

Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE)

IV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

**27 y 28 de septiembre 2007
Fundación Instituto Leloir
Buenos Aires**

***"Dedicado a la presentación de trabajos de investigación básica sobre
microorganismos (bacterias, arqueas, hongos y levaduras)"***

Comisión Organizadora SAMIGE 2007

Carlos Argaraña, Néstor Cortez, Marcela Ferrero, Axel Hollmann, Viviana Lepek, Nancy López, Beatriz Méndez, Claudio Valverde, Diana Vullo, Osvaldo Yantorno, Daniela Russo y Angeles Zorreguieta.

Comisión SAMIGE

Augusto García, Mario Aguilar, 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, Diana Vullo, Osvaldo Yantorno (Vicepresidente) y Angeles Zorreguieta (Presidente).

Comité de Honor

Marcelo Dankert, Gabriel Favelukes y Horacio Pontis

Instituciones auspiciantes



**Comisión de
Investigaciones Científicas**
Gobierno de la Provincia
de Buenos Aires



INSTITUTO LOIROP
FUNDACIÓN

Empresas auspiciantes



Biodynamics

CHEMIT ARGENTINA S.R.L

Representantes:

CARLO ERBA

Kartell

Distribuidores:

CICARELLI

**I.V.A. – SCHOTT – PYREX – WHATMAN – VICKING – FAETA - SCS
PARAFILM**

Arregui 4260 – Capital Federal – Tel/Fax: (011)4566-3989 (rotativas)
e-mail: chemitargentina@chemitargentina.com.ar

GE Healthcare



imagination at work

Más de 90 Reactivos de laboratorio en stock con entrega inmediata.
Consulte nuestros precios y promociones en www.gelifsciences.com

Recuerde que también distribuimos en Argentina:

- **Agilent:** Expresión génica / CGH
- **Stratagene:** Real Time PCR
- **USB:** Consumibles / Ultrapuros

Sales.ar@ge.com
(011)4576 3030



invitrogen™ Acelera >>

Molecular Probes™
 invitrogen detection technologies

el camino al descubrimiento científico

GIBCO®
 invitrogen cell culture

Real Time PCRy RT-PCR, primers LUX, Supermix con SYBR Green, ROX
 Síntesis de primers (DNA; RNA y siRNA) y péptidos

DYNAL®
 invitrogen bead separations

Enzimas de amplificación para PCR y RT-PCR

CALTAG™ Laboratories
 invitrogen immunodetection

Kits para purificación de ácidos nucleicos

BIOSOURCE™
 invitrogen cytokines & signaling

Kits para clonado - Vectores TOPO

ZYMED® Laboratories
 invitrogen immunodetection

Medios de cultivo celular

Separación inmunomagnética

Marcación y detección

Anticuerpos y reactivos para citometría de flujo

Citoquinas y señalización celular

Ingrese a www.invitrogen.com.ar y conozca nuestras promociones
 Escriba a arorders@invitrogen.com y asesórese sobre nuestra amplia variedad de productos



Iturri 1474 | C1427AED | Buenos Aires | TE 5411 45560844 | FX 5411 45560744
www.invitrogen.com | arorders@invitrogen.com

TRADING NEW TECHNOLOGIES S.A.



Productos Descartables para Biología Molecular y Cultivo de Tejidos

	Insumos Plásticos para Laboratorio	Insumos Plásticos Para Biología Molecular	
		Repuestos Para Cubas De Electroforesis Vertical	
Productos Plásticos para Cultivo Celular			

Av. Fco Laprida 3460 Villa Martelli Bs.As. Tel +54 +11 +41376776
Mail : ventas@tnt-lab.com.ar

PROGRAMA DE LA REUNION

SAMIGE-2007

Jueves, 27 de septiembre

- 8:00 - 9:15 Registro
- 9:30 Apertura
- 9:35 Conferencia Inaugural: **Dr. Víctor de Lorenzo.** Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España

“Regulación global en bacterias del suelo: es la economía, estúpido!”

10:35 – 11:00 ***Intervalo y café***

- 11:00 - 12:20 Comunicaciones Orales: Sección 1
Biodiversidad y Microbiología Ambiental
Moderador/es: Marcela Ferrero – Leonardo Erijman

C1: “Cambios en la relación entre ARN y ADN ribosomal como reflejo del estado de sucesión en comunidades bacterianas”

Leandro Guerrero, Leonardo Erijman. INGEBI-CONICET. Buenos Aires.

C2: “Novel polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase genes detected in coastal sediments of Patagonia”.

Mariana Lozada, Juan Pablo Riva Mercadal, Walter Di Marzio, Marcela Ferrero and Hebe Dionisi. Centro Nacional Patagónico (CENPAT - CONICET), Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

C3: “Presencia y diversidad del gen *arsB* en distintos sistemas de lagunas de los Andes”.

Jessica Motok, Lara J., Ferrero M., Farías M.E. PROIMI – Tucumán.

C4: “Caracterización de una bacteria degradadora de hidrocarburos, *Rhodococcus sp. 602*”.

Roxana A. Silva, Nelda Olivera, Vincent Grossi, Héctor M. Alvarez. CRIDECIT, Universidad Nacional de la Patagonia, Comodoro Rivadavia, Chubut, CENPAT- CONICET, Puerto Madryn, Chubut, CNRS, Université Lyon 1, Villeurbanne Cedex, Francia

12:20 – 12:40

C5: “Redmicro”.

Dra. Claudia A. Studdert. Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata

Almuerzo

- 14:30 -16:00 **Sesión de posters**
Sección 1: **Biodiversidad y Microbiología Ambiental**

Sección 2: **Biorremediación y Biocontrol**Sección 3: **Interacción Microorganismo-Hospedador***Con café*

16:00 – 17:00

Comunicaciones Orales

Sección 2: **Biorremediación y Biocontrol**

Moderador/es: Carlos Argaraña – Augusto García

C6: “Contribución de la interacción Planta-Microorganismos a la efectividad de la fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno”.Diego Daniel Hariyo, Nardillo A. y Morelli I.S. CINDEFI (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. La Plata.**C7: “Estudio de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por comunidades bacterianas de suelo empleando resinas de intercambio iónico como modelo experimental”.**Ana Mari López, A. Bosch, O. M. Yantorno, M. T. Del Panno. CINDEFI (CONICET-UNLP), La Plata.**C8: “Colonization of seeds and roots of two soybean varieties by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339 is affected by the corresponding exudates”.**Pablo Marcelo Yaryura, Mariana León, Olga S. Correa, Norma L. Kerber, Norma L. Pucheu and Augusto F. García. Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas (IBYF-CONICET-FAUBA) and Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía (UBA).17:00 – 17:15 *Intervalo*

17:15 – 18:35

Comunicaciones orales

Sección 3: **Interacción Microorganismo- Hospedador**

Moderador/es: Antonio Lagares – Luis Wall

C9: “Participación del lipopolisacárido de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en la interacción Planta-Patógeno.Silvana Petrocelli; Jorgelina Ottado; Elena G. Orellano. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, IBR (CONICET), Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR**C10: “Caracterización y regulación génica de los sistemas RND en *Brucella suis*”.**Fernando A. Martín, Diana M. Posadas, David O'Callaghan, Angeles Zorreguieta. Fundación Instituto Leloir, FCEyN, UBA, IIBBA CONICET. INSERM U-431 Nimes Francia.**C11: “Formación de biofilm en *Xanthomonas axonopodis* bv. *citri*: rol en la supervivencia epifítica y desarrollo del cancro”.**Luciano A. Rigano, Florencia Siciliano, Ramón Enrique, Lorena Sendín, Paula Filippone, Pablo S. Torres, Julia Qüesta, Florencia Malamud, Atilio P. Castagnaro, María Rosa Marano, Adrián A. Vojnov. · Fundación Pablo Cassará, Centro de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein, Buenos Aires. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán. Instituto de Biología Molecular de Rosario, Rosario.**C12: “NrfA...¿Jugás en la interacción entre *Sinorhizobium meliloti* y alfalfa?”.**Patricio Sobrero y Claudio Valverde. Programa Interacciones Biológicas - Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes18:35 – 19:00 *Intervalo con café*

19:00 – 20:00 Conferencia Plenaria: **Dr. Rodolfo A. Ugalde.**
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, San Martín, Argentina.

“Brucella abortus virulence. Signals and delivery systems required for an intracellular journey and immune response modulation”

20:00 ***Vino de honor***

Cierre del primer día

Viernes, 28 de septiembre

09:00 – 10:00 Conferencia Plenaria: **Dr. Diego de Mendoza.**
Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

“Detección y transducción de señales que regulan la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en bacterias”

10:00 - 10:15 ***Intervalo con café***

10:15 - 11:35 Comunicaciones Orales
Secciones 4 y 6: **Fisiología y Metabolismo / Microbiología Molecular**
Moderador/es: Fernando Soncini-Graciela Salerno

C13: “La herencia de HfrH: el par regulador CreBC altera la respuesta redox en mutantes arc de *Escherichia coli*”.

Pablo I. Nikel, Alejandra de Almeida, M. Julia Pettinari, Beatriz S. Méndez. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM-CONICET, San Martín; Dpto. Química Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires.

C14: “Identificación de heterocomplejos proteicos en la membrana externa del patógeno gram-negativo *Acinetobacter baumannii*”.

Verónica Relling, Mussi María A., Limansky Adriana y Viale Alejandro. IBR (CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Rosario

C15: “Estrés osmótico en *Lactobacillus casei*: a la búsqueda de reguladores del sistema proteolítico”.

Mariana Claudia Allievi, Carmen Sanchez Rivas y Sandra M. Ruzal. Departamento de Química Biológica. Facultad Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

C16: “Interacción entre los receptores para quimiotaxis y la proteína acopladora CheW; implicaciones sobre la señalización”.

