotelli, B.) y MLAmo se aislaron directamente del líquido. F13(2) y MLAmo (bacilos Gram-positivos móviles no esporulados), P3III (bacilo Gram positivo no móvil esporulado), F1III y *S.p.* 20006FA (bacilos Gram negativos móviles no esporulados) degradaron FE. Los cultivos P3III y F1III también degradaron PI. Los cultivos aislados de membrana mostraron mayor velocidad específica de crecimiento ($> 0,9 \text{ h}^{-1}$) en MML-FE que en caldo R3. Los aislados del medio líquido mostraron μ bajos en ambos medios ($< 0,45 \text{ h}^{-1}$). P3III mostró μ comparables en ambos medios. No hubo relación entre las propiedades de adhesión a suelo e hidrofobicidad a n-hexadecano entre los cultivos, obteniéndose rangos de 70-100 % y 1-30 % respectivamente, sugiriendo que la adhesión a suelo no sería debido a interacciones hidrofóbicas. La marcada adhesión representa una ventaja selectiva en suelos antiguamente contaminados, favoreciendo el acceso a los PAH adsorbidos. Los cultivos de la membrana adhirieron significativamente en poliestireno. La adhesión a FE y PI, de estos cultivos fue variable, excepto F1III. Los cultivos del medio líquido no mostraron significativos niveles de adhesión a las superficies analizadas. Todas las bacterias (móviles y no móviles) mostraron quimiotaxis hacia FE y PI, propiedad que podría aumentar la eficiencia de degradación. Se determinó un % de eliminación en MML-FE del 13% para F13(2), 78.5% para MLAmo y 18.5% para *S.p.* 20006FA. En MML-PI, F1III eliminó 10.71 %, dato comparable a la eficiencia de eliminación de PI de un consorcio bacteriano y 10-100 veces mayor que otros cultivos puros. Estos resultados muestran que la técnica de enriquecimiento con PAH en fase sólida permite seleccionar bacterias con diferentes estrategias promotoras de la biodisponibilidad a PAH.

C9 Estudio de la degradación de hidrocarburos y respuesta quimiotáctica en microorganismos halófilos.

D'Ippólito, Sebastián¹, Herrera Seitz, K, Studdert, C y De Castro, R.

Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, UNMdP, Funes 3250, Casilla de Correo 1245, 4° Nivel, 7600, Mar del Plata.

1: dipolit@mdp.edu.ar

La degradación de hidrocarburos en presencia de sal resulta de especial interés para la biorremediación de ambientes tales como salinas y desechos industriales con elevado contenido de sal. Por otro lado, recientemente se ha planteado la posible importancia de la quimiotaxis en los procesos de degradativos ya que podría estimular la velocidad de biodegradación en ambientes naturales. El presente trabajo intenta contribuir a la comprensión de factores que pueden influir en la biodegradación de hidrocarburos en ambientes salinos. Con este objetivo, se estudiaron cepas de colección (en su mayoría haloarqueas) con conocida dependencia a condiciones salinas, analizando su capacidad de crecer utilizando hidrocarburos como única fuente de carbono. De aquellas cepas que crecieron utilizando hidrocarburos se estudió también el comportamiento quimiotáctico hacia sus sustratos específicos. De las cepas testeadas hasta el momento, *Haloflex mediterraneii* y *Halobacterium salinarum* (cepa R1) mostraron la capacidad de crecer utilizando gasoil como única fuente de carbono, y a su vez ambas cepas mostraron respuestas quimiotácticas leves hacia esta mezcla de hidrocarburos.

Paralelamente, a partir de una muestra obtenida de un ambiente salino (marisma de sudeste de la provincia de Bs.As.) también se obtuvieron microorganismos capaces de crecer a expensas de gasoil y de responder quimiotácticamente a estos contaminantes.

Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían que los microorganismos halófilos son potencialmente útiles en procesos de bioremediación de lugares contaminados con gasoil y esta habilidad se vería favorecida por el hecho de que además responden quimiotácticamente a los hidrocarburos.

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

C10 *NrfA*... ¿Estas ahí?: buscando a los riboreguladores de *Sinorhizobium meliloti*.

Patricio Sobrero y Claudio Valverde.

Programa Prioritario de Investigación sobre Interacciones Biológicas - Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes - Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Pcia. Buenos Aires. E-mail: cvalver@unq.edu.ar

En el escenario de la regulación de la expresión génica, las proteínas ya no son más los actores principales. Compartiendo el cartel se encuentran pequeñas moléculas de ARN no traducidas, denominadas sRNAs, que junto a proteínas de unión a ARN orquestan la *Riboregulación*.

Dicha *Riboregulación* ocurre, en la mayoría de los casos, sobre los ARNm blanco como resultado de la interacción antisentido con sRNAs, modificando la tasa de traducción o estabilidad del mismo. En estas interacciones se requiere la participación de una proteína colaboradora conocida en *E. coli* como Hfq. En el genoma del microorganismo simbiótico de los nódulos radicales de alfalfa, *Sinorhizobium meliloti* 2011, se detectó un ORF de 80 residuos anotado como NrfA con 47% de identidad con Hfq. Esto sugeriría la existencia en esta bacteria de procesos regulatorios que involucrarían a NrfA y sRNAs. Por ello, hemos comenzado a investigar la expresión y función de *nrfA* en *S. meliloti* 2011, así como la síntesis de sRNAs en esta bacteria fijadora de nitrógeno en simbiosis.

Para investigar la expresión del gen *nrfA*, se construyó una fusión transcripcional de la posible región promotora y el reportero *lacZ*. Esta construcción se integró por simple recombinación en *S. meliloti* 2011 para estudiar su patrón de expresión. Para evaluar la funcionalidad de NrfA en *E. coli*, se clonó *nrfA* en un vector multicopia bajo el promotor inducible P_{lac} . Se estudiará la capacidad de complementar una mutación *hfq* en *E. coli* para la replicación del fago Q β y la expresión de *rpoS*. Para investigar el fenotipo de un mutante *nrfA* en vida libre y en simbiosis con las raíces de alfalfa, se construyó un vector para reemplazo génico e introducción de una delección en *nrfA* y una inserción de un *cassette* de resistencia a kanamicina. Se está en proceso de selección de dobles recombinantes que hayan sufrido el reemplazo génico. En paralelo, se ha comenzado a analizar extractos de ARN total de *S. meliloti* en geles desnaturalizantes de poliacrilamida para determinar la expresión de sRNAs. Se presentarán los resultados preliminares obtenidos para los distintos enfoques planteados.

C11 Estudios sobre la regulación de la expresión del gen *gshB* (la glutatión sintetasa) de *Rhizobium tropici* en condiciones de estrés ambiental.

Muglia, Cecilia I., Aguilar, O. Mario.

Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calle 47 y 115 s/n, 1900 La Plata. E-mail cmuglia@biol.unlp.edu.ar

Los rizobios son microorganismos del suelo que se asocian simbióticamente con plantas leguminosas. La acidez del suelo disminuye la eficiencia de la nodulación, afectando el rendimiento de los cultivos. Los microorganismos, frente a las situaciones de estrés, responden activando mecanismos genéticos y metabólicos tendientes a la adaptación y el desarrollo en la nueva condición. Se ha demostrado que el glutatión, en *R. tropici*, juega un rol importante en la protección frente a diversos estreses ambientales. En particular en condiciones de acidez, esta bacteria induce un aumento transitorio de la transcripción del gen *gshB*, con un aumento concomitante en los niveles de glutatión intracelulares. Río arriba del gen *gshB* encontramos una secuencia similar a la descrita para promotores dependientes de σ^{70} de *R. etli* y de *S. meliloti*. Un fragmento de 152 pares de bases que la contiene es suficiente para promover la expresión del gen y para la respuesta positiva en condiciones de acidez. Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), utilizando extractos celulares totales de células incubadas en condiciones de acidez, se puso en evidencia una proteína que se une a este fragmento, que no estaría presente en extractos celulares obtenidos a partir de medio neutro. Este fragmento comprende una secuencia repetitiva invertida (IR) de 8 pares de bases, de secuencia CTTGCCGCN₆GCGGCAAG, capaz de formar una estructura secundaria de horquilla con un valor calculado de $\Delta G \sim 9$ kcal mol⁻¹. Se evaluó el significado de la integridad de la secuencia IR, alterando uno de los brazos de la misma y ensayando la capacidad de unir proteínas de extractos celulares mediante EMSA. El fragmento así mutado que no modifica su movilidad en presencia de extractos ácidos en los EMSA, demostrando que la secuencia repetitiva es necesaria para la unión específica a esta proteína. Proponemos que esta secuencia estaría relacionada con la unión a una proteína activadora en acidez. Nuestros resultados sugieren que la transcripción de *gshB* ocurre, a pH neutro, a través de un promotor dependiente de σ^{70} , mientras que, en condiciones de acidez, actuaría un factor de transcripción que se uniría a la secuencia repetitiva invertida, aumentando la expresión de *gshB*. Este podría ser la primer descripción de un activador de la transcripción en acidez encontrado en los rizobios.

C12 Colocalización de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la sacarosa en células de filamentos de *Nostoc* sp. pcc 7120 fijando dinitrógeno.

Clarisa Marcozzi y Graciela L Salerno; Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA), Vieytes 3103, 7600 Mar del Plata, Argentina cmarcozzi@fiba.org.ar

La sacarosa (Sac) es uno de los disacáridos más abundantes en la naturaleza, y hasta el momento, su presencia se ha descrito en organismos fotosintéticos

oxigénicos, como las cianobacterias y las plantas. Si bien el metabolismo de la sacarosa ha sido ampliamente estudiado en plantas, en los organismos procariotas este metabolismo fue sólo recientemente descrito. En *Nostoc* sp. PCC 7120, cianobacteria filamentosa fijadora de N₂, la síntesis de Sac se lleva a cabo a través de la acción secuencial de las enzimas sacarosa-fosfato sintasa (codificadas por los genes *spsA* y *spsB*) y sacarosa-fosfato fosfatasa (codificada por el gen *sppA*), y su degradación puede ser catalizada por las enzimas sacarosa sintasa (SuSA) o por las invertasas alcalino-neutras (InvA/B). En cianobacterias, la presencia de Sac ha sido asociada con el estrés osmótico y salino, y en el caso particular de las cianobacterias filamentosas, la Sac ha sido propuesta como molécula de transporte de C durante el proceso de fijación de N₂ desde las células vegetativas (CV) al heterocisto (HTC, célula diferenciada para la fijación del N₂). A pesar que se han presentado algunas evidencias indirectas que apoyan esta función, no se ha demostrado hasta la fecha que este disacárido fuera la molécula de transporte de C. Los heterocistos son células heterotróficas que en el proceso de diferenciación pierden la capacidad de fijar C y, por lo tanto, dependen del suministro de compuestos carbonados de la célula vegetativa. En nuestro laboratorio se demostró que el gen *spsB* se expresa tanto en los HTC como en las CV. Por el contrario, *spsA* se expresa principalmente en las CVs, al igual que *susA*. El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la función fisiológica de Sac y su relación con la fijación del nitrógeno. Particularmente, en el presente trabajo, se analiza la localización de la expresión del gen *sppA* en filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120 cultivados en condiciones diazotróficas. Se generó una construcción que contiene una fusión transcripcional de la proteína verde fluorescente (GFP) con la región promotora de *sppA*. Este plásmido se transfirió a *Nostoc* sp. PCC 7120 por conjugación con el fin de obtener una cepa mutante para estudiar la localización de su expresión del gen *sppA*. Teniendo en cuenta que frente a un déficit de nitrógeno combinado se produce la diferenciación de CVs a HTCs se analizó en el microscopio de fluorescencia la expresión de *sppA* en esta condición. Se observó emisión de fluorescencia de la GFP en ambos tipos celulares. Esto estaría indicando que SPP estaría presente tanto en las CVs como en los HTCs acompañando las actividades de SPS-A y SPS-B. Por lo tanto, la coexpresión de *spsB* y *sppA* en el heterocisto lleva a concluir que a pesar de que en su diferenciación pierden la capacidad de fijar CO₂, mantienen la de sintetizar sacarosa. Los resultados obtenidos sugieren que la Sac tendría también una función importante en la redistribución del carbono y en la asimilación diazotrófica del nitrógeno en filamentos de *Nostoc* sp. PCC 7120.

Financiado por ANPCyT, CONICET, Univ. Nac. de Mar del Plata y FIBA

C13 CarO, una proteína de membrana externa vinculada con la resistencia a carbapenemes, forma oligómeros en la membrana externa de *Acinetobacter baumannii*.

Relling Verónica, Mussi María A., Limansky Adriana, y Viale Alejandro.

IBR (CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Suipacha 531. 2000 Rosario, Argentina. E-mail: relling@ibr.gov.ar

Durante los últimos veinte años las infecciones hospitalarias producidas por bacterias Gram-negativas multirresistentes se han incrementado considerablemente hasta convertirse en un problema significativo. *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) es un diplococo Gram-negativo reconocido en la actualidad como un importante patógeno nosocomial, asociado a infecciones de alta morbi-mortalidad como neumonía, bacteremia e infecciones de la piel y del tracto urinario. La aparición de cepas resistentes a antibióticos β -lactámicos de última generación como los carbapenemes complica seriamente la terapéutica. Es por esto que el conocimiento y caracterización de los mecanismos de resistencia exhibidos por estas bacterias resultan necesarios.

Nosotros hemos demostrado que la resistencia a carbapenemes en aislamientos clínicos de *A. baumannii* está asociada con la desaparición de una proteína de membrana externa (PME), a la que denominamos CarO relacionada con el influjo de carbapenemes. Determinamos que la ausencia de CarO en aislamientos resistentes a carbapenemes se debe a la disrupción de su gen codificante por elementos de inserción. Sin embargo, análisis de las PME de variantes resistentes mediante SDS-PAGE e inmunodetección, así como identificación mediante MALDI-TOF indicó la existencia de variantes de CarO con elevado porcentaje de identidad con la proteína presente en cepas sensibles. Postulamos entonces que dichas variantes podrían presentar diferencias en la especificidad de CarO hacia carbapenemes u otras alteraciones funcionales.

Las porinas de ME de bacterias Gram- negativas forman oligómeros estables incluso en presencia de detergentes como SDS. Resultó entonces de interés estudiar la estructura cuaternaria de CarO en la ME de *A. baumannii* y su posible influencia en la capacidad de internalizar distintos compuestos. A tal fin se estudió el estado oligomérico de CarO en cepas sensibles y resistentes a carbapenemes que presentaban las distintas variantes mencionadas. Se obtuvieron las PME de estas cepas y se analizaron en geles bidimensionales SDS-PAGE. La primera dimensión permite separar complejos proteicos estables en función de su tamaño molecular, y la segunda dimensión desnaturante permite identificar las proteínas que forman oligómeros. La presencia de CarO en los complejos de ME se evidenció mediante inmunodetección. Nuestros resultados indican que las variantes de CarO presentes tanto en cepas sensibles como resistentes forman complejos en la ME de *A. baumannii*. Por lo tanto las mutaciones acumuladas en CarO de variantes resistentes a carbapenemes no resultaron en una desestabilización del estado oligomérico de esta proteína en la ME bacteriana.

BIOTECNOLOGÍA

C14 Estudio de bacterias inmovilizadas como biocatalizadores aplicables al escalado de reacciones de transglicosidación microbiana.

Nóbile, ML^a; Lewkowicz, ES^a; Iribarren, AM^{a,b}

^aDepartamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 352, (1876), Bernal, Buenos Aires, Argentina.

^b INGEBI (CONICET), Vuelta de Obligado 2490, (1428) Buenos Aires, Argentina.
e-mail: mnobile@unq.edu.ar

Está ampliamente difundido en la actualidad el uso de células enteras de bacterias como biocatalizadores para la preparación de una gran cantidad de compuestos de interés industrial. El desarrollo de un proceso involucra la selección del microorganismo más adecuado mediante técnicas de *screening*, la optimización de las condiciones experimentales a escala laboratorio y la adaptación del biocatalizador al escalado del mismo.

Con el fin de aumentar la estabilidad y la productividad del sistema, es usual utilizar al biocatalizador inmovilizado por metodologías de atrapamiento o encapsulación. El biocatalizador así obtenido puede ser empleado en reactores de tipos y configuraciones variables según las características físicas del polímero utilizado en la inmovilización, permitiendo el uso reiterado del mismo gracias a la facilidad de recuperación y separación del mismo del medio de reacción.

En nuestro laboratorio se han seleccionado bacterias capaces de llevar a cabo reacciones de transglicosidación para la obtención de fármacos de naturaleza nucleosídica y se están realizando ajustes y ensayos que permitan llevar a escala piloto este sistema. Para la inmovilización de los biocatalizadores fueron probadas diversas inmovilizaciones que involucran soportes poliméricos tanto naturales como sintéticos, orgánicos e inorgánicos, utilizando metodologías preexistentes o novedosas. Se realizaron estudios de actividad enzimática, resistencia mecánica, capacidad de agregación, reuso y características morfológicas y físicas que permitieron seleccionar el mejor biocatalizador inmovilizado para el fin requerido.

C15 Cultivos mixtos: complementación metabólica entre cepas y su relación con la calidad final del vino.

María Eugenia Rodríguez^{1,4}, Raúl Barbagelata¹, Nora Barda³, María Rosa Giraud^{2,4} y Adriana Caballero¹.
1. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ingeniería y 2. Laboratorio de Microbiología Aplicada, CRUB. Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén.
3. Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria, Asociación Civil (CIATI_{AC}), Villa Regina, Río Negro. 4. CONICET. e-mail: mer412@yahoo.com.ar

El uso de cultivos mixtos iniciadores en el proceso de vinificación aparece como una alternativa para la producción de vinos con una complejidad aromática similar a los obtenidos por fermentaciones naturales aunque de calidad controlada. El objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento en condiciones de vinificación de dos cepas indígenas de la Patagonia norte, *Candida pulcherrima* V₆ y *Saccharomyces cerevisiae* MMf9, seleccionadas según criterios específicos, con el fin de proponer su uso como cultivo mixto iniciador en enología. Se realizaron microvinificaciones (350 mL) con mostos moscateles sulfitados mono-inoculados con cada una de las cepas y co-inoculados con ambas. En este último caso cultivos puros de *Cp* V₆ y *Sc* MMf9 se inocularon en forma simultánea o secuencial. La densidad final de los inóculos fue de 1.10⁷ células/mL excepto en la fermentación simultánea en la que la densidad de *Sc* MMf9 fue 1.10⁵ células/mL. La co-inoculación secuencial se inició con *Cp* V₆ seguida de *Sc* MMf9 (quinto día). Las vinificaciones se realizaron por duplicado a 18°C. La cinética de crecimiento microbiano se siguió mediante recuento de UFC/mL en placas de GPY y la cinética de la fermentación por grados Brix. La evaluación fisicoquímica de los vinos obtenidos (pH, contenido alcohólico, azúcares reductores totales, acidez total y volátil, SO₂ libre y total) se realizó conforme a la metodología propuesta por el I.N.V., la caracterización de sus perfiles aromáticos (ésteres, alcoholes superiores y terpenos) mediante cromatografía gaseosa y su evaluación sensorial por personal entrenado del CIATI_{AC}. Las cinéticas de las fermentaciones y los parámetros indicativos de la calidad de los vinos estuvieron todos dentro de los rangos aceptados como normales para la escala ensayada, excepto para la vinificación mono-inoculada con *Cp* V₆ que mostró una cinética de fermentación detenida. El análisis de los perfiles aromáticos de los vinos mono-inoculados reveló que en las condiciones ensayadas la cepa *Cp* V₆ no presentó capacidad de sintetizar ésteres aunque resultó ser buena productora de alcoholes superiores, principalmente de alcohol isobutílico y de 2-feniletanol. Adicionalmente mostró capacidad de incrementar las concentraciones de α -terpineol, nerol y geraniol en el vino. Por su parte, *Sc* MMf9 resultó ser buena productora de ésteres y de alcohol isoamílico. Esta complementariedad metabólica se reflejó en la calidad de los vinos obtenidos por inoculación secuencial los que presentaron en general, mayores concentraciones de ésteres, alcoholes superiores y terpenos totales que los obtenidos por mono-inoculación con *Sc* MMf9, y en particular, concentraciones significativamente superiores de 2-feniletanol y α -terpineol, dos compuestos aromáticamente relevantes. Adicionalmente estos vinos presentaron las mejores características sensoriales distinguiéndose por sus

intensos aromas frutales (banana y ananá) y florales (rosas y fresias).

C16 Caracterización molecular de microorganismos marinos con potencial interés biotecnológico.

Cristóbal, Héctor A.¹; Alejandra M. López²; Javier D. Breccia¹ y Carlos M. Abate^{1,2,3}
¹PROIMI - CONICET Av. Belgrano y Pje. Caseros (4000).
²Fac. de Bqca., Qca. y Fcia. ³Fac. de Cs. Naturales. UNT. Tucumán, Argentina. cabate@proimi.org.ar

Los estudios y el interés comercial de la mayoría de las enzimas producidas a partir de microorganismos marinos han intensificado la búsqueda de nuevas especies como así también el desarrollo de su potencial tecnológico. Por lo tanto, se plantean nuevos objetivos e interrogantes a partir de la biodiversidad microbiana como fuente de potencial económico. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización taxonómica de microorganismos marinos aislados de la región subantártica y determinación de actividades enzimáticas de interés industrial. Las muestras fueron obtenidas a partir de distintas zonas costeras del Canal de Beagle (Tierra del Fuego, Argentina). Los microorganismos fueron aislados tras crecer en medios complejos (Peptona 0,05 g L⁻¹, Extracto de Levadura 0,05 g L⁻¹, cloruro de sodio 20 g L⁻¹) conteniendo como principal fuente de carbono: xilano, celobiosa, leche, quitina. La combinación de diferentes técnicas moleculares, tales como la amplificación de la región intergénica 16S - 23S (ITS), amplificación y secuenciación de genes 16S ADNr y genes *housekeeping* tales como el *gyr-B*; análisis ARDRA y RFLP realizados en ambos genes respectivamente; permitió establecer patrones de bandas que posibilitaron identificar y clasificar diferentes cepas como correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Halomonas*, *Serratia*, *Pseudoalteromonas*, pertenecientes a la subclase *Proteobacteria*. A través de amplificación por PCR y secuenciación se logró obtener fragmentos de 1.500 y 1.200 pb de los genes 16S ADNr y *gyrB* respectivamente. Las relaciones filogenéticas de los distintos grupos fueron establecidas a través de árboles filogenéticos utilizando los programas DNA-Man y Mega3. Por otro lado se caracterizó las siguientes enzimas activas en frío: beta-glucosidasas, xilanasas, proteasas y quitinasas, presentes en gran número de los microorganismos aislados.

Las bacterias marinas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, los cuales están siendo estudiados para mejorar los conocimientos sobre la fisiología, bioquímica, genética molecular y de esta forma comprender el papel que cumple en el medio ambiente. Muchas investigaciones han sido realizadas para examinar la biotecnología de enzimas producidas por estos microorganismos marinos, tales como xilanasas, celulasas, proteasas, beta-glucosidasas, alfa-rhamnosidasa, etc.; observando que las mismas presentan importantes aplicaciones a nivel industrial.

INTERACCIONES ENTRE MICROBIOS Y OTROS ORGANISMOS // BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

C17 T-DNA transfer and integration analysis in the genome of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor*.

Kemppainen M¹, Duplessis S², Martin F² & Pardo AG¹

¹Programa de Investigación en Interacciones Biológicas, Universidad Nacional de Quilmes. B1876BXD Bernal, Provincia de Buenos Aires, Argentina. ²INRA-Nancy 54280 Champenoux, France. E-mail: apardo@unq.edu.ar

Agrobacterium-mediated gene transfer (AMT) is currently opening a new era for fungal genetics. As whole genome sequences of several fungi are being released, studies about T-DNA integration patterns are needed in order to understand the integration mechanisms involved and to evaluate the AMT as an insertional mutagenesis tool for different fungal species. One of the outcoming genomes belongs to the homobasidiomycete *Laccaria bicolor*, an ectomycorrhizal fungus that forms symbiosis with several economically important tree species. This is the first mycorrhizal fungus to be sequenced. *Laccaria bicolor* was also recently transformed via AMT (Kemppainen et al. 2005) and the fact that its genomic sequence is becoming available makes this fungus an excellent model for studying T-DNA integration in symbiotic fungi. Here we present data on the integration pattern and conservation of the border regions of the T-DNAs in *Laccaria bicolor* genome obtained via a plasmid rescue approach. The plasmid-rescue binary vector was constructed using pBGgHg. The original sGFP-box was removed from the T-DNA with *SacI* and *XbaI* and ligated to pBluescript KS+ (Stratagene) creating the ampicillin rescue-plasmid pHg/pBks where the right border (RB) can be rescued with *SacI*. *Laccaria bicolor* S238N was transformed with *A. tumefaciens* AGL1 carrying the pHg/pBks according to Kemppainen et al. (2005). Genomic DNA of wild type and 51 transformed *Laccaria* lines was analysed for the presence of *hph*- and *amp*- transgenes by PCR. One to 3 µg of gDNA of transformed and PCR positive fungal lines were digested with *SacI*. The cut DNA was self-ligated, electroporated into *E. coli* and bacteria were plated on LB media supplemented with ampicillin. Up to 8 ampicillin resistant bacterial colonies were picked up from each plasmid-rescued *Laccaria* line and a plasmid linearization test was carried out with *SacI*. Rescued plasmids were sequenced for resolving the RB-gDNA junctions with the Post-RB primer. The sequences were analyzed for the T-DNA-gDNA junctions and ran against *Laccaria* genome in the JGI genome portal (<http://shake.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>). We showed that the plasmid rescue method can be used for resolving T-DNA integration sites in *Laccaria* genome. With the presented protocol we were able to rescue 74% of analyzed fungal lines and 62% could be sequenced with the Post-RB primer. The RB was shown to conserve well during transformation of *Laccaria bicolor*. The integration site analysis showed no clear sequence homology between different sites or the sites and the T-strand border sequences indicating non-homologous and random integration of the transgenes. Majority (74%) of integrations were located in potentially transcribed sites (interrupted ORFs or their upstream and downstream elements). Among these there were genes with proposed protein functions belonging to several cellular functional groups. Our results demonstrate that *Agrobacterium*-mediated transformation can be used for gene validation in *Laccaria*.

C18 Participación de la cadena O del LPS y la celulosa en las interacciones celulares de *rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* durante la formación de biofilms.

Daniela M. Russo, Diana M. Posadas, María Pía Brucini, Edmar Kannenberg (*), J. Allan Downie (**) y Angeles Zorreguieta.

Fundación Instituto Leloir, Conicet y FCEN-UBA. Av. Patricias Argentinas 435. Bs As. Argentina. (*) University of Turbingen. Alemania. (**) John Innes Centre. Reino Unido. drusso@leloir.org.ar

Hemos estudiado la capacidad formadora de biofilms del simbionte *R. leguminosarum* bv. *viciae* *in vitro*, utilizando cámaras de cultivo con base de borosilicato para observar las etapas de su desarrollo por microscopía confocal. Este proceso se inicia con el anclaje de las bacterias al soporte abiótico a través de los polos, continúa con la formación de microcolonias y el establecimiento de interacciones laterales y polares estrechas en forma de racimos para finalmente alcanzar una estructura con canales de agua. Basados en estudios genéticos propusimos un modelo para su formación *in vitro* en el cual el exopolisacárido ácido participa en el anclaje al soporte y forma parte de la matriz extracelular. La modificación de la longitud de sus cadenas mediante las glicanasas β 1, 4 PlyA y PlyB favorecería el desarrollo de una estructura madura en etapas tardías. Asimismo, otras proteínas extracelulares tipo adhesinas dependientes del sistema de secreción tipo I PrsD-PrsE participarían en las interacciones celulares.

Para completar este modelo, estudiamos dos polisacáridos de superficie involucrados en las interacciones entre el simbionte y la planta hospedadora, el lipopolisacárido (LPS) y las fibrillas de celulosa. Dos mutantes del LPS, B772 y B773, generadas por mutagénesis al azar por transposición fueron caracterizadas genéticamente. La inserción del Tn5 ocurrió en el gen de una putativa galactosil transferasa A (*lpcA*) involucrada en la biosíntesis del core del LPS en B772 y en el gen de una hipotética GDP-manosa deshidratasa responsable de la síntesis del precursor de la ramnosa (*lpsR*) del antígeno O en B773. El análisis por SDS-PAGE del LPS determinó que ambas mutantes son deficientes en la cadena O aunque mostraron diferente fenotipo de biofilm *in vitro*. La mutante *lpcA* interactuó a través de los polos, y no presentó uniones laterales, siendo incapaz de anclarse al soporte y formar un biofilm, mientras que *lpsR* estableció interacciones celulares sin evidente alteración en el anclaje ni en la estructura. Además, *lpsR* formó agregados celulares macroscópicos en el seno del cultivo que fueron disgregados con celulasa y mostró intensa coloración de las colonias con rojo congo, lo que sugirió la participación de la celulosa. Por interrupción del gen de la celulosa sintetasa *celA* y tinción con congo se demostró que la biosíntesis está reprimida en la cepa silvestre e inducida en *lpsR*, y que participa en las interacciones celulares suprimiéndose la formación de agregados en *lpsRcelA*. Sorprendentemente, las interacciones que presentó esta doble mutante fueron similares a B772 *lpcA*, formando cadenas de células en zig-zag, con ausencia de uniones laterales e incapacidad de desarrollar un biofilm. Esto indica que la inducción de la síntesis de celulosa suprime el defecto en el antígeno O en *lpsR*.

Estos resultados sugieren la participación de la cadena O del LPS en la adhesión al soporte, el establecimiento de interacciones celulares laterales y la formación del biofilm típico. Asimismo, la inducción de la síntesis de celulosa influiría en las propiedades de adhesión entre bacterias.

C19 The polyhydroxybutyrate genes of an antarctic *Pseudomonas* strain are situated within a genomic island-like region.

Nicolás D. Ayub*, M. Julia Pettinari, Beatriz S Méndez and Nancy I. López

Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. 1428- Buenos Aires.

* E-mail: nicoayub@qb.fcen.uba.ar

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are carbon and energy storage compounds that are accumulated by bacteria under unfavorable conditions. Accumulation and degradation of PHAs endows bacteria with enhanced survival, competition abilities and stress tolerance, increasing fitness in changing environments. Recently, we analyze the *phaRBAC* operon responsible for the synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Pseudomonas* sp. 14-3, a strain isolated from Antarctic environment, which shows high stress resistance in association with high PHB accumulation.

Based on physiological and genetic studies of *Pseudomonas* sp. 14-3 and its PHB accumulation capability, an uncommon feature in *Pseudomonas* species, we hypothesized that the increased fitness found in this strain, associated with high PHB production, is due to the acquisition of foreign PHB genes, included in a genetic element similar to genomic islands. This is the first time that PHB genes are found in this kind of genetic element.

The *phaRBAC* cluster from *Pseudomonas* sp. 14-3 was found within a large genetic element (32,3 kb). We identified 28 ORFs in this element. Functional assignment was possible for 23 of the ORFs. The region contains a phage integrase at its left end, followed by two ORFs related with DNA transfer. ORF7, situated upstream of the PHB cluster, was a sodium/glutamate symporter. Downstream of the PHB cluster and in the same orientation, we found a complete Type I protein secretion system composed of 4 ORFs. The right side of this region contained a high percentage of mobile elements or proteins associated with them. Several proteins: an integrase, ParA, TraF, ORF20, ORF27 (helicase) and ORF28 (nuclease) were found to be highly similar to proteins found within genomic islands. The average percent G+C content was 58.8%, close to that of the genus *Pseudomonas*, but it was not uniform. The heterogeneity within the region involving the PHB genes was due to a different %GC between *phaRBC* (57%) and *phaA* (67%), indicating that *phaBAC* is a mosaic operon. Phylogenetic trees for PHB proteins showed that PhaA of *Pseudomonas* sp. 14-3 has a different origin than PhaB and PhaC. In previous works we analyzed the role of *pha* genes in bacterial survival and stress resistance. These results suggest that horizontal gene transfer of *pha* genes is a mechanism of adaptability to changing environments.

POSTERS

BACTERIAS DEL ACIDO LACTICO

P1 La fermentación de soja con *Lactobacillus fermentum* CRL 722 disminuye la producción de hidrógeno asociada a su consumo.

Jean Guy LeBlanc¹, Fernando Sesma¹, Jean-Christophe Piard², y Graciela Savoy de Giori^{1,3}

1-Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Chacabuco 145. Tucumán-Argentina (T4000ILC)

Tel: +54 (381)4310465. Email: gsavoy@cerela.org.ar

2- Unité des Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes INRA. Jouy-en-Josas, Francia

3-Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Fac. Bqca., Qca. y Fcia. Cát. Microbiología Superior.

Estaquiosa y rafinosa, α -galactooligosacáridos (α -GOS) presentes en productos de soja, frecuentemente resisten la digestión y la absorción en el intestino delgado ya que los animales monogástricos (incluyendo los humanos) no poseen la enzima α -galactosidasa (α -Gal) necesaria para hidrolizarlos. En consecuencia, los α -GOS alcanzan el intestino grueso donde son fermentados por la microbiota colónica produciendo gases (CO_2 , H_2 y CH_4) los cuales pueden provocar efectos fisiológicos indeseables (hinchazón abdominal, flatulencias, náuseas y diarreas) en individuos sensibles. Microorganismos con actividad α -Gal constituyen una alternativa promisoriosa para eliminar α -GOS de los productos de soja. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que *Lactobacillus* (*L.*) *fermentum* CRL 722 posee elevada actividad α -Gal y puede, mediante fermentación, degradar estaquiosa y rafinosa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *L. fermentum* CRL 722, utilizada como cepa iniciadora, de disminuir la producción de gases normalmente asociada al consumo de α -GOS presentes en leguminosas como la soja. Para ello, se puso a punto un sistema modelo animal constituido por ratas monoxénicas (conteniendo una cepa comensal de *Clostridium butyricum*) colocadas en cámaras respiratorias con un circuito de aire cerrado, lo que permite registrar los gases resultantes de la fermentación colónica. Este sistema fue validado mediante inoculación intragástrica de extracto acuoso de soja (control positivo) o el mismo tratado con α -Gal comercial a fin de degradar los α -GOS (control negativo). Los resultados indicaron que el extracto de soja indujo una significativa producción de gas (hidrógeno) en las ratas no observándose lo mismo con el producto de soja tratado enzimáticamente. Utilizando este modelo, se demostró que *L. fermentum* CRL 722 fue capaz de disminuir la producción de gases asociada a la presencia de α -GOS en soja ya que las ratas que recibieron el sustrato fermentado con esta bacteria láctica mostraron una producción de hidrógeno significativamente menor a aquellas alimentadas con el producto sin fermentar. *L. fermentum* CRL 722 podría usarse como organismo modelo para la selección de cepas con actividad α -Gal las cuales podrían prevenir la producción de gas asociada al consumo de numerosos productos alimenticios derivados de legumbres como es la soja que contiene elevadas concentraciones de α -GOS.

P2 Caracterización inmunoquímica de proteínas de capa-S de *Lactobacillus kefir*. diferencias con *L. parakefir* y *L. brevis*.

Serradell, MA^{1,2,3}; Mobili^{1,4}, P; Garrote, GL^{1,2,4}; Abraham, AG^{1,4}; Fossati, CA^{3,4}; De Antoni, GL^{1,2,5}.

1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA); 2) Cátedra de Microbiología, Cs Exactas, UNLP; 3) Cátedra de Inmunología, Cs Exactas, UNLP; 4) CONICET; 5) CICPBA: maserr@biol.unlp.edu.ar

La capa-S es una estructura superficial cristalina bidimensional formada por subunidades constituidas por una o dos proteínas o glicoproteínas, unidas entre sí de manera no covalente. Se ha sugerido la participación de la capa-S en la adherencia de diferentes especies de lactobacilos a células de epitelio intestinal y a componentes de matriz extracelular. Estudios previos realizados por nuestro laboratorio demostraron mediante SDS-PAGE y microscopía electrónica de transmisión, la presencia de capa-S en lactobacilos heterofermentativos aislados de kefir. Dichas cepas presentan diferentes propiedades de superficie por lo que nos planteamos como objetivo caracterizar las proteínas de capa-S diferentes lactobacilos empleando anticuerpos específicos.

Con tal fin, se obtuvieron dos antisueros en conejo empleando como inmunógenos las proteínas de capa-S de *L. kefir* CIDCA 8321 aislada de gránulos de kefir (Ac21) y *L. brevis* ATCC 8287 (Ac87) respectivamente. El Ac21 mostró reactividad por ELISA e inmunoblotting frente a proteínas de capa-S de distintos aislados de *L. kefir* y *L. parakefir*, pero no frente a *L. brevis*. De la misma manera el Ac87 mostró reactividad por dot-blot frente a proteínas de capa-S de *L. brevis*, mientras que no lo hizo frente a las de *L. kefir*.

Por otra parte, se obtuvieron 3 anticuerpos monoclonales (1F8, 4H6 y 5F8) específicos de capa-S de *L. kefir* CIDCA 8348. Se observó que dichos anticuerpos monoclonales presentan perfiles de reactividad diferentes tanto por ELISA como por inmunoblotting frente a proteínas de capa-S de distintos aislados de *L. kefir* y no reaccionan con proteínas de capa-S de *L. brevis*. Resultados similares se obtuvieron al realizar ensayos de dot-blot con bacteria entera.

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican la presencia de epitopes de reactividad cruzada entre proteínas de capa-S de *L. kefir* y *L. parakefir*, pero no con capa-S de *L. brevis*. Asimismo, los distintos perfiles de reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a los aislados de *L. kefir* sugieren la existencia de diferencias estructurales entre las proteínas de capa-S dentro de la misma especie, las cuales parecerían correlacionar con diferencias en las propiedades de superficie de los aislados estudiados.

INTERACCIONES ENTRE MICROBIOS y OTROS ORGANISMOS

P3 Estudio de complementación fisiológica para la nodulación entre *Frankia* y plantas actinorrhizas heterólogas.

Luciano A. Gabbarini y Luis G. Wall

Programa de Investigación en Interacciones Biológicas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Saénz Peña 352, Bernal (B1876BXD), Buenos Aires, Argentina.