Marcos J. Cardozo, John S. Parkinson y Claudia A. Studdert. Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata. Mar del Plata

11:35 – 11:50 ***Intervalo***

11:50 – 13:10 Comunicaciones Orales: **Continuación** Sección 4

Microbiología Molecular

Moderador/es: Beatriz Méndez-Néstor Cortez

C17: “Rol de los lípidos en la activación del factor σ^E durante la esporulación en *B. subtilis*”.Verónica Diez, Gustavo E. Schujman y Diego de Mendoza. IBR - CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR. Rosario**C18: “Identificación y caracterización de mecanismos regulatorios de PhIA, la fosfolipasa B de *Serratia marcescens*”.**Fedrico, Griselda V., Castelli, María E., García Vescovi, Eleonora. BR-CONICET, Facultad de Ciencias. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.**C19: “Involvement of MutS in *Pseudomonas aeruginosa* adaptive mutagenesis: The acquisition of quorum-sensing-deficient (*lasR*) phenotype as an illustrative model”.**Luján A.M., Moyano A.J., Argaraña C.E. and Smania A.M. CIQUIBIC-CONICET, Fac. Cs. Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.**C20: “GolS induce un sistema de eflujo tipo CBA específico de *Salmonella* que confiere resistencia a oro y a compuestos orgánicos”.**Lucas B. Pontel, M. E. Perez Audero, M. Espariz, S. K. Checa y Fernando C. Soncini. IBR-CONICET, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina**Almuerzo**

14:30 -16:00 Sesión de posters
 Sección 4: **Microbiología Molecular**
 Sección 5: **Biotechnología y Fermentaciones**
 Sección 6: **Fisiología y Metabolismo**

Con café

16:00–17:00 Comunicaciones Orales: Sección 5
Biotechnología y Fermentaciones
 Moderador/es: Osvaldo Yantorno - Faustino Siñeriz

C21: “Selección de bacterias lácticas resistentes a bilis para su empleo en alimentos funcionales prebióticos”.Bustos, A Y., Raya, R., Font de Valdez, G., Taranto, M. P.. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET. Facultad de Bqca, Qca y Fcia, U. N. T., S. M. de Tucumán.**C22: “Búsqueda de microorganismos con actividad haloperoxidasa para su uso como biocatalizadores”.**Médici, R.; Juán Ignacio Garaycochea. J. I., Lewkowicz, E. S., Iribarren, A. M. Laboratorio de Biotransformaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Buenos Aires, Argentina, Laboratorio de ácidos nucleicos, INGEPI, CONICET, Buenos Aires.**C23: “Caracterización de la expresión y secreción de Capa S de *Lactobacillus brevis* en *Lactococcus lactis*.”**Axel Hollmann, Mariano Saviello, Anderson Miyoshi, Carolina Gonzalez, Lucrecia Delfederico, Vasco Azevedo y Liliana Semorile. Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes; Bernal, Buenos Aires. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

17:00-17:15 **Intervalo**

17:15-18:15 Comunicaciones Orales: *Continuación* Sección 5

Biotecnología y Fermentaciones

C24: “Producción de ácido itacónico por *Aspergillus terreus* MJL05 en un biorreactor de tanque agitado”.

Mariana I. Juy, María Ester Lucca, Joaquín A. Orejas. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ingeniería, Grupo de Ingeniería de las Reacciones. Río Cuarto. Córdoba. Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Qca. y Farmacia, UNT. PROIMI-CONICET

C25: “Desarrollo de sistemas de expresión para la producción de proteínas heterólogas en *Lactococcus lactis*”.

Belkis Marelli; Repizo, Guillermo; Suárez, Cristian; de Mendoza, Diego; Magni, Christian. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Dpto de Microbiología, UNR. Rosario.

C26: “Análisis de secuencias de imágenes de microscopía óptica para la detección de quimiotaxis bacteriana”.

Nisenbaum Melina, Emilio Maldonado, J. Froilán González, Lucía Isabel Passoni, Silvia E. Murialdo. Departamento de Ingeniería Bioquímica y Laboratorio de Bioingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires.

18:15 – 18:30

Intervalo con café

18:30 – 19:30

Conferencia de Cierre: **Dr. Roberto Kolter.**

Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Estados Unidos de América.

"El vocabulario químico de una conversación microbiana"

19.30

Asamblea Societaria

Cierre del Congreso

COMUNICACIONES ORALES

**SECCIÓN 1: BIODIVERSIDAD Y MICROBIOLOGÍA
AMBIENTAL**

C1: CAMBIOS EN LA RELACIÓN ENTRE ARN Y ADN RIBOSOMAL COMO REFLEJO DE ESTADO DE SUCESIÓN EN COMUNIDADES BACTERIANAS

Guerrero Leandro, Erijman Leonardo. INGEBI-CONICET. Vuelta de Obligado 2490. C1428ADN Ciudad de Buenos Aires. guerrero@dna.uba.ar

La utilización creciente de métodos moleculares de análisis ha permitido revelar la existencia de una enorme diversidad de bacterias en el ambiente. El gran volumen de información genética sólo puede ser utilizado para entender la estructura y función de comunidades microbianas en ambientes complejos cuando es interpretado en un contexto ecológico. Por ejemplo, se ha sugerido previamente que el número de copia de operones de ARN ribosomal podría ser utilizado como indicador genético de la estrategia ecológica de bacterias para la utilización de nutrientes. Sin embargo, el número de copias de operones del ARN ribosomal sólo puede determinarse en bacterias aisladas en cultivo. El objetivo de este trabajo es demostrar que la relación entre la cantidad de ARN y ADN ribosomal, estimadas mediante el uso de PCR cuantitativo, provee un indicador independiente de cultivo de estrategias ecológicas en bacterias. Se utilizaron dos reactores de barros activados a escala de laboratorio para seguir el desarrollo de una sucesión microbiana. El inóculo se obtuvo a partir de un reactor similar, luego cultivado durante 7 días en medio R2A. Los reactores de barros activados funcionaron durante 28 días con una secuencia diaria de alimentación con aireación (7 horas), aireación (15 horas), sedimentación (1,5 horas) y vaciado (0,5 horas). El tiempo de retención de los reactores se mantuvo en aproximadamente 6 días por eliminación diario de 15% de la biomasa. En todas las muestras se determinó viabilidad y cultivabilidad de las bacterias, y se cuantificó la cantidad de ARNr y ADNr 16S mediante PCR en tiempo real utilizando *primers* generales para el dominio Bacteria. También se determinaron los perfiles bacterianos en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE). Los resultados obtenidos para todos los análisis en ambas réplicas fueron similares. El análisis de DGGE mostró que ambos reactores evolucionaron de forma similar obteniéndose patrones de bandas similares para iguales tiempos. La relación ARNr:ADNr correlacionó negativamente con el estado de sucesión de las comunidades microbianas. La relación entre el número de copias de ARN y ADN disminuyó aproximadamente 20 a 30 veces desde el inicio hasta el final del experimento. Este valor sugiere que además de cambios en la estructura de la comunidad microbiana, que lleva al predominio de bacterias conteniendo un menor número de copias de ARN ribosomal, en las etapas más avanzadas de la sucesión las bacterias poseen un menor número promedio de ribosomas por célula. Aumentando el nivel de resolución filogenética de los *primers*, este procedimiento está siendo aplicado para distinguir las diferentes estrategias

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 ecológicas de grupos taxonómicos definidos de bacterias en el ambiente.

C2: NOVEL POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON DIOXYGENASE GENES DETECTED IN COASTAL SEDIMENTS OF PATAGONIA

Mariana Lozada¹, Juan Pablo Riva Mercadal², Walter Di Marzio³, Marcela Ferrero² and Hebe Dionisi¹

¹Centro Nacional Patagónico (CENPAT - CONICET), Boulevard Brown 2825, 9120 Puerto Madryn, Chubut, Argentina. ²Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI - CONICET), Av. Belgrano y Pje. Caseros, 4000 San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. ³Programa de Investigación en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján - CONICET, Int. Ruta 5 y 7, 6700 Luján, Buenos Aires, Argentina. e-mail: hdionisi@cenpat.edu.ar

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds composed of two or more fused aromatic rings, many of them considered toxic, mutagenic and/or carcinogenic. Due to their low water solubility, PAHs tend to adsorb to sediment particles, decreasing their bioavailability and affecting rates of biodegradation by indigenous bacteria. In the Patagonian coast, the diversity of these PAH-degrading bacterial populations, as well as the environmental factors affecting their biodegradation rate, remains largely unknown. The aim of this work was to explore the diversity of PAH-degrading microorganisms in coastal sediments of Patagonia. We used a functional culture-independent approach, and specific catabolic genes as the target.

Intertidal sediment samples were collected at different sites along the Patagonian coastline. Gene fragments encoding the catalytic α subunit of aromatic ring-hydroxylating dioxygenases (ARHDs), the enzyme responsible for the first step of the aerobic biodegradation of PAHs, were amplified from DNA isolated from intertidal sediment samples, and cloned. In seven catabolic gene libraries, 362 out of 479 analyzed clones were identified as α -subunit ARHD gene fragments. These clones were screened by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, and randomly chosen for sequencing. Libraries contained one to five ARHD types, the more diverse library corresponding to the sample with a greater number of PAHs. Overall, seven different dioxygenase gene types were detected, only two of them closely related to previously described ARHD genes: archetypical *nahAc*-like genes (*Pseudomonas* type) and *phnAc*-like genes as identified in *Alcaligenes faecalis* AFK2. The other five gene types formed deeply rooted branches (less than 70% identity at the amino acid level) with previously described ARHD sequences. Importantly, they contain the consensus pattern of bacterial ring-hydroxylating dioxygenase α -subunits,

suggesting that these gene fragments are novel types of ARHDs.

These results suggest that a number of yet unidentified PAH-degrading bacteria may be present in coastal sediments from Patagonia. Further experiments are needed to identify the key players for PAH biodegradation in cold-temperate polluted marine ecosystems.

C3: PRESENCIA Y DIVERSIDAD DEL GEN *arsB* EN DISTINTOS SISTEMAS DE LAGUNAS DE LOS ANDES

Motok J., Lara J., Ferrero M., Farías M.E.
PROIMI – Tucumán
jmotok@proimi.org.ar

Las lagunas y salares de los Andes son ambientes de condiciones extremas, debido a las altas radiaciones que soportan, las elevadas concentraciones de metales tóxicos como arsénico, las temperaturas extremas, etc. Las lagunas estudiadas en el presente trabajo contienen diferentes concentraciones de arsénico siendo muy altas en algunas (0.046 a 28 mg/l).

El sistema de resistencia a arsénico más disperso entre las bacterias es el sistema de bombeo de arsenito codificado por el operón *ars*, en el cual el gen *arsB* codifica una bomba de eflujo, y pueden diferenciarse diversas familias de este gen.

En este estudio se buscó la presencia de este gen en dos lagunas de los Andes chilenos: Chaxas y Turquesa (3700 - 4300 m.s.n.m.) y en cinco lagunas de los Andes argentinos: Azul, Verde, Aparejo, Negra y Vilama (4300 - 4700 m.s.n.m.). Muestras de sedimentos de las tres lagunas con mayor concentración de arsénico (9.62 mg/l Chaxas; 28 mg/l Turquesa; 11.8 mg/l Vilama) fueron incubadas en 16 diferentes condiciones de cultivo, variando temperatura, condiciones de oxigenación, concentración y especiación de arsénico. A distintos tiempos se tomaron muestras de ADN de las comunidades presentes en estos cultivos. Estas muestras de ADN de comunidades junto con más de 100 aislamientos provenientes de las siete lagunas fueron analizadas en este estudio.

Para el análisis por PCR se utilizaron cebadores previamente diseñados para bacterias Gram (-) y otro para Gram (+) en base a secuencias del gen *arsB* en elementos genéticos móviles. Estos mismos cebadores se utilizaron para obtener dos fragmentos del gen *arsB* de aproximadamente 760 y 900 pb, pertenecientes a familias diferentes, que fueron utilizados como sonda en ensayos de Dot Blot.

Se demostró la presencia de este gen en aproximadamente el 30% de los aislamientos, los cuales pertenecían a seis de las siete lagunas ensayadas, presentando igual frecuencia de cada familia.

Aproximadamente el 31% de las muestras de ADN de comunidades provenientes de diversas condiciones de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 cultivo mostraron la presencia del gen *arsB* de bacterias Gram (-). Sin embargo, el gen *arsB* de Gram (+) fue encontrado en una única condición de cultivo en el ADN de las comunidades enriquecidas a partir de muestras de las tres lagunas.

Estos resultados indican la ubicuidad del gen *arsB* en los sistemas de lagunas de la puna andina y la diversidad de estas familias en un ambiente proclive a la dispersión de estos genes de resistencia.

C4: CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIA DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS, *Rhodococcus* sp. 602

Roxana A. Silva (1), Nelda Olivera (2), Vincent Grossi (3), Héctor M. Alvarez (1)
(1) CRIDECIT, Universidad Nacional de la Patagonia, Comodoro Rivadavia, Chubut, (2) CENPAT-CONICET, Puerto Madryn, Chubut, (3) CNRS, Université Lyon 1, Villeurbanne Cedex, Francia. e-mail: rsilva@unpata.edu.ar

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar fisiológica y metabólicamente un aislamiento bacteriano obtenido previamente de suelo de Patagonia.

La cepa 602, un bacilo Gram positivo, fue aislada de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos mediante el cultivo de suelo en presencia de vapores de hexadecano. El análisis de la secuencia del 16S rDNA de esta cepa y comparación con bases de datos determinó que la misma posee un 99% de similitud con integrantes del género *Rhodococcus*, siendo *Rhodococcus jostii* el microorganismo más cercano filogenéticamente de acuerdo al análisis realizado mediante métodos de distancia (Neighbour-joining).

Este microorganismo, mesófilo y halotolerante (tolera hasta 5% p/v de NaCl), fue capaz de degradar un amplio rango de compuestos -incluso en condiciones de déficit de nutrientes-, por ejemplo: azúcares, sales orgánicas, alcoholes, detergentes, hidrocarburos lineales (simples, ramificados o sustituidos), mono- o poli-aromáticos (antraceno, fenantreno, fluoreno, naftaleno), ceras (naftil-laurato o naftil-palmitato), y mezclas de hidrocarburos. El compuesto mineralizado en mayor proporción fue el benzoato de sodio (1,03 mmoles CO₂/día), en tanto que los menores índices se observaron con los hidrocarburos poliaromáticos (0,04 - 0,11 mmoles/día). En condiciones de déficit de nitrógeno, esta cepa fue además capaz de transformar estos compuestos en lípidos neutros de reserva, generalmente triglicéridos (TAG): la acumulación de TAG superó el 60% de peso celular seco cuando se utilizaron gluconato o benzoato de sodio como únicas fuentes de carbono. Cuando se cultivó esta cepa en presencia de naftaleno o naftil-laurato las concentraciones de TAG alcanzaron 48,8% y 7,4% de los lípidos totales, respectivamente. En todos los casos las células acumularon una mezcla de TAG

conteniendo ácidos grasos (AG) normales con longitudes de cadena de C₁₄ a C₁₈, excepto durante el cultivo con naffil-laurato donde los AG presentaron menor longitud (C₈, C₁₀, C₁₂). Utilizando primers específicos se amplificó por PCR uno de los genes claves de la síntesis de TAG en bacterias oleaginosas, obteniéndose un producto del tamaño esperado, el cual está siendo secuenciado.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
La versatilidad metabólica de *Rhodococcus* sp. 602 para degradar diferentes compuestos contaminantes y transformarlos en triglicéridos, convierte a este microorganismo en un potencial candidato para procesos de biorremediación o biotecnológicos de producción de biocompuestos de interés comercial, como los biocombustibles.

PROPUESTA PARA SAMIGE

C5: REDMICRO: UN ESPACIO VIRTUAL DE RECURSOS PARA DOCENCIA E INVESTIGACIÓN

Studdert Claudia A., De Castro Rosana E., Herrera Seitz M Karina, Paggi Roberto A, Ruiz Diego M y Sastre Diego E
Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata
CC1245 – 7600 – Mar del Plata studdert@mdp.edu.ar

En este trabajo se discute la creación de RedMicro, un espacio destinado a la recopilación de información sobre recursos para Docencia e Investigación en el área de la Microbiología. El objetivo de este espacio virtual es brindar la posibilidad de compartir herramientas de trabajo e información entre todos los docentes/investigadores del país que deseen participar.

Situado como un *link* dentro de la página *web* de la UNMdP, este espacio contendrá un cepario virtual e información sobre las cepas disponibles en distintos

laboratorios y a las que se podría tener acceso con fines de docencia. También se incluirá en esta página material para cursos de Microbiología o relacionados, con *links* a guías detalladas de trabajos prácticos o guías de problemas y demás material que los usuarios pudieran considerar útil a fin de mejorar la calidad de la enseñanza en Microbiología. En una primera etapa, este espacio contendrá la información correspondiente al curso "Bioquímica y Biología Molecular de Microorganismos" que se dicta como materia optativa para la Lic. En Cs. Biológicas de la UNMdP. Se agregará, además, información resumida sobre los Proyectos de Investigación que desarrollan los usuarios registrados, así como sus publicaciones más relevantes.

La finalidad de este espacio es promover la interacción entre los docentes/investigadores del área, para favorecer las tareas de docencia en todo el país. Esta interacción fortalecerá, por añadidura, las actividades de investigación.

SECCIÓN 2: BIORREMEDIACIÓN Y BIOCONTROL

C6: CONTRIBUCIÓN DE LA INTERACCIÓN PLANTA-MICROORGANISMOS A LA EFECTIVIDAD DE LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON FENANTRENO.

Hariyo D. D., Nardillo A. y Morelli I.S.

CINDEFI (CONICET-UNLP). Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Calle 50 y 115. La Plata. Argentina. E-mail: dhariyo@yahoo.com.ar

La contaminación del suelo con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) es un problema severo, debido a su persistencia y toxicidad. Diversos estudios han demostrado la efectividad de la fitorremediación para tratar suelos contaminados con PAH, sin embargo no se ha establecido claramente la contribución de las interacciones planta-microorganismos (proliferación celular, inducción de enzimas, cometabolismo, etc.) frente a los procesos de captación, traslocación, acumulación y/o transformación propios de las plantas. Con el objetivo de estudiar el rol de la estimulación de la actividad microbiana producida por la rizosfera de las plantas sobre la eliminación de fenantreno se comparó el efecto del agregado de un extracto de raíces de *Medicago sativa* con un sistema sembrado con la misma planta.

Se prepararon microcosmos de tierra contaminada con 2000 mg/Kg de fenantreno: F2000 (sin estimular), F2000+E (estimulado con extracto de raíz) y F2000+R (sembrado). Los microcosmos fueron incubados durante 45 días a 25°C, humedad 20%, y fotoperiodo 14:10. Periódicamente se determinó la concentración de fenantreno (GC-FID), el número de bacterias heterótrofas cultivables en R2A y degradadoras de PAH (NMP) y la actividad microbiana (actividad deshidrogenasa).

Luego de 14 días de tratamiento los microcosmos F2000+R y F2000+E mostraron valores de fenantreno similares entre ellos y significativamente menores a los del sistema F2000. A los 25 días la concentración de fenantreno en F2000+E mostró valores mayores a los de F2000+R.

El agregado del extracto produjo un aumento en el número de bacterias cultivables en R2A con respecto a F2000 y F2000+R. En cuanto al recuento de bacterias degradadoras de PAH, los microcosmos F2000+E y F2000+R mostraron valores superiores a los obtenidos en el microcosmo F2000. La actividad microbiana del microcosmo sembrado mostró valores significativamente mayores a los microcosmos F2000 y F2000+E durante todo el experimento.

El agregado de extracto de raíz produjo una respuesta estimuladora inicial comparable al microcosmo sembrado, demostrado que el efecto del aporte de fuentes de carbono fácilmente asimilable por las raíces de las plantas jugaría un rol predominante en los procesos de fitorremediación de suelos contaminados con PAH. Al finalizar el tratamiento se observaron diferencias entre el sistema sembrado y el agregado de extracto, esto podría explicarse por un agotamiento de las fuentes de carbono incorporadas con el extracto.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007

Por otra parte la rizosfera no es una simple bomba de fuentes de carbono, en ella existen condiciones heterogéneas y mayor biodiversidad, lo que favorecería la degradación de los PAH poco disponibles remanentes al final del tratamiento.