Se denomina simbiosis actinorrhiza a la relación que se establece entre bacterias Gram positivas del género *Frankia* y plantas, en su gran mayoría leñosas, distribuidas en 200 especies, 25 géneros y 8 familias. La simbiosis desarrolla un nódulo radicular, dentro del cual la bacteria fija nitrógeno atmosférico. Se han descrito dos mecanismos de infección por los cuales *Frankia* ingresa a la planta: infecciones intracelulares a través de pelos radiculares deformados e invasiones intercelulares en las cuales *Frankia* ingresa degradando laminilla media. La simbiosis actinorrhiza presenta fenómeno de reconocimiento que definen grupos de inoculación cruzada. El conocimiento de señales difusibles en esta simbiosis es muy escaso y muy limitado. La coinoculación sobre *D. trinervis* de BCU110501 (infectiva en *D. trinervis*) con concentraciones crecientes de Arl3 (infectiva en *A. acuminata*) conduce a una disminución en el tiempo inicial de nodulación y una aumento en el número final de nódulos. Por el contrario, la coinoculación sobre *A. acuminata* de Arl3 (infectiva en *A. acuminata*) con concentraciones crecientes de BCU110501 (infectiva en *D. trinervis*) sobre *A. acuminata* conduce a un acortamiento en el tiempo necesario para la aparición del primer nódulo pero a un menor número final de nódulos por planta. BCU110501 deforma pelos radiculares e induce división celular en la corteza de *A. acuminata* en forma similar a Arl3. Analizando la infectividad del machacado de nódulos coinoculados, sobre ambas plantas por separado, y por otro lado analizando el RFLP de la región intergénica 16s - 23s amplificada por PCR de DNA extraído de vesículas separadas de nódulos, se concluye que no existiría coinfección en los nódulos coinoculados. Se diseñaron luego una serie de experimentos para estudiar posibles complementaciones fisiológicas para obtener una nodulación heteróloga (por definición y origen de los aislamientos). Los intentos utilizando la coinoculación con factores difusibles de *Frankia* o de la planta no dieron resultados positivos para la infección y nodulación de la cepa no infectiva, en ninguna de las plantas actinorrhizas ensayadas, *Alnus acuminata* o *Discaria trinervis*. Estos resultados plantean la existencia de factores superficiales de *Frankia* necesarios para el reconocimiento. En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que BCU110501 y Arl3 poseen algunas señales difusibles de interacción con la planta comunes, pero no comparten una señal específica de reconocimiento necesaria para la infección y ocupación del nódulo que no sería fácilmente transferible en *trans*.

P4 Estudios sobre la función y regulación de la porina OprF en *Pseudomonas fluorescens* CHA0.

María Cecilia Álvarez Crespo y Claudio Valverde.

Programa Prioritario de Investigación sobre Interacciones Biológicas - Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes - Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Pcia. Buenos Aires. E-mail: cvalver@unq.edu.ar

Pseudomonas fluorescens CHA0 es una rizobacteria, capaz de proteger a diferentes plantas de cultivo de enfermedades de la raíz provocadas por hongos patógenos. Esta protección es posible, a través de la producción de metabolitos secundarios que se encuentran sometidos a un control estricto por la cascada global de regulación post-transcripcional Gac/Rsm. El sistema de dos componentes GacS/A activa la transcripción de tres pequeños ARN regulatorios (RsmX/Y/Z) que antagonizan el efecto represor de las proteínas de unión a ARN RsmA/E sobre los sitios de unión a ribosoma (RBS) de los ARNm regulados. En base a la secuencia mínima de reconocimiento en torno al RBS requerida para la regulación del operón *hcnABC* (regulado por Gac/Rsm), se detectó en una búsqueda en el genoma de *P. fluorescens* Pf5 un motivo secuencial alrededor del RBS del gen *oprF*, que codifica la proteína mayoritaria de membrana externa, altamente conservada en *Pseudomonas*. Es una porina inespecífica, involucrada en el mantenimiento de la estructura celular y en el crecimiento en condiciones de baja osmolaridad. Además presenta características de adhesina interviniendo en la adhesión a diferentes superficies según la especie, como células epiteliales de pulmón y a raíces de trigo.

Para determinar si en *P. fluorescens* CHA0 OprF interviene en la adhesión y colonización de raíces, se obtuvo el mutante *oprF* ARQ22. La comparación del patrón de proteínas de CHA0 y ARQ22 en SDS-PAGE y la identificación mediante MS-MALDI-TOF luego de digestión triptica, reveló que OprF es la proteína más abundante en la membrana externa de CHA0. El mutante *oprF* presentó menor longitud celular y menor tasa de crecimiento en medio mínimo, respecto a CHA0. Ensayos preliminares mostraron que la adhesividad de ARQ22 a raicillas de pepino (una especie protegida por CHA0 contra el oomicete *Pythium ultimum*) fue significativamente menor que la de la cepa silvestre CHA0.

Para analizar si el gen *oprF* se encuentra bajo control del sistema global Gac/Rsm, se determinó la expresión de una fusión *oprF-lacZ* en derivados de CHA0 mutados en diferentes efectores de la cascada. Si bien el patrón de regulación de *oprF* presentó semejanza a lo esperado para un ARNm bajo el control de Gac/Rsm, la magnitud fue mucho menor. La introducción de una única sustitución A→C en la secuencia líder de *oprF*, de manera de obtener una homología total con la región blanco del operón *hcnABC*, puso a la fusión mutante bajo un control estricto por parte del sistema Gac/Rsm. Este cambio de comportamiento podría estar relacionado a la formación de una estructura secundaria local con mayor estabilidad. Esto sugiere, que la similitud de secuencia no es un requisito suficiente para la regulación por Gac/Rsm, sino que existiría un requerimiento de estructura secundaria en la región próxima al sitio de unión ribosomal del ARNm para ser reconocidos con mayor eficacia por las proteínas represoras RsmA/E.

P5 Las terpenos ciclasas son promovidas por *Trichoderma harzianum* en tres especies aromáticas autóctonas de argentina.

Ana C. Cohen, Mariela A. Pontin y Patricia N. Piccoli
Cát. Quím. Org. Y Biológica, Fac. Cs. Agrarias-CONICET,
Univ. Nac. Cuyo, Alte. Brown 500, M5528AHB, Chacras de
Coria. Email: ppiccoli@fca.uncu.edu.ar

Las plantas medicinales y aromáticas son económicamente importantes, con un incremento exponencial de la demanda mundial. En Argentina, se han identificado 66 especies autóctonas con propiedades aromáticas y medicinales. Los componentes químicos de interés farmacéutico-culinario de aromáticas se dividen en dos clases según su origen biosintético: 1) terpenos, originados por la vía isoprenoide y 2) fenilpropanos, compuestos aromáticos que forman los aceites esenciales provenientes de la vía del ácido shiquímico. Los terpenos están formados por unidades isopreno siguiendo dos vías, a partir de vía ácido mevalónico (MAV) y vía deoxixilulosa 5-fosfato (DOXP/MEP). Estos compuestos son importantes además como agentes de resistencia a patógenos, antibióticos o agentes antitumorales. Se ha establecido que su síntesis está regulada por dos tipos de enzimas elicidadas alternativamente, las sesquiterpeno-ciclasas (TPS) y las esqualeno-sintasas (ES). Vía MVA, mediante una cascada de reacciones, el FPP producido mediante las TPS da origen a sesquiterpenos tipo fitoalexinas y esqualeno, principal intermediario en la síntesis de esteroides, vía esqualeno sintasa. Ante factores bióticos la planta reacciona elicitando fitoalexinas e inhibiendo la síntesis alternativa de las esqualeno sintasas.

Por otra parte, se sabe que *Trichoderma harzianum*, hongo endofítico de plantas, inhibe el crecimiento de patógenos de suelo como *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Phytophthora sp* y *Monilophthora sp.*

En *N. tabacum* y *L. esculentum*, ante el ataque de un patógeno se elicitan enzimas relacionadas a mecanismos de defensa por parte de la planta como la fenilalanina-amonioliasa y las sesquiterpeno ciclasas. En resultados previos encontramos que esto ocurre en desmedro de la producción de esteroides por inhibición en la actividad esqualeno sintasa. Este trabajo se centra en tres especies con propiedades nutraceuticas interesantes para su estudio: *Achyrocline satureioides* (marcela), *Marrubium vulgare* (yerba del sapo) y *Verbascum tapsus* (ambay). El objetivo fue evaluar la actividad sesquiterpeno-ciclasas y los cambios en el nivel de transcriptos en las tres especies aromáticas ante *T. harzianum*. Plantas de *A. satureioides*, *M. vulgare* y *V. tapsus*, de 30 días se inocularon con *T. harzianum* y a las 24 h se alimentaron con ³H-FPP. A 0, 3, 6, 12, 18, 21, 24 y 32 h, se analizó la proporción de sustrato convertido en esteroides o terpenos tanto en presencia como en ausencia del hongo. El tratamiento con *Trichoderma* promovió la síntesis de terpenos en detrimento de esteroides, de igual modo que esqualostatina, un inhibidor de la síntesis de los últimos. Asimismo, el nivel de sus transcriptos, como RNA total aumentó significativamente entre las 3 y 6 h de la inoculación fúngica, mientras que no varió en los tratamientos con esqualostatina. Los resultados sugieren que *T. harzianum* promueve la síntesis de sesquiterpenos, tanto de modo indirecto al inhibir la actividad esqualeno-sintasa, como promoviendo las sesquiterpeno-ciclasas.

P6 Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de distintos genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*).

de Estrada, Mercedes; Soria, Marcelo A.; Correa, Olga S.
Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía.
UBA. Av. San Martín 4453. Bs. As. estradam@agro.uba.ar

La introducción de una bacteria promotora del crecimiento, como lo es *Azospirillum brasilense*, puede modificar la composición de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de las plantas debido, principalmente, a las relaciones de competencia que se establecen entre los microorganismos para lograr la colonización del ambiente rizosférico. Los objetivos de este trabajo fueron comparar los perfiles metabólicos de las comunidades microbianas asociadas a las rizosferas de tomate cherry y redondo y, evaluar el impacto que tienen diferentes cepas de *A. brasilense* sobre esas comunidades microbianas. Se realizó un ensayo en el cual semillas de tomate cherry y redondo fueron inoculadas con cultivos de distintas cepas (Sp 7, BNM 65, BNM 227 (Az 39) y Sp 245) de 48 h de crecimiento, llevados a una A₆₀₀ 0.5. Las semillas fueron sembradas en bandejas con sustrato no estéril de tierra-arena (80:20). Luego de 40 días de crecimiento en cámara, se obtuvieron los extractos rizosféricos de cuatro plantas por cada tratamiento. Los extractos se incubaron por 18 h, luego de lo cual, se sembraron en Ecoplacas Biolog®, a fin de evaluar la utilización de 31 sustratos carbonados y obtener el perfil metabólico de cada comunidad microbiana (CLPP). Las placas se incubaron en estufa a 28°C, se hicieron lecturas de A₆₀₀ cada 12 h y se realizó un análisis de Componentes Principales de los resultados obtenidos. Se encontraron diferencias en los CLPPs asociados a cada genotipo. La inoculación con las diferentes cepas tuvo un efecto mayor en tomate redondo que en cherry, en el cuál los perfiles metabólicos generados por los tratamientos mostraron una mayor similitud con respecto al control. Los CLPPs asociados a los tomates inoculados con la cepa Sp 245 fueron similares a los controles en ambos genotipos. En cuanto a las cepas Sp 7, BNM 227 y BNM 65 produjeron cambios en la comunidad del tomate redondo pero no en el caso del tomate cherry. Los CLPPs de las plantas inoculadas con las cepas BNM 227 y BNM 65 fueron similares en ambos genotipos, mostrando una gran estabilidad. También se evaluó el peso seco de las plantas y, si bien no se encontraron diferencias significativas, en tomate redondo las plantas inoculadas tuvieron un aumento de alrededor del 20 %. Para tomate cherry la respuesta fue mas errática, las cepas Sp 245 y BNM 65 tuvieron un leve efecto negativo, disminuyeron el peso en aproximadamente el 4%, en tanto que las cepas Sp 7 y BNM 227 no lo modificaron. En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que cada genotipo de tomate tiene asociadas comunidades microbianas diferentes. Existiría una interacción cepa-genotipo, la inoculación con una misma cepa puede tener diferentes efectos sobre las comunidades microbianas asociadas a cada genotipo. Por otro lado hay cepas, como la BNM 227 y BNM 65, que anulan el efecto del genotipo.

P7 Caracterización de microorganismos asociados a semillas de arroz.

Dante E. Ruiz, Luis G. Wall y Claudio Valverde.

Programa Prioritario de Investigación sobre Interacciones Biológicas - Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes - Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Pcia. Buenos Aires. E-mail: cvalver@unq.edu.ar

Los microorganismos endófitos (bacterias y hongos) son aquellos que viven la mayor parte de sus vidas en los tejidos de las plantas que colonizan, sin provocarles un daño aparente. Por otra parte, las bacterias denominadas PGPR pueden tener efectos beneficiosos sobre las plantas afectando al crecimiento o la salud del huésped a través de sus interacciones con las raíces que colonizan. En este trabajo, se presentarán los resultados preliminares de la caracterización de la flora bacteriana presente en semillas de arroz que se utilizan en cultivos de nuestro país.

En general, los endófitos de arroz descriptos previamente se han obtenido a partir de raíces o tejido aéreo, y son escasos los estudios de endófitos en semillas. La colonización de las semillas puede ser una estrategia para asegurar la transmisión vertical de endófitos. En un trabajo previo, reportamos el aislamiento de dos cepas de *Pantoea* sp. obtenidas de semillas esterilizadas superficialmente y germinadas con cáscara de arroz var. CT6919, y su capacidad de colonización de las raicillas de arroz. Se comprobó la presencia de una variada flora bacteriana en macerados de semillas esterilizadas superficialmente con cáscara en otras variedades de arroz (PUITA, CAMBA, IRGA 417, RP2 y PASO 144), pero no fue posible recuperar colonias bacterianas cuando las semillas se esterilizaron sin cáscara. Esto indicaría que la colonización de las semillas parece ser un fenómeno común en esta especie vegetal. Nos interesa conocer si las especies presentes en las semillas confieren alguna ventaja al momento de la germinación y en el desarrollo temprano de los plantines de arroz (efectos PGPR). Las semillas de arroz podrían obtener beneficios al portar endófitos que se convierten en los primeros organismos en hacer contacto con las raíces emergentes durante la germinación, permitiendo una rápida colonización del sistema radicular. Por ejemplo, las semillas de arroz CT6919 germinadas con cáscara son capaces de resistir el ataque del hongo *Curvularia* sp. (aislado a partir de CT6919) *in vitro*, pero las semillas germinadas sin cáscara se muestran indefensas al mismo aislamiento fúngico. Por ello, se extendió la caracterización de los microorganismos presentes en un macerado de semillas de arroz CT6919 esterilizadas con cáscara. Se obtuvieron 16 aislamientos de crecimiento rápido (24-48 hs) y 16 aislamientos de crecimiento más lento (48-96 hs). Además de registrar sus características morfológicas y la producción de acilhomoserina lactonas (AHLs), se analizó la capacidad diazotrófica (crecimiento en medio libre de N), de solubilización de fosfato de calcio, y de inhibición del aislamiento fúngico *Curvularia* spp. La identificación de los aislamientos morfológica y fisiológicamente diferentes se encuentra en progreso.

P8 Co-inoculación de plantas de soja, *Glycine max* (L) merr., con *Bradyrhizobium japonicum* E109 y varias potenciales bacterias indígenas promotoras del crecimiento vegetal.

Mariana León, Pablo Yaryura, Alejandra Hernández, Norma Pucheu, Norma Kerber, Augusto García
IBYF-CONICET, Cátedra de Microbiología Agrícola-FAUBA
Av. San Martín 4453 (C1417DSE), leonmari@agro.uba.ar

Dentro del marco de la agricultura sustentable nos encontramos estudiando el cultivo de soja y el biocontrol de enfermedades producidas por hongos de suelo como modelo para la aplicación de mezclas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Hemos aislado, identificado y caracterizado varias cepas provenientes de suelos agrícolas de la provincia de Buenos Aires. Seleccionamos 6 de los aislamientos para bio-ensayos, estas cepas son: BNM113, un aislamiento de *Bacillus amyloliquefaciens* con una marcada actividad biocida, tanto su actividad bactericida como fungicida podría estar relacionada con la producción de compuestos del tipo iturinas sumada a la actividad surfactante; BNM117, una cepa *Bacillus* sp., con actividad bactericida menor, no antagoniza contra distintas especies de rizobios, tiene mayor actividad surfactante que BNM113 sin estar relacionada con la producción de iturinas y produce auxinas en concentraciones de 15 µg/ml.; BNM141 y BNM142, dos aislamientos de *Pseudomonas putida*, ambos producen sideróforos y parte de su actividad antagónica estaría relacionada con esta propiedad, BNM141 tiene baja capacidad bactericida, no antagoniza con *Bradyrhizobium japonicum* E109 mientras que BNM142 es altamente bactericida, produciría compuestos antifúngicos volátiles, pirrolnitrina, pioluteorina y además solubiliza fósforo; BNM143 un aislamiento gram negativo aún no identificado por completo, tiene menor actividad bactericida que BNM142, no antagoniza con rizobios, produce sideróforos, tiene actividad surfactante, produciría pirrolnitrina, pioluteorina y solubiliza fósforo; finalmente BNM145 es una cepa de *Burkholderia cepacia* con propiedades semejantes a BNM142 pero sin antagonismo hacia *B. japonicum* E109.

Para evaluar el efecto de la co-inoculación de las cepas seleccionadas junto con la cepa noduladora comercial *B. japonicum* E109, llevamos a cabo tres ensayos en invernáculo. Se inocularon plántulas de dos días, con una mezcla 1:1 de cada cepa y E109 y plantas sólo inoculadas con E109 como control. Luego de 40 días se evaluó el número de nódulos, se verificó la actividad fijadora y se registró el peso seco de nódulos, raíz y vástago de las plantas ensayadas. Los datos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza y aplicación del test de menor diferencia significativa (LSD). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$. Ninguna de las cepas perjudicó la nodulación de las plantas. La cepa BNM113 promovió el aumento en el número de nódulos y peso de los mismos, pero no se observaron aumentos significativos en el peso seco de raíz y vástago. La cepa BNM142 también produjo un aumento en el número de nódulos y resultó en un aumento del 13% del peso seco de vástago. La cepa BNM141 no aumentó el número de nódulos en forma significativa pero dio valores de peso seco tanto de raíz como de vástago mayores al control. Finalmente la co-inoculación con la cepa BNM117 dio mayor peso seco de vástago en uno de los ensayos y no en el otro.

Por lo tanto las cepas seleccionadas son buenas candidatas a formar parte de inoculantes mixtos.

P9 ¿Existe relación entre las comunidades de bacterias rizosféricas y el grado de dominancia de las especies vegetales?

Eugenia Menoyo¹, Silvina I. Ballesteros¹, Mónica A. Lugo¹, Marcela A. Ferrero² y Faustino Siñeriz^{2,3}.

¹Lab. de Ecología, Universidad Nacional de San Luis, Argentina. ²PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos)- CONICET, Tucumán, Argentina. ³Cát. Microbiología Superior, Fac. de Bqca., Qca. y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. emenoyo@gmail.com

Las comunidades bacterianas del suelo pueden ser influidas por factores bióticos y abióticos. Las raíces de las plantas tienen asociada una comunidad microbiana, la que varía en función de la composición y estructura de la vegetación. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la densidad de bacterias rizosféricas en relación al grado de dominancia de las plantas hospedantes. Con el propósito de investigar dichas asociaciones, bacterias-plantas, se seleccionaron 4 sitios a lo largo de un gradiente altitudinal, entre las localidades de Iturbe (Provincia de Jujuy) e Iruya (Provincia de Salta). En cada sitio se delimitaron 4 parcelas réplicas en cada una de las cuales se recolectaron individuos de las especies vegetales dominantes y subordinadas. Posteriormente, se determinó la abundancia de bacterias rizosféricas mediante la técnica de recuento directo en placa (UFC grs⁻¹ suelo), utilizando el medio de cultivo para heterótrofos R2A. Los datos se analizaron utilizando análisis de la varianza y de correlación no paramétrico. La densidad de bacterias difirió significativamente según el grado de dominancia de las plantas hospedantes, este patrón se observó en cada uno de los sitios estudiados como así también a lo largo del gradiente altitudinal. Dichas variables (densidad bacteriana y grado de dominancia) se correlacionaron positivamente. El factor especie hospedante también hizo variar la densidad bacteriana a lo largo del gradiente altitudinal. Se puede concluir que la densidad de bacterias rizosféricas presenta una estrecha relación con el grado de dominancia de gramíneas hospedantes típicas de la Provincia fitogeográfica de la Puna.

P10 Interacción DSE – planta. Actividad enzimática fúngica extracelular.

Ana Mercuri, Luis Diorio, Alicia Godeas

Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pab II (1428) Buenos Aires, Argentina. e-mail de contacto: amercuri@bg.fcen.uba.ar

Se denomina DSE (por la sigla en inglés de dark septate endophytes) a un grupo heterogéneo de hongos conidiógenos o estériles habitantes del suelo que son capaces de colonizar raíces de plantas. Su comportamiento es similar a los hongos saprofiticos habitantes del rizoplaneo, hongos patogénicos obligados o facultativos y hongos micorrizicos en cuanto a su función y su rol ecológico. Son hongos cosmopolitas: han sido encontrados en los trópicos, zonas árticas y alpinas, y en cerca de 600 especies vegetales que representan aproximadamente 320 géneros y 100 familias. Aunque son abundantes en diversos ambientes y especies, su interacción con las plantas es poco conocida. Se han encontrado resultados inconsistentes debido mayormente a la heterogeneidad del grupo DSE.

En este trabajo se midió el crecimiento y la actividad enzimática del hongo DSE N° 01 en distintos medios de cultivo artificiales con el objetivo de estudiar su comportamiento. El DSE fue cultivado durante 20 días en medio sintético con asparagina como fuente nitrogenada y pectina, celulosa cristalina o xilano como fuente carbonada. Se midió la actividad pectinasa, endoglucanasa y xilanasa, y el crecimiento a través del peso seco, el contenido de proteínas y los azúcares reductores. Se observó que el tipo de medio de cultivo afectó las actividades enzimáticas.

El medio con celulosa cristalina no fue favorable para el hongo ya que no se observaron actividades enzimáticas. Por el contrario en los otros dos medios sí se encontró actividad pectinolítica, xilanolítica y pequeños picos de actividad celulólitica. En el medio con pectina la actividad polimetilgalacturonasa mostró con una tendencia creciente, con un pico de actividad en el día 10. En cambio en el medio con xilano la misma actividad tuvo un nivel 10 veces menor y con mayor actividad entre los 6 y los 12 días de crecimiento. La actividad xilanasa fue 3 veces mayor en el medio con xilano, observándose una mayor actividad entre el día 8 y el 16 en este medio; en el medio con pectina se vio mayor actividad entre los días 3 y 14.

Por lo tanto se puede concluir que este DSE tiene el potencial para infectar e interactuar con las plantas, ya que posee el pool de enzimas necesario.

P11 Colonización de sorgo dulce y trigo por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un diazótrofo endófito natural de caña de azúcar.

Molinari M. L., Mendizábal M. C., Galar M. L., Aprea J., Boiardi J. L., Luna M. F.*.

CINDEFI, Facultad de Cs. Exactas (UNLP)-CONICET, Calles 47 y 115 (1900). La Plata, Argentina.

mafla@quimica.unlp.edu.ar

Los recientes aislamientos y estudios de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en varias pasturas y cereales dan lugar a un nuevo período en el campo del uso de microorganismos beneficiosos para la agricultura. Estos diazótrofos son una herramienta promisoriosa para la disminución del uso de fertilizantes nitrogenados en diversos cultivos. A diferencia de lo que ocurre en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa no se han encontrado, hasta el momento, estructuras especializadas similares a nódulos u otros cambios morfológicos evidentes en pasturas o cereales colonizados por estos microorganismos. El sistema radicular de las plantas ofrece varios microhábitats posibles para el desarrollo bacteriano y la infección y colonización de los mismos. Los experimentos de aislamiento y recuento bacteriano en plantas (tanto en raíces como en hojas y tallo) esterilizadas superficialmente nos dan una estimación del tipo y grado de colonización, pero no proveen información de los posibles sitios de infección y de cuales han sido los tejidos colonizados. Para ello es necesario localizar e identificar a los microorganismos a través de estudios microscópicos que aseguren que la bacteria no fue translocada durante la preparación del material de la planta.

En el presente trabajo estos procedimientos han sido aplicados a plantas de sorgo dulce y trigo inoculadas con *Gluconacetobacter diazotrophicus*, diazótrofo endófito natural de caña de azúcar. Hemos aislado a este microorganismo de plantas de sorgo dulce inoculadas tanto en primordios de raíz (raíces de 24 hs) como en semillas. Los recuentos de bacterias viables realizados en raíces de sorgo inoculado (de hasta 30 días de crecimiento en Fahraeus semisólido), esterilizadas superficialmente, son del orden de 10^4 UFC/planta (similar a los observados para otros microorganismos endófitos en plantas tales como caña de azúcar, arroz, etc.). Para realizar los estudios de interacción planta-microorganismo se empleó la cepa UAP 5541 de *G. diazotrophicus* que contiene el plásmido pRGS561 con el gen reportero que codifica la enzima β -glucuronidasa. En plantas de sorgo dulce, luego de 1 a 2 días de inoculadas, se encontró un patrón de colonización similar al reportado para maíz inoculado con este microorganismo. La primera porción de la raíz fue siempre colonizada así como numerosos pelos radicales. En plantas de 10 días se observó microscópicamente la presencia de numerosas bacterias, aparentemente en espacios intercelulares, y algunas rodeadas de una cubierta que podría ser de exopolisacárido. A diferencia de lo reportado para plantas de arroz, maíz y trigo inoculadas con este organismo, el mismo se pudo aislar de hojas y tallo de plantas de sorgo dulce de 30 días, aunque la concentración bacteriana fue menor en estos tejidos que en raíz (10^3 UFC/ml). En plantas de trigo de 7 días, el recuento de bacterias viables fue del orden de 10^4 UFC/planta, pero además de observarse pelos radicales con numerosos microorganismos teñidos de color

azul, se observó el ápice de las raíces jóvenes fuertemente colonizado.

P12 Estudio de la producción *in vitro* de lacasa de aislamientos de *Colletotrichum*, agente causal de antracnosis en soja.

Marcelo Parisi ¹; Laura Levin ¹; Araceli Marcela Ramos ¹ y Marcela Gally ²

1. Int. a la Botánica, Depto. Biodiversidad y Biología Experimental, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA. 2. Fitopatología, Fac. de Agronomía, UBA. Buenos Aires, Argentina. Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4° piso, 1428, CABA.. araceli@bg.fcen.uba.ar

Dentro de las enfermedades que afectan a los cultivos de soja se destacan las de fin de ciclo, que disminuyen el rendimiento y afectan la calidad de la semilla. Una de ellas es la antracnosis, causada por diversas especies de *Colletotrichum*. La capacidad de degradar lignina por medio de enzimas ligninolíticas, entre ellas la lacasa, es importante en la infección, colonización y supervivencia de los fitopatógenos. Sin embargo, en contraste con otras enzimas degradadoras de pared y cutícula, que podrían estar involucradas en la ruptura de las barreras físicas en el hospedante, la lacasa también protegería a los patógenos de compuestos de defensa producidos por la planta, por detoxificación de fitoalexinas y otros compuestos fenólicos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la producción *in vitro* de lacasa por parte de aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos a partir de plantas de soja enfermas, de distintas zonas de la Argentina, y analizar diferencias en la producción de dicha enzima que pudieran a futuro relacionarse con la distribución geográfica y/o patogenicidad. Seis de los diez aislamientos seleccionados produjeron actividad lacasa, cuando fueron cultivados en un medio con pectina como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno. Los títulos de actividad lacasa obtenidos en las cepas evaluadas, que en todos los casos coincidieron con el pico de biomasa, difirieron significativamente entre sí, destacándose la cepa BAFC 3102 proveniente de la provincia de Chaco con un máximo de 0,044 UE/ml. Los patrones isoenzimáticos en geles de acrilamida revelaron una única banda de actividad lacasa con la misma movilidad electroforética para todos los aislamientos. No se detectó actividad de la enzima, medida espectrofotométricamente en los sobrenadantes de cultivo, ni se revelaron bandas de actividad en los geles de acrilamida, en los aislamientos 3094, 3095, 3097 y 3101 provenientes de Cerro Azul (provincia de Misiones), La Rioja, Armstrong (provincia de Santa Fe) y Lobos (provincia de Buenos Aires). Estudios previos en *Colletotrichum gloeosporioides* revelaron una relación entre la actividad lacasa producida por distintos aislamientos y su patogenicidad sobre frutos de palta. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que los aislamientos obtenidos de distintas zonas sojeras del país podrían presentar diferencias en su patogenicidad. En una etapa futura, se realizarán inoculaciones que permitan comprobar esta hipótesis.

P13 Selección de microorganismos nativos con actividad biocontroladora de hongos patógenos de maní.

Tonelli, M. L.; Taurian, T.; Fabra, A. Dpto. de Ciencias Naturales. Fac. de Cs. Exactas, Fco- Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 Km 601, Río Cuarto-5800, Córdoba. mtonelli@exa.unrc.edu.ar.

La producción de maní (*Arachis hypogaea* L.) en Argentina se obtiene casi exclusivamente en la Provincia de Córdoba, siendo un rubro importante en sus exportaciones. Las enfermedades del cultivo producidas por hongos patógenos llevan a grandes pérdidas y, a pesar de la importancia del cultivo de maní para la provincia de Córdoba, el conocimiento de la diversidad microbiana que se asocia con esta leguminosa es escaso y su estudio podría conducir a la selección de agentes biológicos nativos con actividad biocontroladora.

Seleccionar microorganismos del área manisera de Córdoba para su utilización en el desarrollo de prácticas sustentables tendientes a optimizar la producción del cultivo de maní mediante funciones biocontroladoras.

Metodología: Hongos patógenos: *Sclerotium rolfsii* (causante de marchitamiento), *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* (ambas causantes de Tizón por Sclerotinia) y *Fusarium solani* (responsable de la podredumbre parda de la raíz). El aislamiento de bacterias epifitas y endófitas cultivables de plantas de maní se llevó a cabo según la metodología descrita por Kuklinsky-Sobral y col. (2004). A partir de los aislamientos obtenidos se determinaron las siguientes actividades biocontroladoras: antibiosis de acuerdo a la metodología empleada por Jayaswal y col. (1990) en medio YEMA y APG y producción de sideróforos utilizando el medio Cromo Azurol S descrito por Schwyn y Neilands (1987), con posterior confirmación de acuerdo a la técnica utilizada por Arora y col. (2001). A partir de los aislamientos que poseían alguna o ambas actividades biocontroladoras se determinó el índice de superposición de nicho (NOI) entre dichos aislamientos y los hongos patógenos (Marín y col. 1998).

Se obtuvieron 193 aislamientos a partir de raíces, tallos y hojas de plantas de maní, de los cuales el 66,8% correspondió a bacterias epifitas. Un elevado número de los aislamientos obtenidos (168) presentó actividad biocontroladora y se determinó que 75 de ellos mostró crecimiento en el medio King B, en algunos casos con producción de fluorescencia.

La producción de sideróforos fue detectada en el 88% de los aislamientos biocontroladores analizados, mientras que sólo el 38% inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos y el 24% mostró ambas actividades. La sensibilidad de los hongos fitopatógenos a los compuestos inhibidores del crecimiento producidos por las bacterias, fue mayor para *S. minor*, siguiéndole en orden decreciente *S. sclerotiorum*, *F. solani* y *S. rolfsii*. A pesar del importante número de aislamientos biocontroladores analizados, sólo el 29,8% de los mismos mostró un elevado nivel de similitud ecológica ($\text{NOI} \geq 0,9$) con los fitopatógenos estudiados.

En el sistema analizado, las bacterias epifitas constituirían una importante fuente de microorganismos con actividad biocontroladora del crecimiento de hongos patógenos, especialmente ligada a la capacidad de producir sideróforos.

Subsidiado por CONICET, FONCYT y SECYT-UNRC.

P14 Promoción del crecimiento de potenciales agentes de biocontrol por exudados radicales de soja (*Glycine max* (L.) merr.).

Yaryura Pablo M, León Mariana, Kerber Norma L, Pucheu Norma L, García Augusto F, Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, UBA. IBYF-CONICET. Av. San Martín 4453, C1417DSE, Capital Federal.
e-mail: yaryura@agro.uba.ar

Las raíces de las plantas exudan una variedad de sustancias potencialmente valiosas a la rizosfera. Estos exudados consisten, en su mayoría, en una compleja mezcla de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos, aunque también se encuentran iones inorgánicos, moléculas gaseosas (CO_2 , H_2), enzimas y células del borde de la raíz (Dakora and Phillips, 2002). En este trabajo se identificaron y cuantificaron, a lo largo del crecimiento de la planta, algunos de los compuestos excretados más importantes tales como aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos, en dos variedades de soja de la empresa Ferias del Norte (FN-4.10 y FN-4.85) en condiciones de hidroponía.

Una de las funciones más significativa de las sustancias excretadas está relacionada con la interacción planta-microorganismos.

Es sabido que un buen agente de biocontrol debe tener la capacidad de colonizar la rizosfera y mantener una relación estable con la superficie de la raíz. Una pobre colonización radical puede resultar en una disminución de la actividad biocontroladora (Bais et al. 2004). Los exudados radicales constituyen la principal fuente de nutrientes para los microorganismos de la rizosfera, por lo tanto uno de nuestros objetivos fue estudiar si los exudados radicales de las dos variedades de soja, podían estimular el crecimiento de 2 cepas distintas de *B. amyloliquefaciens* GC3 y BNM122, potenciales agentes de biocontrol, aisladas en nuestro laboratorio. Se encontró que los exudados radicales de solo una de las variedades promovió el crecimiento de ambas bacterias, es decir que parece existir una cierta especificidad en la colonización efectiva de la rizosfera de distintas variedades de soja por diferentes cepas bacterianas, debido probablemente a que los nutrientes exudados por solo una de ellas son utilizados para el crecimiento de estas bacterias. También se realizaron ensayos de quimiotaxis cuali y cuantitativos, en ellos se observó que los exudados de semilla eran quimiotácticos para ambas bacterias, mientras que los correspondientes exudados radicales no tenían esa capacidad. Si la semilla es colonizada tempranamente (quimiotaxis hacia sus exudados) y luego los exudados radicales promueven el crecimiento de estas bacterias, se obtendrá como resultado una buena colonización y así una actividad biocontroladora satisfactoria. Este aspecto es importante ya que la inoculación con los agentes mencionados, se prevé hacer en semilla. Estos resultados sugieren que las bacterias BNM122 y GC3, pueden ser consideradas como potenciales agentes de biocontrol para la formulación de inoculantes.

FERMENTACIONES

P15 Optimización de la producción de xilitol.

Monasterio, R.P.; Lorda, G.S. y Pastor, M.D.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNLPam. Av.
Uruguay 151. Santa Rosa. La Pampa. 6300. Argentina.
e-mail: pastor@exactas.unlpam.edu.ar

La bioconversión de xilosa en la actualidad tiene el valor agregado de la producción de xilitol. El xilitol es un azúcar alcohol no calórico importante para la industria alimenticia y farmacéutica. Este polialcohol es anticarigénico y puede ser administrado a personas diabéticas. Se utiliza entre otras cosas para la fabricación de golosinas y dentífricos. Muchas levaduras, especialmente del género *Candida*, son reportadas por su alta capacidad de bioconversión de xilosa. La producción de xilitol depende de variables como: pH, nivel de oxigenación, temperatura, concentración y tipo de fuente de carbono, entre otros factores.

El objetivo de esta investigación es seleccionar la cepa de levadura que más productora de xilitol, y con mayor rendimiento.

Se trabajó con las siguientes cepas de levaduras: NRRL Y-7426 *Debaryomyces hansenii*, NRRL Y-12969 *Candida parapsilosis*, NRRL Y-2075 *Candida guilliermondii*, NRRL Y-2332 *Candida boidinii* y NRRL Y-12968 *Candida tropicalis*. Se determinó, mediante fermentaciones en pequeña escala, la concentración de biomasa, xilitol producido y xilosa no fermentada y el valor de pH. Las mediciones de biomasa se hicieron mediante determinación de peso seco y recuentos en microscopio utilizando cámara de Neubauer. Los azúcares se midieron por HPLC.

Las 5 cepas resultaron ser de crecimiento rápido. Los mayores valores de peso seco en g/L y de células/mL se observaron en *C. guilliermondii* (20,090; 50,700 x 10⁸), *C. tropicalis* (6,274; 19,083 x 10⁸) y *C. parapsilosis* (2,852; 2,530 x 10⁸) a las 40, 20, 40 horas de fermentación respectivamente. Mientras que *D. hansenii* fue la de menor desarrollo de biomasa con un valor máximo de 1,666 g/L y 0,075 x 10⁸ células/mL a las 28 horas. En el caso del pH se observó que las 4 levaduras del género *Candida* acidificaron en mayor medida que la del género *Debaryomyces*. En la observación microscópica pudo verse claramente la diferencia morfológica del género *Candida* con el género *Debaryomyces*. Las del género *Candida* son de forma alargada, mientras que las del género *Debaryomyces* es más esférica. En cuanto al tamaño no hay diferencias.

BIODIVERSIDAD y BIORREMEDIAIONES

P16 Caracterización fisiológica y molecular de *Streptomyces* MC1, cepa con capacidad biorremediadora de Cr (VI).

M. A. Polti^{1,2}, M. J. Amoroso^{1,3}, C. M. Abate^{1,2,3}

¹Planta Piloto de Procesos Industriales y Microbiológicos (PROIMI), ²Facultad de Ciencias Naturales e IML, ³Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Av. Belgrano y Pje Caseros, Tucumán (4000), Argentina. mpolti@proimi.org.ar

El cromo es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Existe en el medio ambiente en diversos estados de oxidación, pero sólo las formas trivalente (III) y hexavalente (VI) tienen importancia biológica. Los compuestos de Cr (VI) son tóxicos y carcinógenos, se encuentran presentes en aguas y suelos en altas concentraciones como consecuencia de la contaminación antropogénica, siendo la forma reducida [Cr (III)] mucho menos tóxica. Ciertos microorganismos muestran resistencia a metales en agua, suelo y desechos industriales; además algunas bacterias son capaces de reducir el Cr (VI) a Cr (III) mediante reacciones enzimáticas, lo que representa un proceso de detoxificación potencialmente útil. La biorremediación de grandes áreas contaminadas implica la liberación de microorganismos en suelos y aguas, por esto es necesario estudiar las características fisiológicas, bioquímicas y moleculares de los microorganismos que presenten gran potencial en procesos de biorremediación.

Se demostró previamente que la cepa *Streptomyces* MC1 fue capaz de reducir Cr (VI) en medios de cultivo líquidos y en muestras de suelo por lo que en el presente trabajo evaluamos sus características fisiológicas, bioquímicas y moleculares, con el objetivo de optimizar el crecimiento para su aplicación en procesos de biorremediación.

Se evaluaron diferentes actividades enzimáticas, utilizando API® ZYM, 20 E y Coryne. Se estudió la resistencia osmótica y a lisozima. Se evaluó la producción de pigmentos melanoides. Se determinaron el pH y la temperatura de crecimiento óptimos. Se realizaron crecimientos en medios de cultivo diferenciales y observaciones microscópicas de los mismos. También se amplificó y secuenció el gen *gyrB*.

Se encontró que la cepa presenta una alta resistencia osmótica, ya que crece hasta una concentración de 10% de NaCl. También presenta una alta resistencia a lisozima (hasta 50 µg ml⁻¹). Su pH óptimo de crecimiento es 6, sin embargo es capaz de crecer entre pH 5 y 10. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C, aunque puede crecer entre 25 y 35 °C. Puede utilizar como fuente de carbono una gran variedad de mono, di y polisacáridos.

La secuenciación del gen *gyrB* confirma que se trata del género *Streptomyces*, presentando 98% de similitud con *Streptomyces lavenduligriseus* y 92% con *Streptomyces pallidus*.

Debido a sus características fisiológicas y bioquímicas, *Streptomyces* MC1 puede ser utilizada en la biorremediación de ambientes extremos contaminados con Cr (VI).