C7: ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR COMUNIDADES BACTERIANAS DE SUELO EMPLEANDO RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO COMO MODELO EXPERIMENTAL.

Ana M. López*, A. Bosch, O. M. Yantorno, M. T. Del Panno.

CINDEFI (CONICET-UNLP) Calle 50 y 115, (1900) La Plata, Argentina.

*anitamisiones@hotmail.com

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes ambientales de relevancia por su toxicidad y propiedades mutagénicas y carcinogénicas. El principal proceso de degradación de HPA en ambientes contaminados se lleva a cabo mediante microorganismos, lo cual implica una dinámica y selección de poblaciones con capacidades degradadoras específicas. La biodegradación de estos compuestos en suelo se encuentra marcadamente afectada por su baja biodisponibilidad, debido a la reducida solubilidad en agua y a la tendencia de los mismos a adsorberse fuertemente a la materia orgánica.

Con el fin de establecer un modelo de estudio para el desarrollo de comunidades microbianas degradadoras de HPA en ambientes crónicamente contaminados, se estudiaron modelos sencillos representando al suelo mediante diferentes soportes con distintas capacidades de adsorción de HPA. Amberlita 200 (Sigma), una resina de intercambio catiónico con grupos carboxilo fue utilizada como soporte modelo; fenantreno como única fuente de carbono asimilable y medio mineral líquido (MML). La capacidad de adsorción del soporte fue de 2,5 mg de fenantreno por gramo de resina. Como inóculo se utilizó un consorcio degradador de fenantreno obtenido por enriquecimiento a partir de un suelo crónicamente contaminado de una zona petroquímica. Se estudió la cinética de crecimiento sobre un 1 g de Amberlita adsorbida con fenantreno, en sistema batch en frascos agitados con 10 ml de MML. El crecimiento microbiano fue seguido a través de recuentos bacterianos, microscopía y espectroscopía infrarroja FT-IR, analizando cada 48h la población de células planctónicas y sésiles (previamente removidas del soporte).

Los recuentos mostraron que la población bacteriana fue capaz de adherirse y crecer sobre fenantreno, observándose un incremento significativo en la población adherida heterótrofa (R2-agar) y degradadora de fenantreno (MMS-Fen) hasta el

séptimo día de incubación, a partir del cual la población disminuyó hasta el día 14.

Los estudios espectroscópicos de las correspondientes poblaciones mostraron que la primera etapa de la degradación de fenantreno estuvo dominada por células bacterianas que acumularon polihidroxibutirato, no detectándose bandas IR características de fenantreno (816 y 731 cm^{-1}) al cabo de 7 días de incubación. Una segunda etapa del proceso mostró un predominio de células eucariotas adheridas al soporte, probablemente desarrollando a expensas de los productos de degradación de la población bacteriana. La evolución de la biomasa total acumulada medida por FTIR (Amida II) fue coincidente con los datos de recuento y la dinámica poblacional concordante con la observación microscópica.

C8: COLONIZATION OF SEEDS AND ROOTS OF TWO SOYBEAN VARIETIES BY *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339 IS AFFECTED BY THE CORRESPONDING EXUDATES.

Pablo M. Yaryura^{1,2*}, Mariana León^{1,2}, Olga S. Correa^{1,2}, Norma L. Kerber¹, Norma L. Pucheu¹ and Augusto F. García¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas (IBYF-CONICET-FAUBA) and ²Cátedra de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía (UBA),
Av. San Martín 4453, C1417DSE, Buenos Aires,
Argentina. FAX: 0054-11-4514-8741

yaryura@agro.uba.ar

The performance of a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) depends on effective plant root colonization. Moreover, chemotaxis and biofilm formation have an important role in the stable bacterial attachment to root surface. Our aim was to determine whether soybean variety affects root colonization by a PGPR that we isolated in our laboratory. We also studied the effect of seed and root exudates on bacterial chemotaxis response and biofilm formation. In addition, we performed chemical analysis of root and seed exudates, in order to establish some differences between them. Root colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339 was determined in two soybean varieties, FN 4.10 and FN 4.85, which were grown in a plant growth chamber, under hydroponic conditions. Root and seed exudates were collected from axenic plants growing under controlled conditions. Bacterial root colonization was affected by the soybean variety; FN 4.10 showing a higher bacterial count per g of rhizoplane dried weight than FN 4.85. Seed exudates stimulated bacterial chemotaxis more than root exudates, and also stimulated biofilm formation, both phenomena displaying a significant plant variety effect. Seed and root exudates showed differences in amino acid and carbohydrates composition also in a plant variety depended fashion. The composition of root exudates was dependent on plant age.

According to our results, soybean variety was the main determinant of *B. amyloliquefaciens* BNM339 colonization, chemotaxis and biofilm formation and these responses may be related to the composition of plant exudates.

SECCIÓN 3: INTERACCIÓN MICROORGANISMO-HOSPEDADOR

C9: PARTICIPACION DEL LIPOPOLISACARIDO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EN LA INTERACCION PLANTA-PATOGENO

Silvana Petrocelli; Jorgelina Ottado; Elena G. Orellano
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario,
IBR (CONICET), Fac. de Cs. Bioquímicas y
Farmacéuticas, UNR. E-mail: petrocelli@ibr.gov.ar;
orellano@ibr.gov.ar

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) es el fitopatógeno causante de la cancrrosis de los cítricos, una de las enfermedades más severas que afecta al género *Citrus*. Esta interacción es de tipo hospedadora compatible. En la interacción hospedadora incompatible y en la mayoría de las interacciones con plantas no hospedadoras las plantas no se enferman observándose una respuesta rápida y localizada de muerte celular denominada respuesta hipersensible (HR). Las plantas tienen la capacidad de reconocer el ataque por patógenos y desarrollar una respuesta de inmunidad innata. Un gran número de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) ha sido implicado en disparar esta respuesta en plantas no hospedadoras. El lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas y flagelinas son algunos de los ejemplos de PAMPs encontrados en la interacción planta-patógeno. El LPS es un componente importante de la membrana externa de bacterias Gram negativas. En el genoma de Xac se encuentran los genes *wzt* y *rff303*, que codifican para una proteína de unión a ATP del transportador de tipo ABC del antígeno O y una glicosiltransferasa del core del LPS, respectivamente. El objetivo de este trabajo es estudiar el rol del LPS de Xac en la cancrrosis de los cítricos. Se construyeron mutantes de Xac en los genes *wzt* y *rff303* mediante conjugación con el vector suicida movilizable pKmob. Se observaron diferencias fenotípicas y de crecimiento entre Xac salvaje y la mutante Xac-*wzt* en medio sólido SB. Para la mutante Xac-*rff303* no se observaron estas diferencias. Por otra parte, el crecimiento en medio líquido no mostró diferencias entre las 3 cepas. Posteriormente se realizaron infecciones en hojas de plantas hospedadoras de naranja (*Citrus sinensis*) mediante infiltración de las bacterias salvaje y mutantes en la cara abaxial de la misma, a una concentración de 10⁷ UFC/mL. Las 3 cepas desarrollaron enfermedad. Sin embargo, la aparición de la lesión para Xac-*rff303* fue más temprana y de mayor magnitud que para Xac salvaje, mientras que la mutante Xac-*wzt* produjo cancrrosis en forma más tardía y en menor magnitud. Se realizó una curva de crecimiento bacteriano en naranja y se observó un mayor crecimiento inicial para Xac-*rff303* que luego resultó similar al crecimiento de Xac salvaje y un crecimiento menor para Xac-*wzt*. El tratamiento de hojas de naranja con LPS salvaje, previo a la infiltración bacteriana, produjo un retraso en el desarrollo de la enfermedad para las 3 cepas estudiadas. Estos resultados permiten suponer que el LPS de Xac actuaría como una PAMP en la inmunidad

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
innata, pero también participaría en la virulencia en interacciones compatibles.

C10: CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN GÉNICA DE LOS SISTEMAS RND EN *BRUCELLA SUIIS*.

Martín, Fernando A^{1,2}; Posadas, Diana M.¹;
O'Callaghan, David²; Zorreguieta, Angeles¹
Fundación Instituto Leloir, FCEyN, UBA, IIBBA
CONICET¹. INSERM U-431 NIMES FRANCE².
fmartin@leloir.org.ar

En las últimas décadas el número de bacterias resistentes a los antibióticos conocidos se incrementó considerablemente. Los mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencias son diversos. Estos incluyen la alteración de la permeabilidad de membrana y el transporte activo del antibiótico hacia el medio extracelular (eflujo). Las bombas que realizan eflujo de compuestos tóxicos pueden transportar compuestos no relacionados estructuralmente. El genoma de *Brucella suis* muestra que potencialmente alberga candidatos de sistemas de eflujo de tres componentes RND/MFP/OMF que forman canales transitorios entre las dos membranas de bacterias Gram negativas que podrían tener un rol en la supervivencia del patógeno tanto para la eliminación de compuestos endógenos de la bacteria como exógenos como antibióticos u otros compuestos tóxicos del hospedador. Por análisis de mutantes por delección y estudios de expresión génica presentamos evidencias que indican que *B. suis* posee dos translocasas de la membrana interna funcionales del tipo RND (Resistance Nodulation Division)/MFP (membrana fusion protein) (BepDE y BepFG), involucradas en el eflujo de diversos compuestos hidrofóbicos y tóxicos. La delección de *bepDE* aumentó significativamente la sensibilidad a deoxicolato (DOC), novobicina, SDS, ampicilina cristal violeta y tiamfenicol. Aunque la delección del translocon *bepFG* no alteró el perfil de resistencia ensayado, la doble mutante *bepDE bepFG* fue aún más sensible a éstas y otras drogas. Además, la mutante *bepFG* estuvo afectada en la replicación intracelular de *B. suis*. Los genes de ambas translocasas, *bepDE* y *bepFG*, no se expresaron en medio de cultivo pero su expresión se indujo "in vivo" en células HeLa. In vitro, la expresión de *bepDE* se activó en presencia de DOC. Además, mostramos que la inducción de la expresión de *bepDE* por DOC es dependiente de un regulador de la familia TetR (BepR) que se encuentra codificado río o arriba del locus. Nuestros resultados demuestran que *B. suis* posee al menos 2 sistemas tripartitos de la familia RND funcionales que participarían en la supervivencia dentro del hospedador.