P17 Producción de enzimas lignolíticas y evaluación de la acción biorremediadora mediante la degradación de colorantes textiles por el basidiomicete de pudrición blanca *Trametes villosa*.

Daniela Correa, Eliana Malignani y Vanesa Salomone
Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4. Laboratorio 8. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. elianameli@gmail.com

Trametes villosa es un hongo xilófago que se caracteriza por generar pudrición blanca en la madera debido a la producción extracelular de enzimas lignolíticas. Estas enzimas debido a su inespecificidad y alto potencial redox, además de degradar lignina, son capaces de degradar una variedad de compuestos xenobióticos tóxicos utilizados en la agricultura y sectores industriales. Dentro de estos compuestos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas, dioxinas y colorantes. Para corroborar la acción biorremediadora de *T. villosa* (BAFC 2755) mediante la degradación de colorantes textiles se cultivó este hongo en medio líquido en presencia de inductores enzimáticos (cobre, manganeso y veratril alcohol) agregados a distintos tiempos y en diferentes concentraciones. Se midió entonces la actividad enzimática de lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP), observándose un aumento en la actividad Lac en la mayoría de los tratamientos con respecto al control, siendo mayor para ambos tiempos en presencia de cobre. Por otro lado, la actividad de la MnP sólo difirió del control cuando el agregado fue veratril alcohol y cobre agregados inicialmente y a la semana respectivamente. Cabe resaltar que el agregado de ninguno de los inductores al tiempo cero afectó el crecimiento de *T. villosa*. Se evaluó también la decoloración por la acción de las enzimas lignolíticas extracelulares en forma aislada y del micelio en contacto con los contaminantes. Este hongo resultó más eficiente en la degradación de verde de malaquita 20 μM que en la de xilidina 30 μM (84% y 33% de decoloración en 2 hs respectivamente). En ambos casos, los tratamientos realizados con cultivo entero presentaron valores mayores de degradación del colorante en comparación con los extractos crudos. La presencia del micelio permitió el aumento de la producción de enzimas lignolíticas como respuesta al agregado del colorante. En el caso del verde de malaquita se reagregó colorante en dos oportunidades luego de la primera decoloración y se observó que los valores de degradación después de 2 hs del último agregado fueron también mayores al 70%. Se analizó además la eficiencia de *T. villosa* en la degradación de cinco colorantes textiles en medio sólido (agar-malta). En todos los casos el halo de decoloración aumentó con el tiempo, siendo este incremento más pronunciado al final de la experiencia. Se observó que los colorantes que mostraron ser más fácilmente degradables para este hongo en agar-malta fueron RBBR, Poly R-478 y Xilidina. Por lo tanto, se logró comprobar la acción biorremediadora de *T. villosa* tanto en medio sólido como en medio líquido.

P18 Optimización de parámetros para la biotransformación de Cr(VI) de sistemas acuosos mediada por bacterias autóctonas.

María Alejandra Daniel¹, Luciana Garavaglia¹, Laura V. Bianchi², María Rosa Eppis² y Diana L. Vullo¹
1. Área Química, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento, J.M. Gutiérrez 1150 (B1613GSX) Los Polvorines, Pcia. de Buenos Aires. Email: dvullo@ungs.edu.ar
2. U.A. Combustibles Nucleares. C.A.C. Comisión Nacional de Energía Atómica. Av. Gral. Paz 1499 (1650), Pcia. de Buenos Aires.

Diversas actividades industriales descargan en sus efluentes altas concentraciones de Cr(VI). Dicha especie posee una alta toxicidad debido a sus poderes mutagénico y carcinogénico. La capacidad de ciertos microorganismos de biotransformar el Cr(VI) en otra especie tal como Cr(III) es una herramienta capaz de ser aplicada a procesos de biorremediación de efluentes acuosos, ya que de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas ambientales se puede producir la inmovilización del Cr(III) como Cr(OH)₃. El objetivo del presente trabajo es adecuar los parámetros de cultivo para lograr la eliminación eficiente de Cr(VI) de sistemas acuosos, mediante la utilización de bacterias autóctonas. Se han logrado aislar cuatro cepas que producen decaimiento en los niveles de Cr(VI) de cultivos en lote. Dichas cepas fueron identificadas por secuenciación del gen 16S r-ARN como *Pseudomonas veronii* 2E, *Ralstonia taiwanensis* M2, *Delftia acidovorans* AR y *Klebsiella ornithinolytica* 1P. Se obtuvieron los máximos rendimientos de desaparición de Cr(VI) de los sobrenadantes de cultivos en lote teniendo en cuenta las siguientes condiciones de trabajo: 0,1 mM Cr(VI) inicial en caldo PYG a 32°C en agitación constante (200 rpm) de 48 a 100 hs de incubación. Los valores obtenidos fueron: 45% para *Pseudomonas veronii* 2E, 40% para *Ralstonia taiwanensis* M2, 61% para *Delftia acidovorans* AR y 33% para *Klebsiella ornithinolytica* 1P. El seguimiento de la concentración de Cr(VI) se realizó por técnicas espectrofotométricas y la validación de los resultados se realizó mediante la técnica de fluorescencia de rayos X por reflexión total, determinando la concentración de Cr total tanto en los sobrenadantes de cultivo como en células. Se efectuaron entonces los balances de masa correspondientes a Cr para cada cultivo. La variación del pH a lo largo del cultivo en lote es de fundamental importancia para asegurar la insolubilización de los productos de biotransformación, es decir Cr(OH)₃. En algunos casos el pH final del cultivo resultó ser menor a 6, mientras que en otros de 8. En el primer caso, observado solamente con *Pseudomonas veronii* 2E, los niveles de Cr total en los sobrenadantes se mantienen constantes a lo largo del cultivo debido a la solubilidad del Cr(III) a ese pH, ya que el Cr(OH)₃ es precipitable a partir de pH=5,4 y mayores, en el rango de concentraciones utilizado. De manera de mejorar la eliminación de Cr(VI), se analizó la posibilidad de la utilización de cultivos mixtos. Para ello se evaluaron las posibles interacciones entre las cepas seleccionadas. *Ralstonia taiwanensis* M2 y *Delftia acidovorans* AR exhibieron actividad antimicrobiana contra las otras cepas, mientras que *Pseudomonas veronii* 2E potencia su crecimiento en conjunto con *Klebsiella ornithinolytica* 1P, en presencia de Cr(VI). La utilización de estas últimas bacterias autóctonas representa una alternativa para la remediación eficiente de efluentes contaminados con Cr(VI).

P19 Obtención y caracterización de consorcios bacterianos degradadores de PAH: efecto del bioaumentación.

Madueño L., Coppotelli B.M., Del Panno M.T. y Morelli I.S.
CINDEFI (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Exactas.
UNLP. Calle 50 y 115. La Plata. Argentina. lbmh@biol.unlp.edu.ar

La biorremediación es una de las metodologías ampliamente aceptadas en el mundo, por proveer una solución económica, efectiva y definitiva, para el tratamiento de suelos contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (PAH). Si bien la biorremediación aprovecha e incentiva los procesos de biodegradación naturales para transformar y degradar contaminantes, la degradación de PAH puede incrementarse mediante la incorporación de microorganismos al medio ambiente (bioaumentación).

La utilización de microorganismos para facilitar la limpieza de sitios contaminados continúa siendo un gran desafío para los microbiólogos ambientales. Para aumentar el potencial degradativo de la comunidad microbiana el genoma introducido debe participar del proceso de flujo de la energía central, y la sobrevivencia del organismo inoculado está íntimamente relacionada con la competencia por los recursos con las poblaciones autóctonas en los suelos contaminados. Sin embargo poco se conoce acerca de cómo el inoculante puede interactuar con la microbiota autóctona e impactar la comunidad microbiana, incluyendo a los microorganismos degradadores de PAH nativos.

En este trabajo se obtuvieron y mantuvieron consorcios bacterianos degradadores de fenantreno, mediante técnicas de cultivos en sistemas batch, a partir de un suelo sin historia de contaminación. Se estudiaron los cambios producidos en la estructura y composición del consorcio por la inoculación con la cepa *S. paucimobilis* 20006FA degradadora de fenantreno, a nivel de cultivables (recuento de poblaciones heterótrofas en R2A, degradadoras de fenantreno en medio sólido y de PAH por la técnica del NMP, aislamiento y caracterización de las poblaciones mayoritarias) y no cultivables (PCR-DGGE). Se determinó la capacidad degradadora de fenantreno (GC-FID) de los distintos consorcios obtenidos.

La capacidad degradadora de fenantreno de los consorcios obtenidos se evidenció por la aparición de color amarillo de los productos de degradación. Dicha capacidad se mantuvo durante los 8 repiques sucesivos realizados a partir tanto del consorcio no inoculado (S/I) como del inoculado (C/I). Esto, junto con los resultados de los recuentos microbianos, demostró que los consorcios bacterianos se mantuvieron relativamente estables durante el tiempo del experimento. No se observaron diferencias significativas entre los consorcios S/I y C/I en cuanto a la capacidad degradadora determinada por GC-FID.

Por otro lado, sí se observaron cambios en la estructura de la comunidad (caracterización fenotípica y genotípica), observándose una relativa pérdida de la diversidad bacteriana producida por la inoculación y por los repiques sucesivos. Se observó la presencia de una banda intensa correspondiente a la cepa de *S. paucimobilis* 20006FA tanto en los perfiles de DGGE del sistema C/I como S/I, que se mantuvo a través de los repiques sucesivos, indicando que esta cepa juega un rol importante dentro de las poblaciones degradadoras de fenantreno del suelo.

P20 Producción de ligninasas por basidiomicetes nativos causantes de pudrición blanca en fermentación sumergida.

Eliana Malignani, Laura Levin y Flavia Forchiasin
Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón 2, piso 4 (1428) – CABA
E-mail: lale@bg.fcen.uba.ar

Los hongos de pudrición blanca juegan un rol prominente en la descomposición de los materiales lignocelulósicos. La lignina es degradada por la interacción de diversas enzimas extracelulares, principalmente peroxidases (manganeso-peroxidasa y lignin-peroxidasa) y fenoloxidasas (lacasa); enzimas con actividades oxidativas no específicas sobre polímeros aromáticos, capaces de actuar sobre una amplia variedad de contaminantes, entre ellos bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, tinturas industriales, etc. En trabajos previos se logró optimizar un medio de cultivo líquido sintético con glucosa como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno con el agregado de cobre como inductor, para la producción de enzimas lignolíticas por el basidiomicete xilófago *Trametes trogii*. Hasta el momento no se había probado la influencia de este medio en la producción enzimática de otros hongos de pudrición blanca. En este trabajo se pudo comprobar que el medio mencionado también estimula la producción de enzimas lignolíticas en otros 7 hongos nativos causantes de pudrición blanca (seleccionados en base a relevamientos previos entre más de 60 especies nativas, por su capacidad para decolorar en medio sólido los colorantes indicadores de actividad lignolítica: Poly R-478 y Azure B). Las actividades lacasa y manganeso-peroxidasa registradas en cuatro de estos hongos *Trametes trogii* (149,5 y 1,7 UE /ml respectivamente), *Fomes sclerodermeus* (49 y 0,4 UE/ml), *Trametes villosa* (28 y 0,6 UE/ml) y *Coriolus versicolor* (8,4 y 0,2 UE/ml), indican que podrían tener un potencial promisorio como agentes biorremediadores. Se analizó el efecto de la variación de la fuente nitrogenada en dicho medio, sobre la producción de ligninasas por *T. trogii* (el más activo productor de estas enzimas), evaluándose distintos aminoácidos y fuentes nitrogenadas complejas. Entre los aminoácidos ensayados el ácido glutámico resultó el más eficiente para la producción de ambas enzimas (registrándose actividades lacasa y manganeso-peroxidasa de 188.3 y 3.4 UE/ml respectivamente, en los sobrenadantes de cultivo al día 28 de incubación), mientras que entre las fuentes complejas de nitrógeno, la peptona estimuló la mayor producción de ambas enzimas (lacasa 124.1 y manganeso-peroxidasa 4.1 UE/ml).

P21 Degradación de hidrocarburos y respuesta quimiotáctica de *Pseudomonas aeruginosa* hacia hexadecano.

Melina Nisenbaum, Silvia Murialdo, Froilán González
Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ingeniería,
Laboratorio de Ingeniería Bioquímica. Juan B. Justo 4302.
melinanisenbaum@gmail.com

Aunque la capacidad de degradación bacteriana, en muchos casos, ha sido probada y es eficaz para la remediación de sitios contaminados, la quimiotaxis bacteriana hacia sustancias tóxicas ha recibido menor atención. Esto podría ser de gran uso para el saneamiento de suelos o efluentes contaminados utilizando estos microorganismos como biodegradadores de xenobióticos distribuidos en el sustrato de forma no homogénea. En este trabajo se ha buscado determinar si hay respuestas quimiotácticas hacia distintos hidrocarburos en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de suelo, capaz de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono. Se determinaron los hidrocarburos que esta cepa de *P. aeruginosa* es capaz de degradar, efectuando cultivos líquidos discontinuos en frascos estériles a 25 °C. El seguimiento se realizó observando crecimiento celular (absorbancia a 600 nm), concentración de ADN (absorbancia a 260 nm), liberación de CO₂ (por titulación) y determinación de la concentración inicial y final de hidrocarburos (cromatografía gaseosa). Aquellos hidrocarburos que sirvieron como única fuente de carbono y energía fueron utilizados para los ensayos de quimiotaxis. Se realizaron los métodos de ensayo clásicos como el de tapón de agarosa, ensayo de capilaridad y ensayo en placa de *swarming* modificado. La detección de respuestas quimiotácticas se registraron tomando fotografías a distintos intervalos de tiempo según el método. Si bien se sabe que *P. aeruginosa* degrada ciertos hidrocarburos, por primera vez se determinó que esta bacteria es quimiotáctica hacia hexadecano, entre otros compuestos tóxicos derivados del petróleo, esto le otorgaría una ventaja competitiva sobre la flora autóctona en sitios contaminados.

P22 Ecología de levaduras en viñedos y bodegas recientemente establecidos en Neuquén.

Marcela Sangorrín^{1,3}, Olga Apablaza¹, Raúl Barbagelata¹, Irene Zajonskovsky¹, Christian Lopes^{1,2}, María E. Rodríguez^{1,3}, Teresa L. Lavalle¹ y Adriana Caballero¹

1- Laboratorio de Microbiología, Dpto. de Química, Facultad de Ingeniería y 2- Laboratorio de Microbiología Agrícola, Dpto. de Biología Aplicada, Facultad de Cs. Agrarias. U.N.Comahue, Buenos Aires 1400 (8300) Neuquén. 3- CONICET. E-mail: msangorr@uncoma.edu.ar

Tradicionalmente el vino se produce por la fermentación del jugo de uva llevada a cabo espontáneamente por las levaduras presentes en la superficie de las uvas y equipos de bodega. No obstante, la utilización de levaduras seleccionadas autóctonas (inóculos) es actualmente una práctica enológica ampliamente extendida en el mundo con el fin de elaborar vinos que mantengan las características sensoriales típicas de cada región vitivinícola. Con el objetivo de seleccionar levaduras para uso enológico autóctonas de la nueva zona vitivinícola del Neuquén, en este trabajo se caracterizó cualitativa y cuantitativamente la biota de levaduras asociadas a uvas Merlot y a sus mostos de fermentación procedentes de distintas etapas (iniciales, medios y finales) de vinificaciones naturales e inoculadas. El estudio se realizó en cuatro bodegas denominadas en este trabajo como FS, FM, NQN y A. El aislamiento de las levaduras se llevó a cabo en placas de YEPD agar pH 4,5 y su cuantificación por recuento de unidades formadoras de colonias (CFU). La identificación de especies se realizó por métodos convencionales y moleculares (ITS1-5.8 S ADN-ITS2 PCR/RFLP). El número de levaduras asociado a la superficie de uvas del área Neuquén (CFU/uva: 153±90 en FS, 712±320 en FM, 105±70 NQN y 41±30 en A) fue significativamente menor que el reportado para uvas del mismo varietal de otras áreas de la Región vitivinícola Sur y podría relacionarse con la edad de los viñedos. Los valores de densidades celulares de los mostos iniciales naturales se relacionaron bien con los observados en las uvas de las que proceden y también fueron significativamente menores que los hallados en mostos iniciales de vinificaciones naturales realizadas en otras áreas de la Región a partir de viñedos más antiguos del varietal Merlot. Las especies de levaduras asociadas a uvas fueron *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus ater*, *Sporobolomyces roseus* y el yeast-like *Aureobasidium pullulans*. Los mostos iniciales procedentes de vinificaciones naturales presentaron un porcentaje variable de levaduras no sacaromycéticas (15% en FS, 80% en FM, 5% en NQN y 94% en A) pertenecientes a las especies *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* mientras que la biota asociada a los mostos iniciales de las fermentaciones conducidas resultó el 100% sacaromycética, excepto para la bodega A (95%). La discriminación a nivel de cepas utilizando el método molecular ADNmit-RFLP puso en evidencia la presencia de aislamientos de *S. cerevisiae* con perfiles electroforéticos particulares y diferentes a los observados para los cultivos iniciadores empleados en las bodegas. Estos aislamientos, asociados a mostos naturales y que podrían representar cepas autóctonas de la zona estudiada, se conservan para su posterior evaluación como fuente de futuros inóculos regionales.

P23 La biosorción como herramienta en la biorremediación de efluentes contaminados con metales pesados.

Diana L. Vullo¹, Helena Ceretti¹, María Alejandra Daniel¹, Marcela Ferrero², Silvana Ramírez¹ y Anita Zalts¹

1. Área Química, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS), J.M. Gutiérrez 1150 (B1613GSX) Los Polvorines, Provincia de Buenos Aires. Email: dvullo@ungs.edu.ar 2. PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros (T4001MVB) S.M. Tucumán.

Si bien algunos metales pesados son esenciales en actividades biológicas, el Cd no cumple funciones de micronutriente, por el contrario reviste de gran toxicidad. Como consecuencia de actividades humanas y debido a su alta movilidad puede dispersarse en diversos ecosistemas, ya sean acuáticos como terrestres. Dentro de las estrategias microbianas de resistencia o tolerancia a metales pesados existe el fenómeno conocido como biosorción. Dicho mecanismo se caracteriza por la retención del metal mediante una interacción físicoquímica del mismo con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares. Es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura. La biosorción representa entonces una alternativa en la retención de metales pesados presentes en efluentes industriales, previa descarga de los mismos al medio ambiente. El objetivo de este trabajo es estudiar el fenómeno de biosorción de Cd(II) experimentado por bacterias aisladas a partir de ecosistemas contaminados, con futura aplicación en sistemas de remediación de efluentes industriales. Se seleccionaron bacterias resistentes a altas concentraciones de Cd, de las cuales *Pseudomonas veronii* 2E registró los mejores rendimientos en la retención de Cd (47%) en cultivos en lote. Las otras cepas seleccionadas *Ralstonia taiwanensis* M2, *Delftia acidovorans* AR, *Klebsiella ornithinolytica* 1P y *Klebsiella oxytoca* P2, mostraron respectivamente un 46, 7,5, 45 y 24% de retención de Cd. Para estudiar el fenómeno de biosorción se optimizaron las condiciones de trabajo, tales como pH=7,5 (10 mM buffer HEPES), masa de biosorbente (1,5 g masa celular/L), volumen de trabajo (10 mL), tiempo de contacto (24 hs) y concentración de Cd (0,5 mM) mediante el estudio de la cinética de adsorción y de la construcción de la isoterma de Langmuir, en particular con *Pseudomonas veronii* 2E, obteniendo una adsorción máxima del 80%. Además se estudiaron interacciones entre las distintas cepas para la implementación de sistemas de cultivos mixtos de manera de mejorar la eficiencia en la remediación. Se detectó actividad antimicrobiana de *Ralstonia taiwanensis* M2, *Delftia acidovorans* AR frente a *Pseudomonas veronii* 2E, con lo cual se hace improbable su coexistencia en cultivos mixtos. Sin embargo *Pseudomonas veronii* 2E, *Klebsiella ornithinolytica* 1P y *Klebsiella oxytoca* P2 pudieron desarrollar en conjunto sin interacciones aparentes. Teniendo en cuenta el rendimiento de biosorción de Cd por *Pseudomonas veronii* 2E (80%, pH=7,5), y los obtenidos con *Klebsiella ornithinolytica* 1P (49%, pH=7,5) y *Klebsiella oxytoca* P2 (42%, pH=7,5) es posible el diseño de un proceso de biorremediación, ya sea mediante la utilización de cultivos puros o mixtos.

BIOTECNOLOGÍA

P24 Producción de fitasa microbiana con la levadura no convencional *Debaryomyces occidentalis* utilizando sustratos de bajo costo. Localización subcelular de la enzima.

Debora Conde Molina¹, Ma. Florencia Kronberg¹, Marta Segovia de Huergo² y Miguel Ángel Galvagno^{1,2} ¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM, Av. Gral. Paz 5445, San Martín; ²Departamento de Ingeniería Química, FI, UBA, Ciudad Universitaria. mag@di.fcen.uba.ar

El ácido fítico (*myo*-inositol hexaquisfosfato) es la principal forma de reserva de fósforo en plantas, representando hasta 80% del contenido de fósforo en cereales y legumbres. Sin embargo, los animales monogástricos no son capaces de degradarlo dado que carecen de fitasa, la enzima capaz de hidrolizar fitato a inositol y fosfato inorgánico. Además, este compuesto actúa como factor antinutricional debido a que funciona como quelante de metales (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) y forma complejos con proteínas. El fitato no digerido en estos animales es excretado al medio ambiente, contaminando áreas de producción intensivas de ganado. Una manera de enfrentar este inconveniente es la suplementación de la dieta de los animales con fitasa, mejorando consecuentemente el crecimiento y disminuyendo la contaminación ambiental. Por estas razones, suma importancia la investigación de distintas fuentes y formas de producción de fitasa.

En este trabajo se estudió la producción de fitasa por la levadura no convencional *Debaryomyces occidentalis* utilizando sustratos de bajo costo; en particular, melaza de caña y extracto de *yacón* (*Smallanthus sonchifolius*, una planta de origen andino). En primer lugar, se evaluó el crecimiento microbiano en ambos sustratos y la actividad fitasa a lo largo del tiempo de incubación. El crecimiento en ambos sustratos fue similar, sin embargo, en medio con melaza la actividad enzimática fue 4 veces superior. La mayor actividad específica (AE) fue obtenida a las 48 h de crecimiento (con el cultivo en fase estacionaria), y se observó que la enzima no era excretada al medio sino que se encontraba asociada a la célula. Consecuentemente, se determinó la localización subcelular de la fitasa en dos fracciones de un homogenato celular, en una fracción soluble (interior celular) y en una compuesta principalmente por restos de membranas y pared celular. El análisis de la actividad demostró que la enzima se encontraba principalmente en la fracción insoluble; siendo la AE en esta fracción 120 mU mg⁻¹ de proteína, mientras que en la fracción soluble 50 mU mg⁻¹ de proteína. Posteriormente, se confirmó la localización de la enzima utilizando protoplastos obtenidos por digestión enzimática. La actividad específica obtenida en protoplastos y en la pared celular fue de 40 y 165 mU mg⁻¹ de proteína, respectivamente; demostrando que la mayor actividad de fitasa se encuentra asociada a la pared celular. Con el fin de investigar el tipo de unión de la enzima a la pared, se trataron las células con distintas sales y surfactantes. Mediante estos tratamientos no fue posible liberar la fitasa al medio, demostrando que la enzima no se encuentra asociada iónicamente a la pared, y sugiriendo que la unión es de otro tipo, quizás de naturaleza covalente. En conjunto, nuestros resultados indican que es posible obtener fitasa a partir de sustratos económicos utilizando *D. occidentalis*.

P25 Producción de ácido itacónico por *Aspergillus terreus* MJL05 en forma de pellets y micelio inmovilizado.

Mariana I. Juy¹, Joaquín A. Orejas¹, María Ester Lucca^{2,3}

¹Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ingeniería, Grupo de Ingeniería de las Reacciones. Ruta Nacional 36 Km 601 CP: X5804BYA. Río Cuarto. Córdoba. Tel: 54- (0) 0358-4676586/254, Fax: 54-(0) 358-4676246. ² Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Qca. y Farmacia, UNT. ³ PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET. mjuy@ing.unrc.edu.ar, jorejas@ing.unrc.edu.ar

El ácido itacónico es un ácido orgánico dicarbónico insaturado, la importancia de su producción radica en que puede ser fácilmente incorporado en polímeros y puede servir como un sustituto para ácido acrílico o metacrilato, los que son sintetizados a partir de tecnología petroquímica. Es empleado en 1-5% como un comonomero en resinas y también en la fabricación de fibras sintéticas, de adhesivos, de espesantes y de revestimientos.

A pesar de sus amplias aplicaciones, su empleo se encuentra restringido debido a su alto costo (US\$ 4.0 kg⁻¹). Por estos motivos existe una intensa actividad de investigación tendiente a lograr mayor productividad. Esto puede lograrse por medios biotecnológicos, tal como el empleo de técnicas de inmovilización, programas de selección de cepas e ingeniería genética.

La tecnología preferida de producción involucra procesos de fermentación de carbohidratos por medio de hongos, especialmente *Aspergillus terreus*. La cepa de *A. terreus* MJL05, utilizada en este trabajo, fue aislada de suelos de viñedos de España.

El objetivo de este trabajo, fue, por una parte, corroborar la producción de ácido itacónico de la cepa *A. terreus* MJL05 en un medio de producción con dos fuentes de carbono diferentes, glucosa y glicerol, ya que la selección de sustratos alternativos para obtener altas productividades de ácido itacónico así también como la optimización de las condiciones permiten reducir los costos de producción y de este modo abrir el mercado para nuevas y crecientes aplicaciones. Y, por otra parte, comparar el rendimiento de producción de ácido itacónico de esta cepa, con dos tipos diferentes de morfologías del hongo, "pellets", en medio líquido con agitación y con una concentración de 10⁶ esporas/ml para el desarrollo de "pellets" de pequeño tamaño y micelio inmovilizado en mallas, en medio líquido sin agitación.

Cada condición experimental fue implementada por cuadruplicado, los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente. Dentro del rango y condiciones experimentales empleadas se concluye que tanto con la morfología de "pellets" como de micelio fúngico inmovilizado, el empleo de glicerol como fuente de carbono da los mejores rendimientos en ácido itacónico. Con 100 gr/lit de glicerol en el medio de cultivo, los rendimientos en ácido itacónico fueron de 17.83± 3.22 gr/lit para la morfología de "pellet" y 10.07±2.22 gr/lit para la morfología de micelio.

El glicerol es un subproducto del biodiesel, por lo que resulta muy interesante la utilización de éste como fuente de carbono para la producción de ácido itacónico por *A. terreus* MJL05.

P26 Interacciones *killer* entre cultivos iniciadores comerciales y levaduras indígenas de vinos de la patagonia.

Christian Lopes^{1,2}, María E. Rodríguez^{1,3}, Marcela Sangorrín^{1,3} y Adriana Caballero¹

1- Laboratorio de Microbiología, Dpto. de Química, Facultad de Ingeniería y 2- Laboratorio de Microbiología Agrícola Dpto. de Biología Aplicada, Facultad de Cs. Agrarias. U.N.Comahue, Buenos Aires 1400 (8300) Neuquén. 3- CONICET. E-mail: clobes@uncoma.edu.ar

Los fenómenos de antagonismo microbiano, como las interacciones entre levaduras mediadas por toxinas *killer*, han sido asiduamente relacionados con paradas de fermentaciones. En este estudio, se caracterizaron las interacciones *killer* entre levaduras indígenas de la Patagonia norte y cepas comerciales foráneas utilizadas como iniciadoras de fermentaciones vínicas en bodegas regionales, evaluándose su posible relación con paradas de fermentaciones. Veintitrés cepas vínicas comerciales de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *S. bayanus* fueron evaluadas en su sensibilidad *killer* frente a 39 aislamientos *killer* indígenas de origen enológico: *S. cerevisiae* (14), *Pichia anomala* (4), *P. kluyveri* (4), *Torulaspota delbrueckii* (2), *Metschnikowia pulcherrima* (7), *Hanseniaspora uvarum* (4), *Rhodotorula glutinis* (2), *Zigosaccharomyces rouxii* (1) y *Debaromyces hansenii* (1). Asimismo se evaluó la capacidad *killer* de las cepas comerciales frente a 56 cepas indígenas de *S. cerevisiae*. Los ensayos se hicieron utilizando el método de inhibición del crecimiento en placas de YPD-MB pH:4,5.

Sólo el 48% de las cepas comerciales analizadas reportaban algún dato sobre su comportamiento *killer* y el 36% de éstas mostró en los ensayos de laboratorio características diferentes a las comercialmente reportadas. De las cepas comerciales sin datos *killer* reportados, el 42% resultó *killer* (K⁺) frente a las cepas indígenas sensibles de *S. cerevisiae*; el resto no mostró actividad *killer* (K⁻) y además fue sensible (R⁻) frente a las cepas *killer* indígenas de la misma especie. En las mismas condiciones de ensayo y tomando como referencia el total de los cultivos iniciadores comerciales analizados, el 48% presentó fenotipo K⁺R⁺, el 13% fenotipo K⁻R⁺ y el 39% fenotipo K⁻R⁻. Estos resultados evidencian un fenotipo mayoritariamente resistente de las cepas comerciales (61%) frente a las cepas *killer* de *S. cerevisiae* indígenas. No obstante todas ellas (100%) resultaron sensibles a por lo menos un aislamiento *killer* indígena de la especie *P. anomala* y el 74% también lo fue frente a alguno de los aislamientos indígenas de *P. kluyveri*. Esta sensibilidad de las cepas comerciales frente a cepas *killer* indígenas no sacaromícéticas podría relacionarse con ciertas paradas de fermentaciones inoculadas observadas a escala industrial en bodegas de la región y pone de manifiesto la necesidad de evaluar el comportamiento de cepas de *S. cerevisiae* destinadas a vinificación no sólo frente a toxinas producidas por levaduras de su misma especie (toxinas de tipo K2 en el caso de las vinificaciones) sino también frente a las producidas por otras especies de levaduras diferentes de *Saccharomyces*, frecuentemente encontradas al inicio de la fermentación, con el fin de garantizar el éxito de la implantación de un cultivo iniciador y reducir las posibles paradas de fermentación.

P27 Efecto de solventes orgánicos sobre la actividad y estabilidad de NEP (*Natrialba magadii* extracelular protease).

Ruiz Diego M, y De Castro Rosana E. Instituto de Investigaciones Biológicas – FCEyN – Universidad Nacional de Mar del Plata. CC1245. Mar del Plata 7600. E-mail: dmruiz@mdp.edu.ar

Las arqueas son un recurso valioso tanto para la investigación básica como aplicada por su capacidad de sobrevivir en ambientes con condiciones que resultan letales para la mayoría de las células. Las arqueas haloalcalófilas forman un grupo fisiológico diferenciado ya que requieren altas concentraciones de sal (4 – 5 M NaCl), altos valores de pH (8,5 – 11) y bajas concentraciones de Mg⁺² (menor a 10 mM) para su crecimiento. Las enzimas halofílicas son activas y estables en medios con alta concentración de NaCl. Las soluciones con alta concentración de sal presentan bajos valores de actividad agua, característica común con los sistemas de solventes orgánicos. Por esta razón, las enzimas de haloarqueas podrían ser herramientas útiles como biocatalizadores en medios acuosos – orgánicos. En nuestro laboratorio se han purificado y caracterizado a nivel bioquímico proteasas extracelulares de las arqueas haloalcalófilas *Natronococcus occultus* y *Natrialba magadii*. *Nab. magadii* produce una proteasa extracelular hacia el final de la fase exponencial de crecimiento denominada NEP por *Natrialba magadii* Extracellular Protease. Esta enzima presenta su máxima actividad azocaseinolítica en 1.5 M NaCl y pH 8 a 45°C y es inactivada irreversiblemente a menores concentraciones de sal. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de varios solventes orgánicos sobre la actividad y estabilidad de NEP para su posible aplicación en biotecnología.

Nab. magadii fue crecida hasta alcanzar la fase estacionaria (DO₆₀₀>1.5) y el medio libre de células fue precipitado con etanol 50% frío. Esta fracción enriquecida en NEP (parcialmente purificada) fue utilizada como fuente de enzima. La actividad proteolítica de NEP fue medida en soluciones acuosas conteniendo 1.5 o 0.5 M NaCl en presencia/ausencia de solventes orgánicos. La estabilidad fue estimada midiendo la actividad remanente en condiciones estándar (1.5 M NaCl, 45°C, pH 8) después de preincubar la enzima en soluciones con diferente concentración de sal conteniendo o no solventes orgánicos durante 24 hs a 30°C. La actividad y estabilidad de NEP fueron determinadas midiendo la actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato (A₃₃₅).

NEP resultó activa y estable en mezclas acuosas de solventes orgánicos conteniendo 1.5 M NaCl y Glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N* – dimetil formamida (DMF), Propilenglicol o Dioxano. Entre los solventes analizados DMSO, Propilenglicol y Glicerol mostraron tener el mayor efecto estabilizante en concentraciones subóptimas de sal. El efecto estabilizante del DMSO fue más marcado a pH 8 que a pH 10, sugiriendo que este solvente no podría reemplazar completamente a la sal en el medio de reacción a valores de pH elevados.

Estos resultados amplían el conocimiento sobre aspectos básicos y aplicados de las extremozimas y sugieren que la proteasa haloalcalofílica de *Nab. magadii* podría ser utilizada como biocatalizador en reacciones que se llevan a cabo en medios orgánicos, como la síntesis peptídica.

Subsidiado por UNMDP y CONICET.

P28 Diseño de inoculantes de *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122 para control de fitopatógenos.

Natalia Sacco; Oksana Sydorenko; Marcelo Soria; Olga Correa; Norma Kerber, Norma Pucheu, Augusto García. Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía. UBA. IByF-Conicet. Av. San Martín 4453. CP1417. Buenos Aires. soria@agro.uba.ar

Bacillus amyloliquefaciens BNM122 es una cepa capaz de controlar varios hongos fitopatógenos. Las especies biocontroladoras de *Bacillus* cuentan con distintos mecanismos de actividad antifúngica. En *B. amyloliquefaciens* BNM122 se demostró la excreción de compuestos extracelulares, como iturina y surfactina. Pero también existe evidencia de que estos no serían los únicos mecanismos presentes. Se pueden definir dos estrategias para explotar la actividad antifúngica de *B. amyloliquefaciens*. La primera es cultivar la cepa en condiciones que favorezcan la producción de compuestos antifúngicos, para purificarlos y formularlos como un agroquímico convencional. La segunda, es obtener cultivos con altos títulos de bacterias y producir formulaciones para aplicarlas como inoculantes. En cualquiera de los dos casos, es importante obtener cultivos con un alta concentración de bacterias. En nuestro laboratorio habíamos desarrollado un medio de cultivo, GELPP, de bajo costo, para el cultivo de esta cepa a escala industrial. Nuestro objetivo actual es aumentar la concentración de células, evaluar la factibilidad de un cultivo fed-batch y verificar que las células obtenidas mantengan su capacidad biocontroladora. El medio GELPP permite un crecimiento con alta velocidad específica de *B. amyloliquefaciens* BNM122, además las células esporulan correctamente, una condición importante para formular un inoculante. Sin embargo, el título final no es satisfactorio, aproximadamente $0,8 \times 10^8$ ufc/ml (1.2 g/l de peso seco). El primer paso de este proceso de mejora fue ensayar un rango amplio de concentraciones y diluciones del medio GELPP. Observamos una relación lineal entre biomasa y concentración del medio en un rango relativamente amplio, y pudimos determinar un nuevo óptimo de concentraciones de nutrientes, este medio se denominó GELPP-2, en el que la concentración de bacterias llega hasta $1,2 \times 10^8$ ufc/ml, con un peso seco de 2,3 g/l. El paso siguiente fue la realización de una serie de pruebas con sistemas de cultivo en lote alimentado (fed-batch), con el que se obtienen $2,8 \times 10^8$ ufc/ml y 5,2 g/l de peso seco.

Un aspecto fundamental del éxito o fracaso de un producto de control biológico es su correcta formulación. Existen varios aditivos de uso común en la elaboración de inoculantes que aumentan la estabilidad de las bacterias, las protegen de los exudados de la semilla o de los cambios en presión osmótica que ocurren en la vida útil de un producto. Ensayamos el efecto de varios aditivos sobre la supervivencia de las células: agua destilada (control), glicerol, PVP o medio GELPP fresco, y dos tipos de formulaciones, líquida o sólida. En todas las formulaciones líquidas el número de células aumentó durante los primeros 78 días de almacenamiento, luego continuaron dividiéndose más lentamente. En la formulación sólida, preparada con un cultivo liofilizado de BNM122 y almidón de maíz, no se observaron estos aumentos.

En conclusión, mejoramos la densidad celular de los cultivos, probamos la inocuidad de varios aditivos y demostramos que las células así preparadas son efectivas contra *F. oxysporum*.

P29 Optimización del crecimiento y autofloculación de *Tolypothrix tenuis* para la producción de un biofertilizante cianobacteriano.

Patricia G. Silva y Humberto J. Silva

Laboratorio de Alimentos-Área de Microbiología. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. (5700) San Luis, Argentina. E-mail: pgsilva@unsl.edu.ar

Las cianobacterias heterocísticas se encuentran naturalmente en los arrozales, contribuyendo con la fijación biológica de N₂ y la fertilidad de los suelos. *Tolypothrix tenuis*, especie nativa de regiones tropicales y subtropicales, ha sido utilizada en nuestro país para la formulación de un biofertilizante a escala comercial. Para esta aplicación, es indispensable la obtención de cultivos con alta densidad celular. Los factores requeridos incluyen una adecuada fuente de iluminación y distribución de la luz dentro del fotobiorreactor, un eficiente intercambio gaseoso y el empleo de un medio de cultivo cuya composición satisfaga los requerimientos nutricionales.

Dentro del costo total de producción, los nutrientes influyen tanto en la productividad celular como en la separación de la biomasa. En base a ello, se evaluó el efecto de la nutrición mineral sobre el crecimiento y autofloculación de *T. tenuis*, utilizando un balance de materia para la identificación de nutrientes limitantes conjuntamente con un diseño experimental factorial 2² con un punto central.

T. tenuis fue cultivado durante dos semanas en condiciones fotoautotróficas, utilizando columnas de 1000 ml de capacidad, de 7,5 cm (d.i.) y conteniendo 800 ml de cultivo. Se utilizó el medio Watanabe (g/l): K₂HPO₄, 0,3; MgSO₄ · 7 H₂O, 0,2; CaCl₂ · 2 H₂O, 0,05 (macronutrientes, X₁); solución de FeCl₃ · 6 H₂O (5 g/l) y ácido tartárico (5 g/l), 0,1 ml; solución Arnon 6, 1 ml, conteniendo (g/l): H₃BO₃, 2,68; MnCl₂ · 4 H₂O, 1,81; ZnSO₄ · 7 H₂O, 0,222; Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0,391; CuSO₄ · 5 H₂O, 0,079; CoCl₂ · 6 H₂O, 0,0415 (micronutrientes, X₂). La concentración de biomasa se estimó mediante peso seco y clorofila *a* por espectrofotometría (663 nm) en un extracto de acetona al 80%. La actividad floculante (F) se calculó como una fracción volumétrica del cultivo clarificado en muestras de 250 ml previamente homogeneizadas, colocadas en probetas y dejadas sedimentar espontáneamente; correspondiendo la velocidad de floculación a la variación del volumen clarificado en el tiempo (V_F). Según la composición elemental informada en cianobacterias, el contenido de hierro del medio Watanabe resultó ser limitante (0,1 mg/l), no permitiendo crecimientos celulares mayores a 0,16 g/l. La concentración celular y de clorofila *a* incrementaron marcadamente con pequeños aumentos de hierro, alcanzando un máximo a 0,5 mg/l. Sin embargo, la actividad floculante no mejoró en todo el rango ensayado (0,1 a 8 mg/l).