C11: FORMACIÓN DE BIOFILM EN *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *CITRI* : ROL EN LA SUPERVIVENCIA EPIFÍTICA Y DESARROLLO DEL CANCRO

Luciano A. Rigano¹, Florencia Siciliano², Ramón Enrique², Lorena Sendín³, Paula Filippone³, Pablo S. Torres¹, Julia Qüesta², Florencia Malamud¹, Atilio P. Castagnaro³, María Rosa Marano², Adrián A. Vojnov¹
avojnov@fundacioncassara.org.ar

¹Fundación Pablo Cassará, Centro de Ciencia y Tecnología Dr Cesar Milstein. Saladillo 2468, C1440FFX, Buenos Aires. ²Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán. ³Instituto de Biología Molecular de Rosario, Rosario.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (*Xac*), es el agente responsable de la enfermedad cuarentenaria conocida como cancrrosis de los cítricos, que afecta a plantaciones de este cultivo en todo el mundo induciendo la formación de grandes pústulas denominadas cancros. En Argentina existen dos principales regiones productoras de cítricos: el Noroeste Argentino (NOA) y el Nordeste Argentino (NEA), su producción esta compuesta principalmente por limones, naranjas y mandarinas. Desde 1990 la cancrrosis, se considera endémica en Argentina afectando inicialmente al NEA y actualmente también se ha expandido al NOA, provocando importantes pérdidas a la producción. El objetivo de este trabajo fue estudiar si existe alguna relación entre la habilidad de este patógeno de formar un biofilm funcional y su capacidad de crecer epifíticamente, o sea de sobrevivir en un ambiente hostil como es la superficie de la hoja del limonero. Para ello desarrollamos una mutante de *Xac* defectiva en la producción de exopolisacárido (xantano). Específicamente se interrumpió la secuencia codificante del gen *gumB* mediante la inserción de un "cassete" (*gumB::Spc^r*). Se estudió a la mutante *gumB* y a la cepa silvestre mediante microscopía confocal en cámaras de borosilicato. Para monitorear las bacterias durante el proceso, se transfirió a las mismas el plásmido pRU1319 que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Se pudo observar que la cepa *gumB* esta afectada en la capacidad de formación de biofilm. En ese sentido, se observó que esta no forma estructuras tridimensionales del tipo biofilm característicos de la cepa silvestre, sino que se adhiere a la matriz de forma desordenada no observándose interacción importante entre bacterias. Interesantemente, esta cepa mutada, que fue incapaz de formar biofilm, muestra una sobrevida mucho menor que *Xac* sobre las hojas de limonero y reducida virulencia en hojas de cítrico comparado con la cepa silvestre, evidenciando un menor crecimiento y una casi nula aparición de síntomas. Las estructuras tridimensionales del tipo biofilm también fueron

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 observadas dentro del cancro cuando este se analizó en varios planos mediante el microscopio confocal. Estos resultados sugieren que la formación de biofilm es importante en la sobrevida de *Xac* en la superficie de la hoja y en el desarrollo del cancro.

C12: NrfA...¿JUGAS EN LA INTERACCIÓN ENTRE *Sinorhizobium meliloti* Y ALFALFA?

Patricio Sobrero y Claudio Valverde.

Programa 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

Si pensamos en Riboregulación, tenemos que imaginarnos a pequeñas moléculas de ARN no codificantes que, junto a proteínas que median la interacción entre moléculas de ácido ribonucleico, orquestan en perfecta armonía la regulación de la expresión de ciertos genes a nivel post-transcripcional. En este escenario aparece NrfA, una anotación en el genoma de *Sinorhizobium meliloti*, el microorganismo simbiótico de los nódulos radiculares de alfalfa, que predice una proteína de 80 aminoácidos con un 47% de identidades con Hfq, el "alma mater" de la riboregulación en *E. coli*. Mediante RT-PCR hemos detectado al ARNm *nrfA* y a través de una fusión transcripcional cromosomal *PnrfA-lacZ* hemos estudiado el patrón de expresión en cultivo puro y en etapas tempranas y tardías de la interacción con su planta hospedadora.

Y entonces nos preguntamos: ¿Está NrfA involucrada en ese complicado proceso de desarrollo que ocurre en la interacción entre los rizobios y las raíces de alfalfa? Para aproximarnos a una respuesta a este enigmático interrogante, construimos una cepa isogénica de *Sinorhizobium meliloti* 2011 que posee una delección y una inserción de un cassette Ω Km(Nm) en el gen *nrfA*. A través de esta cepa mutante *nrfA* esperamos encontrar fenotipos que nos muestren, directa o indirectamente, la función biológica de esta proteína. En particular nos hemos concentrado en fenotipos relacionados con el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis con plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), como la movilidad en medios semisólidos, la capacidad de adhesión a placas de poliestireno (en un intento de cuantificar la capacidad formadora de *biofilm*), la producción de exopolisacáridos, la cinética de desarrollo de nódulos y su distribución en raíces principales, y la eficiencia de la simbiosis (a través de determinaciones de biomasa, contenido de nitrógeno y actividad fijadora de N₂).

SECCIÓN 6: FISIOLOGÍA Y METABOLISMO

C13: LA HERENCIA DE HfrH: EL PAR REGULADOR CreBC ALTERA LA RESPUESTA REDOX EN MUTANTES *arc* DE *ESCHERICHIA COLI*

Pablo I. Nike^{1,2}, Alejandra de Almeida², M. Julia Pettinari², Beatriz S. Méndez²

¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM-CONICET, 1650, San Martín; ²Dpto. Química Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires, 1428, Ciudad Universitaria. E-mail: pablo@qb.fcen.uba.ar

E. coli puede responder rápidamente a cambios físico-químicos y nutricionales en el ambiente regulando la expresión génica a través de una compleja red regulatoria transcripcional. En ella, el sistema de dos componentes ArcAB (*aerobic respiration control*) actúa como mediador de la respuesta a la disponibilidad de O₂ modulando la expresión de más de 135 genes. CreBC (*catabolic regulation*) es otro par regulador en el que CreC actúa como sensor de la disponibilidad de fuentes de C. Si bien se han identificado algunos genes del regulón *cre* (e.g., *ackA/pta*, *malE*, *creD*), las funciones regulatorias de este sistema no han sido estudiadas en detalle.

En estudios previos hemos utilizado mutantes *arcA* para la síntesis de compuestos reducidos. Una de dichas mutantes, CT1061 (*arcA::IS10*), presenta características fenotípicas distintivas respecto de mutantes Δ *arcA* (e.g., mayor capacidad respiratoria y alta relación NADH/NAD⁺). Dado que dicha cepa fue construida por transducción con fago P1, se analizó la presencia de mutaciones en regiones cercanas a *arcA*. CT1061 porta una sustitución en el gen adyacente *creC*, generando una sustitución (R77P) que confiere fenotipo constitutivo. Esta sustitución también está presente en ECL618, cepa parental de la transducción con P1; la cual a su vez deriva muy probablemente de HfrH. Por ello, se decidió estudiar la contribución de la mutación *creC*^C al fenotipo de CT1061.

El crecimiento de CT1061 en placas conteniendo azul de toluidina (AT, colorante redox tóxico para mutantes *arcA*) es diferente al de mutantes de delección, pero la complementación de CT1062 (Δ *arcA*) con el alelo *arcA::IS10* no alteró su fenotipo en placas de AT. Además, el contenido de citocromos *o* y *d* (sujetos a regulación por ArcA) fue similar en CT1061 y CT1062, y diferente a su vez al de K1060 (*arcA*⁺). La capacidad respiratoria de CT1061 en medio mínimo con acetato como única fuente de C fue mayor que CT1062 y K1060 (2,1 y 2,6 veces, respectivamente). Dado que CreC regula la actividad de AckA/Pta (acetato quinasa/fosfotransacetilasa), se midió la actividad AckA en cultivos exponenciales, observándose mayor actividad en CT1061 respecto a K1060 (10,71 ± 2,14 y 2,49 ± 0,67 U mg proteína⁻¹, respectivamente). ECL618 y HfrH165/70 también mostraron actividades superiores, mientras CT1062 presentó niveles de AckA comparables a K1060. En

conjunto, nuestros resultados muestran que el fenotipo particular de CT1061 está determinado por una superposición de la mutación en *arcA* y *creC*^C, que se traduce en un flujo aumentado de equivalentes de reducción y una mayor capacidad respiratoria.

C14: IDENTIFICACIÓN DE HETEROCOMPLEJOS PROTEICOS EN LA MEMBRANA EXTERNA DEL PATÓGENO GRAM-NEGATIVO *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

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) es un importante patógeno oportunista, reconocido por su capacidad de desarrollar rápidamente resistencia a nuevos antimicrobianos, de especial relevancia en ambientes nosocomiales.

Nosotros demostramos previamente que la resistencia de cepas clínicas multiresistentes de *A. baumannii* a carbapenemes, β -lactámico de última generación, está asociada con la desaparición de una proteína de membrana externa (Omp) denominada CarO [Mussi *et al.* (2005) Antimicrob. Agents Chemother 49, 1432-1440]. Encontramos además que CarO permite la permeación a través de la membrana externa (ME) de aminoácidos básicos resultando esencial para el ingreso de L-ornitina. La mayoría de las Omp involucradas en el ingreso de nutrientes de bajo peso molecular se encuentran en la ME en forma de homooligómeros, los cuales son generalmente estables al tratamiento con SDS a temperaturas moderadas y por lo tanto pueden ser identificados mediante SDS-PAGE. En este trabajo estudiamos la estructura de CarO en la ME de cepas clínicas de *A. baumannii* sensibles y resistentes a imipenem mediante geles bidimensionales SDS-PAGE. La primera dimensión permitió separar los complejos proteicos estables al SDS en función de su tamaño molecular, y la segunda dimensión disociarlos e identificar las proteínas que los conformaban. Se utilizó inmunodetección para evidenciar la presencia de CarO en los complejos detectados, así como MALDI-TOF para la identificación precisa de otras proteínas en los mismos. Nuestros estudios indicaron que CarO está asociada en la ME a Omp40, proteína perteneciente a la superfamilia OmpA y de función aun poco conocida. En cepas de *A. baumannii* resistentes a imipenem que carecen de CarO, Omp40 se encuentra en la ME únicamente en forma de monómeros. Concluimos entonces que CarO forma heterocomplejos con Omp40 en la ME de *A. baumannii*. La función de los mismos está siendo analizada en el laboratorio.

SECCIÓN 4: MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

C15: ESTRÉS OSMÓTICO EN *Lactobacillus casei*: A LA BÚSQUEDA DE REGULADORES DEL SISTEMA PROTEOLÍTICO

Mariana Claudia Allievi, Carmen Sanchez Rivas y Sandra M. Ruzal

Departamento de Química Biológica. Facultad Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria Pabellón II. 4º piso. (1428) Buenos Aires. Argentina. E-mail:

mallievi@qb.fcen.uba.ar

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) juegan un rol importante en el desarrollo y sabor de alimentos fermentados. El agregado de sal es utilizado en la mayoría de los procesos industriales en los que intervienen estas bacterias. Su crecimiento involucra un complejo sistema proteolítico. Una de las funciones importantes de este sistema es la proteasa extracelular PrtP proveedora de péptidos indispensables para su crecimiento. En *Lactobacillus casei* BL23 se demostró el rol de los péptidos en el crecimiento y en particular en la adaptación a altas concentraciones salinas (> 1M NaCl); también se mostró que la actividad transcripcional del gen *prtP* se reprime por péptidos, mientras que en medios hipersalinos esta represión se pierde. En este trabajo se utilizaron sondas conteniendo la secuencia promotora de *prtP* (PromP) a fin de poner en evidencia la regulación transcripcional de *prtP* mediante ensayos de EMSA. Para ello se utilizaron extractos provenientes de condiciones de crecimiento en medios CDM, con o sin peptonas, en alta o baja osmolaridad. Se evidenciaron interacciones específicas respondiendo al agregado de péptidos y a la presencia de sal. Estas interacciones de posibles reguladores transcripcionales sobre el promotor de *prtP* se confirmaron mediante un ensayo de pesca de reguladores (*regulator fishing*). Se observó un patrón de bandas diferenciales entre los extractos proteicos de las condiciones de crecimiento control y de estrés osmótico.

Como CodY se encuentra en numerosas bacterias Gram Positivas de bajo contenido de G+C regulando funciones de fase estacionaria y/o de estrés, se intentó hallar dicha proteína en *L. casei* BL23. Utilizando el ensayo de pesca de reguladores, se continuó con un ensayo de Western Blot revelado con anticuerpo anti-CodY de *B. subtilis* para dar identidad a las bandas que se unen al promotor de *prtP*. Para ninguna de las condiciones de crecimiento se obtuvo reconocimiento por el anticuerpo anti-CodY.

Otro candidato es CcpA, regulador transcripcional central del metabolismo de azúcares y nitrógeno. Considerando que la mutante *ccpA* es osmosensible,

se está analizando el nivel transcripcional de *prtP* de esta mutante por RT-PCR semicuantitativa a fin de evidenciar diferencias en la expresión de este gen.

En función de estos resultados, y a diferencia de muchas bacterias Gram Positivas, en *Lactobacillus casei* BL23 no sería una proteína CodY la responsable de modular componentes del sistema proteolítico.

C16: INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES PARA QUIMIOTAXIS Y LA PROTEÍNA ACOPLADORA CHEW; IMPLICACIONES SOBRE LA SEÑALIZACIÓN

Cardozo Marcos J.*, Parkinson John S.** y Studdert Claudia A.*.

*Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata. CC1245 Mar del Plata. micturbo@yahoo.com.ar. ** Biology Department, University of Utah

En *E. coli*, la capacidad quimiotáctica reside en la habilidad de modular la frecuencia de cambios de dirección en respuesta a gradientes químicos. Esta respuesta requiere que receptores específicos detecten variaciones en la concentración de ligandos y transmitan esa información a la histidín-quinasa CheA, la que a su vez determina los niveles de CheY-fosfato, la proteína efectora que actúa sobre el motor flagelar.

Para que la información sensada por el receptor resulte en una respuesta por parte de CheA, la presencia de la proteína acopladora CheW es un requerimiento absoluto, pero la función precisa de esta última no ha sido dilucidada, ni se conoce en detalle la naturaleza de la interacción entre receptores, CheA y CheW ni su dinámica durante la señalización.

Estudios previos han demostrado que niveles elevados de la proteína CheW interfieren con la organización de los receptores en trímeros de dímeros, y dicha interferencia se correlaciona con una inhibición de la respuesta quimiotáctica.

En este trabajo se analiza en más profundidad el mencionado efecto de interferencia. Por un lado, se investiga si la interferencia con la formación de trímeros depende de la presencia de la quinasa CheA. Por el otro, se analiza la interferencia con la formación de trímeros y la inhibición de la respuesta quimiotáctica de mutantes de CheW cuya afinidad por los receptores está alterada.

Nuestros resultados indican que la interferencia con la formación de trímeros es independiente de CheA. El

comportamiento de los mutantes de CheW, por otro lado, muestra que los mutantes con mayor afinidad por los receptores interfieren con la formación de trímeros y con la quimiotaxis a niveles menores que los mutantes con menor afinidad, sugiriendo que el sitio de interacción entre CheW y los receptores se superpone con el sitio por el cual los receptores interactúan entre sí.

Por otra parte, la correlación entre ambos efectos inhibitorios en todos los casos sugiere que la formación de trímeros es esencial para la señalización.

C17: ROL DE LOS LÍPIDOS EN LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR σ^E DURANTE LA ESPORULACIÓN EN *B. subtilis*

Verónica Díez, Gustavo E. Schujman y Diego de Mendoza

IBR - CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR. Suipacha 531, 2000-Rosario, Argentina. E-mail: diez@ibr.gov.ar

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, no patógena cuyo hábitat natural es el suelo. En condiciones de privación de nutrientes inicia un proceso de diferenciación celular llamado esporulación caracterizado por una división celular asimétrica que da lugar a la formación de dos células. La célula del compartimiento menor, preespora, se diferenciará a espora, una estructura metabólicamente inactiva y resistente a condiciones ambientales extremas. La célula del compartimiento mayor, célula madre, nutrirá a la preespora durante su maduración, para luego lisarse. Entre ambos compartimientos se produce una expresión génica diferencial, la que se logra mediante la activación de distintos factores sigma (σ) en cada una de las células: σ^F y luego σ^G en la preespora, y σ^E y luego σ^K en la célula madre. σ^E se sintetiza como una pre-proteína y se activa por remoción proteolítica de un fragmento amino terminal, reacción catalizada por SpoIIIGA, una enzima localizada en el *septum* asimétrico. Es necesaria para este procesamiento la presencia de la proteína SpoIIIR, que se sintetiza en la preespora y luego atraviesa el *septum*.

En trabajos anteriores demostramos que la síntesis *de novo* de lípidos es necesaria para la activación de σ^E . Además, experimentos realizados utilizando una cepa *gpsA* de *B. subtilis* (incapaz de sintetizar fosfolípidos en ausencia de glicerol-3-fosfato), sugirieron que la síntesis *de novo* de fosfolípidos no es necesaria para la activación del factor transcripcional σ^E .

En el presente trabajo, se analizó la activación de σ^E en una mutante condicional en el gen *pIsC*. En esta cepa, se observó interrupción de biosíntesis de fosfolípidos y la simultánea acumulación de ácidos grasos. Estos experimentos confirmaron que la activación de σ^E requiere síntesis *de novo* de ácidos grasos pero no de fosfolípidos.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007

Con el objetivo de identificar que evento durante la activación de σ^E requiere síntesis lipídica *de novo*, se construyó una versión de SpoIIIR carente de su secuencia señal de secreción tipo Sec. Los resultados evidenciaron que la translocación de SpoIIIR a través de la membrana no sería necesaria para activar SpoIIIGA, si ambas proteínas son expresadas en el mismo compartimiento en fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, esta versión de SpoIIIR no permitiría la activación de σ^E , cuando es expresada durante la esporulación. Finalmente se realizaron ensayos de cocultivos entre cepas mutantes en *spoIIIR* y *spoIIIGA*. El análisis de las frecuencias de esporulación de los cocultivos sugiere que los lípidos son necesarios para la translocación de SpoIIIR o para su interacción con la proteasa en el espacio intermembrana.

C18: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS REGULATORIOS DE PhIA, LA FOSFOLIPASA B DE *Serratia marcescens*

Fedrico, Griselda V., Castelli, María E., García Véscovi, Eleonora.

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

S. marcescens es un patógeno oportunista, causante de infecciones nosocomiales, las cuales pueden ser exacerbadas por la múltiple resistencia antibiótica que presenta este microorganismo. Además, la producción de varias proteínas extracelulares tales como nucleasa, proteasa, lipasa y hemolisina podrían contribuir a la adaptación de *S. marcescens* a distintos medios, así como a su potencial patogénico. Se ha demostrado que *S. marcescens* también produce una fosfolipasa denominada PhIA, cuya región promotora presenta un sitio de unión al factor sigma FliA y que requiere del flagelo para su secreción, pero aún se desconoce el rol fisiológico de esta exoenzima.

En nuestro laboratorio, estamos abocados a la caracterización de factores involucrados en la virulencia de *S. marcescens*, así como también al estudio del mecanismo que utiliza esta bacteria oportunista para ingresar al hospedador.

Mediante secuenciación y análisis de 16S rDNA, hemos caracterizado la cepa RM66262, proveniente de un aislamiento clínico, como *Serratia marcescens* y por cromatografía en capa delgada (TLC) demostramos que PhIA presenta actividad fosfolipasa de tipo B.