El análisis del diseño factorial permitió estimar los efectos principales de los macronutrientes (X₁), micronutrientes (X₂) y sus interacciones sobre el crecimiento y autofloculación de *T. tenuis*, por medio de las ecuaciones:

$$\text{Biomasa (g/l)} = 1,22429 + 0,065 X_1 + 0,24 X_2 - 0,075 X_1 X_2$$
$$V_F \text{ (ml/min)} = 1,728 + 1,075 X_1$$

Se logró un incremento en la biomasa del 73% y un aumento de 3,5 veces en la velocidad de autofloculación. Los micronutrientes tuvieron mayor influencia sobre el crecimiento celular, con un efecto nulo sobre la autofloculación. Además, las mejoras en la capacidad autofloculante se obtuvieron utilizando concentraciones iniciales más elevadas de los macronutrientes.

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

P30 Relación estructura-actividad de una proteína insecticida tipo-Cry8 de *Bacillus thuringiensis*.

Corina Berón y Graciela Salerno

Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA). Vieytes 3103 – 7600 Mar del Plata, Argentina. E-mail: cberon@fiba.org.ar

Las proteínas Cry, principales componentes de las inclusiones cristalinas producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, han sido caracterizadas como tóxicas contra insectos de diversos órdenes de acuerdo a su estructura polipeptídica. La estructura tridimensional de algunas de estas proteínas ha determinado la presencia de tres dominios sugiriendo que estas proteínas en general poseen una arquitectura global similar. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa FCC7 de *B. thuringiensis* parcialmente caracterizada durante investigaciones anteriores y que había resultado ser tóxica contra insectos de los Ordenes Coleoptera y Lepidoptera. A partir de ADN total extraído a partir de esta cepa fue amplificada (PCR), clonada y secuenciada, una secuencia nucleotídica determinada como una putativa proteína de tipo Cry8 ya que presentó un 59% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Cry8A y que correspondía a un polipéptido de M_r: 135 kDa. Se determinó la presencia de algunos aminoácidos claves para la estructura del cristal y que están asociados con la capacidad insecticida de proteínas Cry, tales como cisteína (C), arginina (R) y lisina (K), determinando que esta secuencia tiene sólo 4 residuos C en su composición aminoacídica y que la relación entre los residuos de los aminoácidos R y K es de 1,15, comparado con la relación que existe entre estos aminoácidos en secuencias de proteínas anteriormente descritas: Cry1Aa (2,27; tóxica contra Lepidopteros) y Cry3Aa (0,74; tóxica contra Coleopteros). A partir de los análisis de dominios polipeptídicos realizados a través del "Protein Domain Database", se determinó la presencia de tres dominios y se realizó un análisis comparativo de cada uno de ellos con proteínas de toxicidad conocida pudiendo observar que la mayor similitud de cada dominio fue con una proteína de actividad dual (Cry1la). La predicción de la estructura tridimensional de la putativa proteína Cry fue realizada mediante el servicio de modelización "Swiss-Model" (Gen-THREADER), encontrando similitudes en la estructura secundaria y en el plegamiento tridimensional con alto grado de certeza hacia proteínas Cry. La predicción de regiones transmembrana fue realizada mediante el servicio de modelización de proteínas "Swiss-Model" (MEMSAT2) y al ser comparadas con proteínas Cry ya cristalizadas fue evidenciada la coincidencia de las hélices transmembrana presentes en esta secuencia. Para investigar si la toxicidad era debida a la presencia de una o más proteínas Cry, se decidió poner en evidencia secuencias de genes *cry* presentes en la cepa. Para ello se realizaron ensayos de hibridación ADN-ADN a partir de ADN total de la cepa FCC7, digerido con endonucleasas de restricción y utilizando como sonda un fragmento nucleotídico de 800 pb clonado en el plásmido pGEM T-Easy. La hibridación de la membrana con la sonda marcada fue realizada a distintas temperaturas, y en todos los casos, las autorradiografías correspondientes siempre mostraron una sola banda. Estos resultados sugerirían que en la cepa FCC7, la actividad insecticida dual estaría determinada por una sola proteína de tipo Cry8, previamente descritas como tóxicas únicamente contra insectos del Orden Coleoptera.

P31 Relación entre receptores Ger y proteínas SASP-E de la espora de *Bacillus subtilis*: ¿un nuevo tipo de chaperonas?

Patricia Bustos, Sandra Ruzal y Carmen Sánchez-Rivas
Dpto. Química Biológica, FCEN-UBA
sanchez@qb.fcen.uba.ar

Las esporas de *Bacillus subtilis* están recubiertas por una serie de envolturas que las mantienen protegidas de estreses ambientales y en estado de dormancia. La germinación se desencadena cuando efectores físicos o químicos se encuentran presentes e interactúan con los receptores Ger ubicados en la membrana interna de esa compleja estructura.

La germinación ocurre gracias a una secuencia ordenada de eventos:

1. después del sensado de nutrientes (que involucran a los receptores GerA, GerB, GerD o GerK) se rompe la pared esporal o cortex (autólisis) e ingresa el agua permitiendo una adecuada concentración osmótica. Hay auto-proteólisis de proteínas de bajo peso molecular (SASP de tipo α/β y γ) que aportan los aminoácidos necesarios para que se inicie la síntesis de proteínas. Esta sería estrictamente la germinación.

2. en ese momento se libera una célula vegetativa capaz de dividirse utilizando los nutrientes que se encuentran presentes. Es el "outgrowth" o brotación

3. Finalmente la célula utiliza los nutrientes del medio y se establece el crecimiento vegetativo.

Mutantes de la proteína SASP-E (o γ) presentan deficiencias en germinación, pese a que esta proteína se localiza en el citoplasma. Esta deficiencia es más severa en medios hiperosmóticos lo que se atribuyó a la baja provisión de osmoprotectores como glutamato (Ruzal *et al.* 1994).

Se analizaron las diferentes etapas de germinación tanto en mutantes *sspE* (SASP- γ) como en mutantes de receptores (GerA, B, D, K). Las germinaciones se realizaron en presencia de diferentes germinantes, L-alanina-potasio o glucosa-fructosa-asparagina-potasio o dipicolinato de calcio, en concentraciones osmóticas variables y en medios mínimos o ricos.

Se observó que solamente en condiciones donde receptores como GerA y GerD están involucrados (vía L-alanina), la mutante *sspE* presenta baja germinación. Por otro lado esta mutante también es deficiente en la etapa 2 (outgrowth), a diferencia de las mutantes GerA y GerD. Este último resultado estaría de acuerdo con la baja provisión de aa debido a dicha mutación.

Tanto los receptores Ger como la proteína SASP-E son sintetizados en el mismo momento, en el mismo compartimiento pre-esporal y utilizan el mismo factor sigma, lo que sugiere un rol de chaperona a SASP-E. Para poner en evidencia su posible asociación a otras proteínas, geles de SDS-PAGE de extractos provenientes de esporas fueron analizados por Western con anticuerpo anti-SASP-E. Se observaron bandas de mayor peso molecular avalando la hipótesis de asociaciones de SASP-E a otras proteínas. A fin de determinar si la proteína SASP-E está involucrada en otros procesos de membrana, como el señalamiento entre los compartimientos pre-espora y célula madre, se analizó la composición proteica de la cubierta externa de la espora (coat) en varias cepas mutantes y salvaje. De nuevo la mutante *sspE* muestra diferencias significativas en su composición. Estos resultados indicarían que SASP-E puede jugar un rol en el tránsito o estabilidad de proteínas destinadas a membrana.

P32 Estudio de los reguladores globales Anr y RpoS en *Pseudomonas* sp. 14-3, una especie productora de polihidroxitirato.

Mariela Catone*, Paula M. Tribelli*, Beatriz S. Méndez y Nancy I. López¹. Dpto. de Química Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. C. Universitaria. 1428-Buenos Aires. ¹E-mail: nan@qb.fcen.uba.ar

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros de reserva bacterianos que se acumulan en condiciones de crecimiento desbalanceado. El más estudiado es el polihidroxitirato (PHB). Los PHA poseen propiedades termoplásticas y son biodegradables. Estos bioplásticos funcionan como un reservorio de carbono y electrones, por lo que tienen un papel importante en el balance redox celular y también en la sobrevivencia y resistencia a estrés. *Pseudomonas* sp. 14-3 una cepa procedente de la Antártida y aislada en nuestro laboratorio, acumula gran cantidad de PHB y presenta una alta supervivencia y resistencia a estrés. Es nuestro objetivo analizar en esta especie la interacción de la expresión de los genes que intervienen en la síntesis de PHA con los genes involucrados en las redes regulatorias globales en bacterias, específicamente *anr* y *rpoS*.

Anr controla la expresión de los genes que codifican las enzimas involucradas en el crecimiento anaeróbico, entre ellas las relacionadas con la utilización del nitrato como aceptor de electrones alternativo y la fermentación de la arginina. RpoS controla la expresión de genes que protegen a la célula ante la escasez de nutrientes o la presencia de sustancias nocivas, actuando como regulador de la respuesta general a estrés. La presencia de RpoS se analizó mediante la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo anti-RpoS de *P. putida* en cultivos de *Pseudomonas* sp.14-3 en distintas fases de crecimiento y de acumulación de PHB. RpoS fue detectado desde la fase de crecimiento exponencial. Utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de regiones conservadas de las secuencias de distintas especies de *Pseudomonas* disponibles en bases de datos, se logró amplificar por PCR un fragmento que mostró alta identidad con el gen *rpoS* proveniente de *P. tolaasii*. En relación al Anr, se analizó el crecimiento de *Pseudomonas* sp. 14-3 en microaerofilia y anaerobiosis en medios suplementados con nitrato. Se detectó la producción de nitritos derivados de la reducción del nitrato durante el crecimiento en condiciones de baja tensión de O₂. A partir de una biblioteca genómica de *Pseudomonas* sp. 14-3 se rastreó el gen *anr* mediante experimentos de complementación de una mutante de *E.coli* Δfnr (gen homólogo a *anr*). Se analizaron distintos fenotipos como la producción de gas por fermentación de glucosa y la morfología y el color de las colonias en agar MacConkey suplementado con nitrato en anaerobiosis. De un clon que mostró resultados positivos se aisló un cósmido que fue luego digerido con *EcoRI* y los fragmentos obtenidos se subclonaron en pBBR1MSC2. Con estas nuevas construcciones se realizaron ensayos de complementación de la cepa de *E.coli* Δfnr . Se continúa el análisis de un fragmento de aproximadamente 10 kb que logró restaurar el fenotipo salvaje en la mutante *fnr*. En este estudio se han identificado los reguladores globales Anr y RpoS en *Pseudomonas* sp. 14-3. El clonaje de los genes permitirá en el futuro, a través de la construcción de mutantes, la evaluación de la influencia de estos reguladores en la fisiología de esta bacteria y en particular en la síntesis de PHB.

P33 Archaeal rDNA sequences can be retrieved using 18S rDNA primers.

Covacevich F.¹, Cumino A.¹, Silva R.², Negri R.², Salerno G.L.¹
^[1] Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA, ^[2] INIDEP, Mar del Plata, Argentina. fcovacevich@fiba.org.ar

The Archaea are a group of prokaryotes that were recognized in 1977 as an independent monophyletic domain of life. Although many archaea colonize extreme environments, archaeans are not restricted to extreme environments. New research is showing that archaeans are also quite abundant in the plankton of the open sea. In an attempt to recover picoeukarya, we used PCR with eukaryotic specific primers. Surprisingly, we retrieved some sequences corresponding to non eukaryotic organisms. Samples for picoplankton were collected from surface well-mixed water collected in September, October and November 2003 at the fixed EPEA Station (38°28'S-57°41'W at 20 km south of Mar del Plata, Argentina). Water samples were prefiltered through a 5 µm pore size membrane and then filtered through a 0.2 µm pore size. Filters were transferred into a cryovial tube containing a DNA lysis buffer, immediately frozen in liquid nitrogen until analysis in the laboratory. Nucleic acid (DNA) extraction was performed, using the phenol-chloroform method and DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis. Extracted DNA was used as the template in a PCR reaction using eukaryotic 18S ribosomal DNA (rDNA)-specific primers (Diez et al., 2001). An aliquot of the PCR product was electrophoresed in an agarose gel and quantified. Two bands were obtained from the samples extracted in September and October. Higher bands were about 1700 kb and lower bands were about 1500 kb. Only one band of about 1700 kb was obtained from sample extracted in November. Bands were separately excised and DNA from de agarose gel was extracted. The PCR product was used to construct libraries with a pGemTeasy cloning kit. The presence of rDNA inserts was confirmed by PCR amplification with the same amplification conditions. DNA products of expected sizes were digested with restriction enzyme *HaeIII*. The restriction fragment length polymorphism (RFLP) products were visualized after electrophoresis in low-melting-point agarose gel. Clones with different RFLP patterns were sequenced (Macrogen, Corea). Nucleotide sequences were subjected to a BLAST search to determine the phylogenetic affiliation. Sequence alignments were generated with the CLUSTALX software and dendograms were compiled by using the neighbor-joining method of CLUSTALX and the maximum parsimony algorithm of the PHYLIP package. Sequences of higher bands corresponded to eukaryotic organisms. However, sequences of lower DNA bands corresponded to archaeal organisms. Phylogenetic analysis showed that sequences of lower bands corresponded to eight different archaea. All of them were grouped with the Marine Group II of Euryarchaota organisms, which is characterized as a methanogen-halophile lineage. The organisms of this group have been shown to fix nitrogen and have been reported, in general, in the deep sea. This study relies in the importance of recovering rDNA archaeal sequences from surface water samples from the Argentinean Sea by using specific primers of eukaryotic organisms.

P34 Análisis proteómico de la transición entre la fase exponencial y estacionaria en la arquea haloalcalófila *Natrialba magadii*.

D'Alessandro CP, Ronchi VP, De Castro RE y Paggi RA.
IIB-FCEyN. UNMdP. CC 1245, 7600 Mar del Plata.
E-mail: celed1881@yahoo.com.ar

El crecimiento es un proceso que ha sido estudiado en bacterias pero ha sido relegado en las arqueas. Se ha demostrado que ocurren cambios en diferentes niveles, como por ejemplo, modificaciones en el patrón de proteínas. *Natrialba magadii* es una arquea haloalcalófila que requiere 4 M NaCl y pH 10 para su crecimiento. El objetivo de este trabajo fue comparar el patrón global de proteínas de *Nab. magadii* durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria mediante electroforesis mono (1D) y bi-dimensional (2D).

Se realizaron cultivos en medio para arqueas haloalcalófilas (4M NaCl, pH 10) a 37°C y agitación constante. Se cosecharon células en las fases exponencial y estacionaria de manera independiente. El pellet fue resuspendido en Tris-HCl 0,1 M (pH 8) con 2 mM EDTA y 1 mM PMSF. La ruptura celular se obtuvo por sonicación siendo los restos celulares removidos por centrifugación. Las proteínas fueron precipitadas con igual volumen de acetona fría al 100%. Luego se centrifugó (11500 g, 20 min), el pellet fue lavado tres veces con acetona fría y resuspendido en glicerol 0,25 M. Se cuantificaron las proteínas por el método de ácido bicinonínico. Los geles 1D (SDS-PAGE 12%) fueron sembrados con 1 µg prot/calle y teñidos con plata. En los geles 2D, la primera dimensión (isoelectrofoque) fue realizada en capilares con la siguiente proporción de anfolitos: 30% de pH 2,5-5, 40% de pH 4-6,5 y 30% de pH 3-10, mientras que la segunda fue por SDS-PAGE 12%. Se sembraron 60 µg prot/capilar y se tiñeron con Coomassie Blue Coloidal. Las imágenes fueron analizadas con programas específicos para cada caso.

Al analizar el perfil de bandas obtenidas en los geles 1D, se observó que las proteínas más abundantes se encontraban en el rango de PM 60-66 kDa. Se comparó el patrón de proteínas entre fases detectándose 8 bandas de 17, 37, 38, 43, 47, 73, 74 y 80 kDa cuya intensidad se modificó entre las fases de crecimiento. Siete de ellas presentaron un contenido proteico mayor en la fase exponencial, y sólo la banda de 74 kDa fue más abundante en la fase estacionaria. Para los geles 2D, el patrón de spots de cada fase de crecimiento se generó a partir de 2 replicas de cada gel, obtenidas de dos cultivos independientes de *Nab. magadii*. Se detectaron 188 spots en la fase exponencial y 198 en la fase estacionaria distribuidos principalmente en un rango de 18-96 kDa y pl de 2.5-6. Se generó una curva patrón formada por todos los spot de ambas fases con un total de 225 spots. El 13% correspondieron exclusivamente a la fase exponencial, 19% a la fase estacionaria y el 67% estuvieron presentes en ambas fases. Dentro de estos últimos, el 44% no varió su intensidad entre las fase de crecimiento mientras que el 12% aumentó y 12% disminuyó su contenido proteico en la fase estacionaria en comparación con la exponencial. Se consideró como significativa la variación en la intensidad sólo a valores mayores o iguales a 2. Como conclusión, se puede sugerir que existiría un cambio en el patrón proteico global de *Nab magadii* durante el crecimiento en el cual se degradan proteínas presentes durante la fase exponencial del crecimiento y se induce la expresión de un número mayor de genes durante la fase la estacionaria.

P35 Expresión diferencial de transcritos durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento en *Natrialba magadii*.

Enrique Madrid, Roberto Paggi, Rosana De Castro. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNMdP. cc.1245 (7600) Mar del Plata. E-mail eamadrid@mdp.edu.ar.

Los extremófilos habitan en ambientes en donde las condiciones resultan letales para otras formas de vida. En particular, las arqueas haloalcalófilas han colonizado lugares con concentraciones de sal cercanas a 4M NaCl y valores de pH entre 10-12. En nuestro laboratorio se han caracterizado los sistemas proteolíticos de las arqueas haloalcalófilas *Natronococcus occultus* y *Natrialba magadii*. También hemos sugerido la ocurrencia de vías de señalización por “quorum sensing” en el dominio Archaea.

La amplificación del ARN con “oligoprimers” al azar (RAP-PCR) constituye una herramienta poderosa para identificar genes que se expresen diferencialmente. Cada tratamiento de la muestra genera su propio patrón de huellas de ARN para cada condición examinada. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la expresión diferencial de genes en respuesta a la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria en la arquea haloalcalófila *Nab. magadii*.

El estudio de la expresión diferencial se realizó utilizando dos cultivos independientes de *Nab. magadii*. El ARN fue obtenido en la fase exponencial y estacionaria de ambos cultivos y fue sometido a 2 rondas de digestión con DNasa libre de RNasa para eliminar el ADN genómico contaminante. El ADNc de primera cadena se sintetizó utilizando un “oligoprimers” al azar con un contenido de G+C del 70%

Se realizaron RAP-PCR con diferentes combinaciones de “oligoprimers” al azar, 70%-80%, 70%-60%, 70%-50% y, además, otras combinaciones de “oligoprimers” en las que se modificaron las posiciones de las bases AT. Todas las amplificaciones se hicieron por duplicado.

En este trabajo se presentan únicamente los patrones de transcritos generados con las combinaciones 70%-80% (a) y 70%-60% (b), respectivamente. La combinación (a) generó un patrón de 45 bandas totales resultando 7 transcritos diferenciales entre la fase exponencial y la estacionaria. Por otra parte, la combinación (b) presentó un patrón de 60 bandas totales de las que sólo 12 presentaron expresión diferencial entre la fase exponencial y la estacionaria. En los duplicados se observó el mismo patrón de bandas. Luego de las reamplificaciones, los productos obtenidos estuvieron comprendidos entre 0,1 y 0,65 kb.

Estos resultados preliminares nos permitieron optimizar una metodología reproducible para estudiar la expresión de transcritos en *Nab. magadii* bajo diferentes situaciones.

La caracterización de los transcritos diferenciales permitirá identificar los genes cuya expresión se modifica en cada etapa de crecimiento y, en un futuro, permitirá comprender la naturaleza de los mecanismos genéticos y moleculares utilizados en la comunicación intercelular por las haloarqueas respondiendo a las necesidades de adaptación a condiciones ambientales extremas.

Subsidiado por Conicet y Universidad Nacional de Mar del Plata.

P36 Biosynthesis and secretion of a novel metallo- β -lactamase from an opportunistic pathogen in *E. coli*.

Morán Barrio, J., Gonzalez, J.M., Limansky, A.S., Vila, A.J., and Viale, A.M.

IBR (CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Suipacha 531. 2000 Rosario, Argentina. E-mail: moran@ibr.gov.ar

In *E. coli*, secreted proteins with an ultimate destination to the periplasm are synthesized in the cytoplasm as precursors with a cleavable amino-terminal signal sequence. The translocation across the inner membrane is accomplished by the Sec machinery (SecYEG/SecA). In the cytoplasm, preproteins must be sorted to the membrane complex in an extended conformation, protected from aggregation and competent with the secretion process. σ^{32} -dependent cytoplasmic chaperones such as GroEL/GroES (Hsp60-type) and DnaK/DnaJ/GrpE (Hsp70-type), as well as σ^{32} -independent chaperones such as SecB and Trigger Factor (TF) had been proposed as candidates for this function.

We use as a secretion model the expression in *E. coli* of the metallo- β -lactamase (M β L) GOB gene from the gram-negative opportunistic pathogen *Elizabethkingia meningoseptica* (family *Flavobacteriaceae*, class *Flavobacteria*). The GOB enzyme shares the common $\alpha\beta/\beta\alpha$ sandwich fold characteristic of the M β Ls. However, the primary structure shows some residue substitutions in highly conserved positions that build up the active site in most related M β Ls, making the GOB lactamase a very interesting issue of study.

Size exclusion chromatography and isoelectric focusing revealed that GOB is a monomeric enzyme with a pI of 8.3. Kinetic parameters additionally indicated a broad-substrate spectrum to β -lactam antibiotics. However, and contrasting other related di-zinc M β Ls, GOB is a mono-zinc enzyme and uptake of an extra zinc ion is not essential for activity. Based on EXAFS data and 3D modeling, it is proposed that GOB has a novel mononuclear zinc active site different from other related M β Ls.

Genetic procedures indicated a fundamental role of the Sec machinery (SecA and the SecYEG translocon) for GOB secretion to the periplasm, and a minor role of SecB in this process. In addition, main cytoplasmic chaperones including DnaK and TF were required for GOB secretion, as judged by the low levels of M β L activity found in the corresponding mutants. Moreover, the use of double mutants deficient in SecA and TF provided evidence for a close cooperation between these two chaperones in GOB secretion. Conversely, GroEL/S deficient mutants showed minor effects on GOB secretion, indicating minor or no roles of these chaperonins in this process. Where and how the uptake of the zinc ion takes place and whether specific periplasmic components are involved in productive GOB folding are under study.

P37 Mutantes en la síntesis de isoleucina y valina de *Sinorhizobium meliloti* son deficientes en la nodulación de *medicago sativa*.

María de las Nieves Peltzer¹, Delphine Capela², Jacques Batut², O. Mario Aguilar¹.

¹Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, 47 y 115 La Plata; 1900; e-mail: nievespeltzer@hotmail.com; ²Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, UMR INRA, Toulouse, Francia

Mutantes de *Sinorhizobium meliloti* en el gen *ilvC* - enzima isomerorreductasa de la ruta biosintética de valina e isoleucina- son defectivos en el crecimiento en medio mínimo y nodulación de su hospedadora *Medicago sativa* (Aguilar y Grasso 1991 y López et al. 2001). No se detecta expresión significativa de los genes de nodulación (*nod*) necesaria para la síntesis del factor Nod. Estos resultados señalaron la existencia de ligazones entre genes específicos implicados en la interacción con la planta y genes pertenecientes al metabolismo general celular.

Con el fin de investigar la ligazón entre el fenotipo simbiótico y la vía de síntesis de isoleucina y valina, se generaron en un linaje diferente de *S. meliloti* 1021, dos mutantes en los genes *ilvC* e *ilvD* (gen de la dihidroxiácido dehidratasa que cataliza el paso siguiente al paso de la isomerorreductasa) aplicando mutagénesis sitio-dirigida. Los mutantes resultantes fueron confirmados mediante *southern blot* y examinados en sus propiedades auxotróficas y simbióticas. Tanto los mutantes *ilvC* como *ilvD* resultaron ser deficientes en la nodulación, produciendo nódulos vacíos y de morfología atípica. Este fenotipo no fue revertido en medio suplementado con los aminoácidos necesarios.

Se realizó un análisis transcriptómico usando microarreglos de ADNc. Los mutantes mostraron varios genes cuya transcripción fue diferente a la cepa salvaje. En particular cuatro genes aparecieron "up regulated" en los mutantes, que se correspondieron con *ilvH*, *ilvI* y *ilvC*, etapas de la síntesis de isoleucina y valina y un cuarto gen hipotético ubicado aguas arriba de *ilvC* cuyo producto pertenecería a la familia de reguladores transcripcionales TetR. El nivel de expresión en los mutantes *ilvC* e *ilvD* es de aproximadamente 3 veces el nivel en el fondo salvaje, respectivamente.

En ensayos de *Real Time*-PCR con cebadores específicos para *nodC*, y bajo condiciones de inducción por luteolina, se observó un menor nivel de expresión basal de *nodC* en el mutante *ilvC* con respecto a la cepa salvaje. Además, se determinó la actividad transcripcional *nod* de los mutantes usando una fusión génica *nodABC-lacZ*, en ausencia y presencia de luteolina. Se observó un menor grado de inducción en los mutantes *ilvC* aunque no se observaron diferencias entre la cepa salvaje y los mutantes *ilvD*.

Podemos concluir que ambos mutantes *ilvC* e *ilvD* son deficientes en la nodulación, aunque los respectivos fenotipos difieren entre sí. Si el fenotipo *ilvC* e *ilvD* está directamente asociado al déficit de esas actividades o a otra causa indirecta, es objeto de otros estudios

P38 The outer membrane factor of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence.

Diana M. Posadas¹; Fernando A. Martín¹; Julia Sabio García²; Juan M. Spera³; Silvio Cravero² and Angeles Zorreguieta¹

¹Fundación Instituto Leloir, CONICET and FCEyN, University of Buenos Aires, Patricias Argentinas 435, (C1405BWE) Buenos Aires, Argentina. Contact e-mail: dposadas@leloir.org.ar

² Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, P.O. Box 77, 1708 Morón, Buenos Aires, Argentina. ³ Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad de Gral. San Martín (IIB-UNSAM), Av. Gral. Paz 5445, INTI, Ed. 24, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Brucella spp., like other pathogens, must cope with the environment of diverse host niches during the infection process. In doing this, pathogens evolved different type of transport systems to help them survive and disseminate within the host. Members of the Outer Membrane Factor (OMF) in association with two inner-membrane proteins were shown to be involved in the export of chemically diverse molecules ranging from large protein toxins to small toxic compounds. The role of proteins from this family in *Brucella* and other α -2 proteobacteria was little explored. The gene encoding the unique *Brucella suis* OMF protein (Bep) was cloned and expressed in a mutant of *E. coli* disrupted in the gene encoding the OMF componente TolC that has the peculiarity to be involved in diverse transport functions. Bep fully complemented the resistance to drugs such as chloramphenicol and acriflavine but was incapable to restore α -hemolysin secretion in the *tolC* mutant of *E. coli*. An insertional mutation in the *bep* gene strongly affected the resistance phenotype of *B. suis* to bile salts and toxic chemicals like ethidium bromide and rhodamine and significantly decreased the resistance to antibiotics such as erythromycin, ampicillin, tetracycline and norfloxacin. Moreover, the *bep* mutant of *B. suis* was attenuated in the mice model. Taking together, these results suggest that in *B. suis*, efflux processes of toxic compounds that are Bep dependent contribute to survival inside the host.

P39 Requerimiento del nucleotido modificado 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenosina en el tRNA de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 para la expresión de factores de biocontrol.

Dante E. Ruiz y Claudio Valverde.

Programa Prioritario de Investigación sobre Interacciones Biológicas - Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes - Roque Sáenz Peña 352, Bernal, B1876BXD, Pcia. Buenos Aires. E-mail: cvalver@unq.edu.ar

En la cepa biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0, la síntesis de antibióticos, HCN y la proteasa extracelular AprA, está activada por el sistema de dos componentes GacS/GacA que controla la expresión de los genes de biocontrol a nivel post-transcripcional. Dado que aún resta determinar la identidad de elementos de la cascada de activación (como la naturaleza de la/s señal/es que activa/n el sensor de membrana GacS) se realizó una mutagénesis generalizada con Tn5 de la cepa CHA805, isogénica de CHA0, que lleva una fusión cromosomal *aprA'*-*lacZ*. Entre aprox. 1000 colonias, se identificaron 12 clones con actividad β -galactosidasa reducida ($\geq 10\times$) en cultivo líquido. Mediante *tail*-PCR se localizó la inserción de Tn5 en el sensor *gacS* (4/6 clones), en un posible regulador transcripcional (1/6 clones) y en el gen *miaA* que es parte del operón *amiB-mutL-miaA-hfq-hflXKC* (1/6 clones). *miaA* codifica una isopenteniltransferasa necesaria para la modificación de la adenina 37 próxima al anticodón de tRNAs que decodifican codones UNN. El mutante *miaA*::Tn5 no presenta defectos de crecimiento, pero además de expresar *aprA'*-*lacZ* con dificultad, produce menor cantidad de HCN y es incapaz de inhibir el desarrollo del oomicete *Pythium ultimum* en cocultivo. Sin embargo, otros fenotipos dependientes del sistema GacS/GacA, como la síntesis de fosfolipasa extracelular, de triptofano-oxidasa y la motilidad tipo *swarming*, son indistinguibles de CHA0. Estos efectos de la inserción Tn5 en *miaA* no pueden ser explicados por un efecto polar en *hfq* ya que en CHA0 la ausencia de *hfq* no afecta la producción de HCN y AprA. La sobre-expresión de los riboreguladores *rsmY* o *rsmZ*, que desreprimiría completamente la traducción de los ARNm dependientes de GacS/A como *aprA* y *hcnABC*, no fue capaz de revertir la reducida actividad *aprA'*-*lacZ* ni la producción de HCN. Los resultados obtenidos indican que en *P. fluorescens* CHA0, el producto del gen *miaA* es esencial para la expresión de *aprA* y el operón *hcnABC*, y por lo tanto, para la manifestación de rasgos biocontrol. Esto podría deberse a que la mutación *miaA*::Tn5 provoca una reducción de la eficiencia de traducción de los ARNm afectados, como se ha reportado en *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas putida*.

P40 Caracterización fisiológica de los sistemas proteolíticos expresados en diferentes condiciones nutricionales en la arquea haloalcalófila *Natrialba magadii*.

Sastre Diego E. y De Castro Rosana E.

Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN-UNMdP, CC 1245. Mar del Plata (7600), Argentina. E-mail: sastre@mdp.edu.ar

Las arqueas constituyen uno de los tres dominios en los cuales se dividen los seres vivos. Las arqueas haloalcalófilas viven en condiciones extremas de salinidad (~4 M NaCl) y pH (9-11), siendo *Natrialba magadii*, una especie representante de este grupo. Los halófilos son organismos fascinantes por las estrategias fisiológicas que han desarrollado para vivir y por su potencial aplicación biotecnológica. En particular, las haloarqueas poseen un metabolismo eficiente para la degradación de proteínas. *Nab. magadii* produce una proteasa extracelular (NEP), que fue purificada y caracterizada a nivel bioquímico-molecular en nuestro laboratorio. Además, tres proteasas intracelulares (NSP, NMP y NXP) y un inhibidor endógeno (NSI) fueron detectados y parcialmente caracterizados en este microorganismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estado nutricional de las células sobre la producción de las actividades proteolíticas de *Nab. magadii*. Se realizaron cultivos con 5 y 20 g/l de extracto de levadura (E.L, fuente de C y N) y cultivos que fueron sometidos a varias horas de "hambreado" mediante la remoción del E.L del medio de cultivo, y se comparó el crecimiento celular y la producción de las actividades proteolíticas entre las diferentes condiciones. Todos los cultivos presentaron la misma velocidad de crecimiento ($\mu = 6 \text{ hs}^{-1}$ a 37°C). Sin embargo, los cultivos crecidos con 5 g/l E.L alcanzaron una densidad celular ($DO_{600} \approx 1,5$) inferior a la observada en cultivos crecidos con 20 g/l E.L ($DO_{600} \approx 2,5$). Después de la remoción del E.L el crecimiento celular se detuvo. La actividades de NSP y NSI presentaron una correlación inversa a lo largo de la curva de crecimiento, siendo NSP inducida durante la fase estacionaria únicamente en células crecidas con 5 g/l E.L. La actividad extracelular (NEP) se acumuló durante la fase estacionaria en cultivos con 5 y 20 g/l E.L; sin embargo, apareció tempranamente y alcanzó niveles superiores en cultivos con 5 g/l E.L. En este estudio se detectó una actividad leucin-aminopeptidasa que designamos NLAP, que fue caracterizada parcialmente a nivel bioquímico. Los niveles de actividad de NXP, NMP y NLAP disminuyeron notablemente durante la transición de fase exponencial a estacionaria en cultivos de 5 g/l E.L y "hambreados". La máxima expresión se observó en células en fase exponencial y en cultivos de fase estacionaria no limitados en nutrientes (20 g/l E.L). Se sugiere que estas enzimas participarían en el recambio de proteínas intracelulares durante el crecimiento activo y/o no estarían vinculadas con situaciones de estrés, a diferencia de NSP y NEP. Por otra parte, se observó que en cultivos crecidos con menor concentración de nutrientes la masa de proteínas celulares disminuyó luego de la entrada en fase estacionaria. Esto se debería probablemente a un aumento en la degradación de proteínas intracelulares para suplir las necesidades nutricionales de las células. Estos resultados contribuyen al conocimiento básico del metabolismo proteico en las Arqueas y en los microorganismos extremófilos. Subsidiado por CONICET y UNMdP.

Índice de autores

Abate CM	C16 - P16	Gabbarini LA	P3
Abraham AG	P2	Galar ML	P11
Aguilar OM	C11 - P37	Gally M	P12
Álvarez Crespo MC	P4	Galvagno MA	P24
Amoroso MJ	P16	Garavaglia L	P18
Apablaza O	P22	García A	P8 - P14 - P28
Apra J	P11	García JS	P38
Ayelén H	C1	Garrote GL	P2
Ayub ND	C19	Giraudó MR	C15
Ballesteros SI	P9	Godeas A	P10
Barbagelata R	C15 - P22	González F	P21
Barda N	C15	González JM	P36
Batut J	P37	Hernández A	P8 - P14 - P28
Berón C	P30	Herrera Seitz K	C9
Bianchi LV	P18	Hollmann A	C2
Boiardi JL	P11	Ibáñez F	C4
Breccia JD	C16	Iribarren AM	C14
Brucini MP	C18	Juy MI	P25
Bustos P	P31	Kakisu EJ	C1
Caballero A	C15 - P22 - P26	Kannenbergh E	C18
Capela D	P37	Kemppainen M	C17
Castagnaro A	C6	Kerber N	P8 - P14 - P28
Castaño C	C5	Kronberg MF	P24
Catone M	P32	Lavalle TL	P22
Ceretti H	P23	LeBlanc JG	P1
Cohen AC	P5	León M	P8 - P14
Conde Molina D	P24	Levin L	P12 - P20
Coppotelli BM	P19	Lewkowicz ES	C14
Correa D	P17	Limansky AS	C13 - P36
Correa OS	P6 - P28	Lopes C	P22 - P26
Covacevich F	P33	López AM	C16
Cravero S	P38	López NI	C19 - P32
Cristóbal HA	C16	Lorda G	C5 - P15
Cumino A	P33	Lucca ME	P25
D'Alessandro CP	P34	Lugo MA	P9
Daniel MA	P18 - P23	Luna MF	P11
De Antoni GL	C1 - C2 - P2	Madrid E	P35
De Castro R	C9 - P27 - P34 - P35 - P40	Madueño L	P19
de Estrada M	P6	Malamud F	C6
Del Panno MT	C8 - P19	Marano MR	C6
Delfederico L	C2	Marcozzi C	C12
Dias RL	C8	Martin F	C17
Diorio L	P10	Melignani E	P17 - P20
D'Ippólito S	C9	Méndez BS	C19 - P32
Downie A	C18	Mendizábal MC	P11
Duplessis S	C17	Menoyo E	P9
Eppis MR	P18	Mercuri A	P10
Ertola R	C3	Mobili P	P2
Fabra A	C4 - P13	Molinari ML	P11
Ferrero MA	P9 - P23	Monasterio RP	P15
Forchiassin F	P20	Morán Barrio J	P36
Fossati CA	P2	Morelli IS	C8 - P19

Muglia CI	C11	Valdés D	C7
Murialdo S	P21	Valverde C	C10 - P4 - P7 -P39
Mussi MA	C13	Viale AM	C13 - P36
Negri R	P33	Vila AJ	P36
Nisenbaum M	P21	Vojnov A	C6
Nóbile M	C14	Vullo DL	P18 -P23
Orejas JA	P25	Wall LG	C7 - P3 - P7
Paggi RA	P34 - P35	Yantorno O	C3
Pagliari F	C5	Yaryura P	P8 - P14
Pardo A	C17	Zajonskovsky I	P22
Parisi M	P12	Zalts A	P23
Pastor MD	C5 - P15	Zorreguieta A	C6 - C18 - P38
Peltzer MN	P37		
Pérez PF	C1		
Pettinari MJ	C19		
Piard JC	P1		
Piccoli PN	P5		
Polti MA	P16		
Pontin MA	P5		
Posadas DM	C18 - P38		
Prieto C	C3		
Pucheu N	P8 - P14 - P28		
Ramírez S	P23		
Ramos AM	P12		
Relling V	C13		
Rigano L	C6		
Rodríguez ME	C15 - P22 - P26		
Ronchi VP	P34		
Ruiz DE	P7 - P39		
Ruiz DM	P27		
Russo DM	C18		
Ruzal S	P31		
Sacco N	P28		
Salerno GL	C12 - P30 - P33		
Salomone V	P17		
Sánchez-Rivas C	P31		
Sangorrín M	P22 - P26		
Sastre DE	P40		
Savoy de Giori G	P1		
Segovia de Huergo M	P24		
Semorile L	C2		
Serradell MA	P2		
Sesma F	P1		
Silva HJ	P29		
Silva PG	P29		
Silva R	P33		
Siñeriz F	P9		
Sobrero P	C10		
Soria MA	P6 - P28		
Spera JM	P38		
Studdert C	C9		
Sydorenko O	P28		
Taurián T	P13		
Tonelli ML	P13		
Torres P	C6		
Tribelli PM	P32		