Con el fin de identificar elementos regulatorios de la expresión de esta enzima, realizamos una mutagénesis al azar con el transposón Mini-Tn5 y rastreamos colonias deficientes en actividad fosfolipasa. A partir de este análisis aislamos tres clones independientes mutantes en el cluster *wec*, el cual codifica para proteínas involucradas en la biosíntesis de un glicolípido de membrana externa denominado Antígeno Común de Enterobacterias

(ECA). Posteriormente, mediante ensayos de motilidad y RT-PCR en tiempo real, demostramos que las mutaciones en los genes *wec* son responsables de regular negativamente la transcripción de genes flagelares y de este modo controlar el ensamble del flagelo y la expresión de PhIA. Además para analizar el rol en la patogénesis de PhIA, realizamos ensayos *in vitro* y demostramos que esta fosfolipasa está involucrada en la invasión a células epiteliales. Por otra parte, las mutantes en los genes *wec* muestran un marcado defecto en su capacidad de invasión, que atribuimos a la simultánea deficiencia de ECA, defecto en el ensamble del flagelo y ausencia de PhIA.

C19: INVOLVEMENT OF MutS IN *Pseudomonas aeruginosa* ADAPTIVE MUTAGENESIS: THE ACQUISITION OF QUORUM-SENSING-DEFICIENT (*lasR*) PHENOTYPE AS AN ILLUSTRATIVE MODEL.

Luján A.M., Moyano A.J., Argaraña C.E. and Smania A.M.

CIQUIBIC-CONICET, Fac. Cs. Químicas, UNC, Córdoba, Argentina. E-mail: alujan@mail.fcq.unc.edu.ar

The potential role of mutators in evolution has been an issue of major biological and medical concern. Most of the mutator bacteria isolated in nature have been shown to be defective in the Mismatch Repair System (MMR), whose deficiency generates not only a mutator but also a hyperrecombinogenic phenotype. Interestingly, *Pseudomonas aeruginosa* mutator clones are extremely frequent in Cystic Fibrosis (CF) chronic infections, suggesting that they play a crucial role in the adaptation required for long-term establishment in the heterogeneous and changing CF lung environment. Most of these mutator strains were found to be deficient in the *mutS* gene, one of the main components of the MMR. Also, defects in the *lasR* gene, a major regulator of the *P. aeruginosa* Quorum Sensing (QS) system, have been detected in chronic infections suggesting that inactivation of LasR would be advantageous for *P. aeruginosa* persistence. We recently found that inactivation of *mutS* in *P. aeruginosa* results in the spontaneous and reproducible emergence of defined morphological colony variants after cultivation in aerated rich medium to late stationary-phase, in contrast to the non-mutator parental strain, which does not display any kind of diversification under identical incubation conditions. One of the morphotypical variants, mS2, emerges at a high frequency and displays differences in virulence traits commonly regulated by QS. The present study shows that mS2 variants had defective LasR function due to simple but different point mutations along the *lasR* gene sequence, indicating that LasR inactivation is the main cause of mS2 phenotypic diversification. Moreover, no sequence alterations were found in the *gacA* and *rhIR* genes, two major QS regulators, suggesting that the selective pressures for GacA/RhIR and LasR were not

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
the same and differed from those in other *Pseudomonas* species, which, when incubated in nutrient-rich liquid stationary-phase cultures, show specific high instability in the *gacA-gacS* genes. Finally, it was determined that a non-functional LasR would confer a selective advantage in the late stationary-phase, since viability was notably higher for mS2. Our results offer evidences of the involvement of the MMR in the adaptive mutagenesis of *P. aeruginosa* and its relationship with stationary-phase transcriptional regulators. In this context, we are currently carrying out new investigations to determine the potential transcriptional regulation of *mutS* by the stationary phase sigma factor RpoS, which in *Pseudomonas* has been related to the QS cascade.

C20: GoIS INDUCE UN SISTEMA DE EFLUJO TIPO CBA ESPECÍFICO DE *Salmonella* QUE CONFIERE RESISTENCIA A ORO Y A COMPUESTOS ORGÁNICOS

Pontel, Lucas B., Perez Audero, M.E., Espariz, M., Checa S.K., y Soncini Fernando C.

IBR-CONICET, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina.

e-mail: pontel@ibr.gov.ar

Las bacterias pueden adaptarse y crecer en presencia de diferentes compuestos tóxicos, como por ejemplo metales pesados o drogas orgánicas. En nuestro laboratorio se identificó y caracterizó un regulador transcripcional de la familia MerR específico de *Salmonella* al que se denominó GoIS. Este regulador monitorea los niveles de Au en el entorno y desencadena la respuesta celular a este metal, controlando la expresión de la ATPasa tipo-P GoIT y de la proteína de unión a metales GoIB. Durante la caracterización del regulón *gol* observamos que las mutantes en el regulador *golS* presentaron un marcado defecto en la resistencia a Au. Llamativamente, la delección simultánea de los dos efectores *golT* y *golB* presentó un fenotipo intermedio, indicando la existencia de otros genes controlados por GoIS e involucrados en la resistencia al metal.

En este trabajo realizamos un análisis *in silico* del genoma de *Salmonella* para encontrar nuevos genes bajo el control de GoIS que estén involucrados en la resistencia a oro. Identificamos el locus *gesABC*, específico de *Salmonella*. Este locus codifica para un sistema de eflujo tipo CBA y se encuentra adyacente a *goITS*. La expresión de GesABC está controlada por GoIS. El sistema de eflujo participa en la resistencia a AuHCl₄ pero no a otros metales. Mediante ensayos de "footprinting" determinamos el sitio reconocido por GoIS en el promotor de *gesA* y, al realizar ensayos comparativos *in vivo* e *in vitro*, observamos que la expresión de este locus está retardada comparada con la de los otros miembros del regulón *gol*. Este retraso se debe a una menor afinidad del regulador por su operador en el promotor de *gesA* respecto a los

operadores presentes en *golTS* y *golB*. De esta manera, GesABC se expresa sólo cuando los niveles intracelulares de *GolS* superan un umbral determinado. Existe, por lo tanto, una expresión jerárquica de genes dentro del regulón *gol* que permite la supervivencia de la bacteria en ambientes con diferentes niveles tóxicos de Au. Las bombas de eflujo tipo CBA son de un amplio espectro en cuanto a los sustratos que

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 transportan. En *Salmonella*, observamos que cuando se crece a la bacteria en presencia de concentraciones subletales de Au, los niveles endógenos alcanzados de GesABC son suficientes para inducir co-resistencia a azul de metileno y cristal violeta. Esto indica que GesABC funciona como una bomba de eflujo versátil confiriendo resistencia a compuestos tan disímiles como Au y drogas orgánicas.

SECCIÓN 5: BIOTECNOLOGÍA Y FERMENTACIONES

C21: SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS RESISTENTES A BILIS PARA SU EMPLEO EN ALIMENTOS FUNCIONALES PROBIÓTICOS

Bustos, A. Y.¹, Raya, R.¹, Font de Valdez, G.^{1, 2}, Taranto, M. P.¹

¹ Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET. Chacabuco 145. ²Facultad de Bqca, Qca y Fcia, U. N. T. Ayacucho 473. 4000, S. M. de Tucumán, Argentina. Tel/Fax: +54381 4310465/4005600. E-mail: ptaranto@cerela.org.ar

Para ejercer su efecto benéfico en el huésped, las bacterias lácticas (BAL) deben permanecer viables durante el pasaje gastrointestinal donde la bilis constituye una importante barrera natural. De allí que la tolerancia a sales biliares es un criterio importante en la selección de cepas probióticas usadas como suplemento dietario. La bilis esta compuesta mayoritariamente por ácidos biliares (AB) conjugados, cuya posterior hidrólisis libera el ácido deconjugado y taurina o glicina. Este fenómeno es llevado a cabo por la presencia de la enzima hidrolasa de sales biliares, presente exclusivamente en algunas especies de la microbiota intestinal. Los AB disipan principalmente el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de la mayoría de las bacterias Gram positivas y negativas, con la consecuente pérdida de la integridad de la membrana y muerte celular. Así, la selección de microorganismos probióticos de probada resistencia a AB permitirá su utilización a dosis más bajas, garantizando la inocuidad del mismo y el equilibrio de la microbiota indígena.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las consecuencias bioenergéticas de AB (conjugados y deconjugados) sobre cepas lácticas como criterio de selección para su empleo en alimentos probióticos. Células no proliferantes de *L. reuteri* CRL 1098, *L. delbrueckii* CRL 494, *L. acidophilus* CRL 1072, y *L. casei* CRL 203 fueron enfrentadas a distintas concentraciones (entre 0.5 y 2.5 mM) de AB [cólico (CA) y deoxicólico (DCA)] conjugados (tauro y glicocólico) y reconjugados. Las variaciones del $\Delta\Psi$ se determinaron utilizando la sonda fluorescente H [DISC₃

(5)], sensible al potencial catiónico, en un espectrofluorómetro Cary Eclipse. En general, la mayoría de las cepas ensayadas mostraron mayor sensibilidad a los AB deconjugados, principalmente DCA, que a los AB conjugados. Sólo *L. reuteri* CRL 1098 mostró una elevada resistencia a todas las concentraciones de AB (conjugados y deconjugados) ensayadas, siendo sensible sólo a elevadas concentraciones de DCA. Estos resultados fueron confirmados mediante ensayos de viabilidad.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron el valor probiótico de *L. reuteri* CRL 1098 (capacidad hipocolesterolemica y producción de vitamina B₁₂), que sumado a su óptimo comportamiento a las condiciones del tracto gastrointestinal, lo convierten en un valioso candidato para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Fondos que apoyan este trabajo: PICT32516 (ANPCyT), PICT15016 (ANPCyT), PIP6249 (CONICET)

C22: BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD HALOPEROXIDASA PARA SU USO COMO BIOCATALIZADORES

Médici, R.^a; Garaycochea, J. I.^a, Lewkowicz, E. S.^a, Iribarren, A. M.^{a,b}

^a Laboratorio de Biotransformaciones, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. R.S. Peña 352, (1876) Bernal, Buenos Aires, Argentina, ^b Laboratorio de ácidos nucleicos, INGEBI, CONICET, Vuelta de Obligado 2490, (1428) Buenos Aires, Argentina.

rmedici@unq.edu.ar

Las haloperoxidasas son un grupo de enzimas capaces de catalizar la halogenación de compuestos

orgánicos en presencia de haluros inorgánicos sencillos como el KCl o KBr y peróxidos como el H₂O₂. Existen tres clases de enzimas con actividad haloperoxidasa que llevan a cabo la reacción por diferentes mecanismos: aquéllas que contienen un grupo hemo, aquéllas que contienen vanadio y las que no contienen metales. Enzimas de esta última clase fueron aisladas de bacterias provenientes de los géneros *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Luego de su elucidación estructural, se demostró que estas enzimas no son peroxidases, sino hidrolasas que pueden actuar como perhidrolasas en presencia de H₂O₂ y ácidos carboxílicos de cadena corta.

El desarrollo de nuevos métodos para la obtención de análogos de nucleósidos es un área de gran interés, debido a que estos compuestos presentan una variedad de aplicaciones. En particular, los derivados halogenados son utilizados como agentes terapéuticos e intermediarios de reacción. Entre ellos podemos citar el 6-cloropurín desoxirribósido con actividad anti SARS, los nucleósidos polihalogenados de indol y benzimidazol útiles como inhibidores del Citomegalovirus humano (HCMV) y por su actividad antihelmíntica, y los benzimidazoles halogenados 2-sustituidos que poseen actividad antituberculosis. Como alternativa sustentable a la síntesis orgánica clásica, la preparación de estos compuestos puede ser realizada utilizando biocatalizadores.

Con el fin de seleccionar microorganismos capaces de halogenar heterociclos nitrogenados análogos de bases nucleosídicas, se ensayó sobre la colección de bacterias de nuestro laboratorio, la haloperoxidación de la monoclorodimedona, un sustrato ampliamente reportado para el estudio de dichas enzimas dado que su desaparición puede medirse espectrofotométricamente. De esta forma, se encontraron microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, entre otros, capaces de ser utilizados como biocatalizadores en forma de células enteras.

Empleando dichas bacterias se ha llevado a cabo la cloración y la bromación regioselectiva del indol obteniéndose derivados halogenados en posición 5 y/o 7, los cuales fueron determinados por CG-MS. La reacción fue optimizada en cuanto a pH, a concentración de reactivos y sustrato y a masa de biocatalizador, de forma de minimizar los productos de oxidación derivados de la actividad oxigenasa de las haloperoxidasas.

C23: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE CAPA S DE *Lactobacillus brevis* EN *Lactococcus lactis*.

Axel Hollmann¹, Mariano Saviello¹, Anderson Miyoshi², Carolina Gonzalez¹, Lucrecia Delfederico¹, Vasco Azevedo² y Liliana Semorile¹.

1. Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes; R. Sáenz Peña 352, Bernal,

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 Buenos Aires, Argentina; 2. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, Brasil. ahollmann@unq.edu.ar.

Lactococcus lactis, es un coco Gram positivo, miembro de la familia de las bacterias del ácido láctico, y ha sido utilizado extensamente en la industria láctea para la producción y preservación de alimentos fermentados. Desde los años 90 se ha multiplicado el uso de *L. lactis* para la producción y secreción de proteínas recombinantes debido a que esta bacteria no produce endotoxinas. Las cepas libres de plásmidos no sintetizan la proteinasa PrP y sólo la Usp45 (proteína de secreción desconocida de 45 kDa) es secretada en cantidades que permiten su observación por tinción con *Coomassie blue*. Estas características facilitan notablemente la producción y purificación de proteínas heterólogas.

El objetivo del trabajo fue caracterizar la expresión de la proteína de capa S SlpA de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 en *Lactococcus lactis* NCDO 2118. Para la construcción de los clones, se empleó el sistema de expresión pXIES, que utiliza la señal de exportación de la proteína Usp45, y el promotor del gen de la xilosa permeasa P_{xyIT}, inducido por xilosa. Este sistema no sólo tiene la ventaja de ser inducido por una azúcar como la xilosa, a diferencia de otros sistemas de expresión en *L. lactis* que utilizan bactericidas, sino que además puede ser reprimido por el agregado de glucosa.

Mediante ensayos de *Western blot* se caracterizó la expresión y exportación al sobrenadante de la proteína transgénica Slp A. Posteriormente, se ensayaron distintas condiciones de expresión de dicha proteína y distintos tiempos de inducción, obteniendo los mejores resultados luego de 22 h (fase estacionaria). Finalmente se caracterizó la eficiencia de la represión del sistema mediante el agregado de glucosa, observándose que luego de una hora del agregado del represor, no es posible detectar más proteína en el sobrenadante.

C24: PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ITACÓNICO POR *Aspergillus terreus* MJL05 EN UN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO

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

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.

²Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Qca. y Farmacia, UNT

³PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET

e-mail: mjuy@ing.unrc.edu.ar, jorejas@ing.unrc.edu.ar

La producción de ácido itacónico es de gran importancia debido a sus amplias aplicaciones ya que este ácido orgánico puede, entre otras utilidades, ser fácilmente incorporado en polímeros y servir como un sustituto para ácido acrílico o metacrilato, los que son sintetizados a partir de tecnología petroquímica.

La producción de este ácido orgánico se lleva a cabo principalmente por procesos de fermentación de carbohidratos por medio de *Aspergillus terreus*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de ácido itacónico con la cepa de *A. terreus* MJL05, aislada de suelos de viñedos de España, operando en forma discontinua, un biorreactor de tanque agitado Applikon de 3 L de capacidad, provisto de un agitador tipo Rhuston.

En base a este objetivo se realizó una fermentación batch con el medio de cultivo de Riscaldati y col. (2000) el cual contiene glucosa como fuente de carbono. La experiencia se realizó empleando un volumen de trabajo de 1.7 litros. La velocidad periférica de agitación fue de 1.25 m.s⁻¹ y la aireación fue mantenida 0.69 l/min. La temperatura se mantuvo a 35 °C y el pH fue de 3.4 en el momento de la inoculación y luego fue controlado en 2.4 con KOH 4 N y H₂SO₄ 1N.

El biorreactor fue inoculado con una suspensión de esporas de una concentración de 10⁷ esporas/ml, previamente incubadas en agitador orbital a 35 °C y 200 rpm durante 24 hs en el mismo medio de cultivo. Muestras fueron extraídas del biorreactor en periodos de tiempo regulares durante 8 días a efectos de cuantificar biomasa por peso seco, glucosa residual y concentración de ácido itacónico. También se registraron en forma continua los valores de temperatura, flujo volumétrico de aire, concentración de oxígeno, velocidad de agitación y pH.

Al cabo de 192 hs de experiencia se obtuvieron 18 g/l de ácido itacónico y 5 g/l de biomasa, la glucosa consumida fue de 50 g/l alcanzando un rendimiento de ácido itacónico en función de la glucosa consumida de 0.36 g.g⁻¹.

Estos resultados se comparan con información experimental previa, obtenidas trabajando con un medio de cultivo de composición mínima que emplea la misma fuente de carbono, tanto a nivel erlenmeyer (Juy y otros (2006)) como empleando el mismo biorreactor utilizando idénticas condiciones operativas, con la finalidad de analizar efectos del cambio de escala además de determinar una composición para el medio de cultivo que permita obtener altas productividades de ácido itacónico y reducir los costos de producción.

C25: DESARROLLO DE SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN *Lactococcus lactis*

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
Marelli, Belkis; Repizo, Guillermo; Suárez, Cristian; de Mendoza, Diego; Magni, Christian.
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Dpto de Microbiología, UNR. Suipacha 531, Rosario, Argentina. E-mail: magni@ibr.gov.ar

Existe una demanda de sistemas de expresión que permitan la producción de proteínas heterólogas de interés en el campo de la alimentación y la salud. Entre los sistemas de expresión conocidos, *Lactococcus lactis* posee ventajas sobre otros ya que es una bacteria no patógena consumida por el hombre en los alimentos. Además, cabe destacar que esta bacteria puede expresar, transportar y liberar proteínas en el tracto gastrointestinal siendo potencialmente útil para el desarrollo de vacunas orales y nuevos alimentos con propiedades terapéuticas. Para este tipo de aplicaciones es necesario disponer de vectores de expresión de fácil manipulación y bajo costo de aplicación.

Con la intención de construir un vector con estas características, en primer lugar se evaluaron las actividades transcripcionales de diferentes regiones promotoras utilizando fusiones al gen reportero de la β-galactosidasa. De esta manera se seleccionó el promotor *P_{cit}* de *L. lactis* CRL264 por su mayor actividad transcripcional. Este promotor, inducible por pH ácido, regula la expresión del operón *citMICDEFXG* involucrado en el metabolismo de citrato. Además, en el vector se incluyó la región de replicación del plásmido pCIT264 que porta el gen de la citrato permeasa de la cepa de *L. lactis* CRL264 y un gen de resistencia a cloramfenicol. De esta manera se obtuvo el vector pBM2. Los niveles de expresión obtenidos mediante pBM2 se compararon usando como referencia el vector pNZ8048, un miembro de la familia de vectores del sistema de expresión NICE (Nisin-Controlled gene Expression system) muy utilizado en la expresión de proteínas heterólogas en *L. lactis*. Para dichos ensayos se utilizó una proteína de alto interés económico y social como es la subunidad VP8* de la proteína VP4 de la cápside de rotavirus. Se evaluó su producción en las formas citoplasmática y secretada al medio exterior. Para este último caso, se utilizó el péptido señal de la proteína Usp45 de *L. lactis* MG1363.

Utilizando el sistema NICE pudimos expresar en *L. lactis* la proteína VP8* en las formas citoplasmática y secretada siendo los niveles de expresión proporcionales a la concentración del inductor (0-50 ng/ml de nisina). Por otro lado, utilizando el sistema inducible por pH (pBM2) obtuvimos VP8* en la forma secretada pero no así en la forma citoplasmática. Debido a que nuestro sistema presentó menores niveles de expresión que el sistema NICE estamos evaluando la posibilidad de incrementar su actividad transcripcional mediante modificaciones en la región promotora *P_{cit}*.

C26: ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA ÓPTICA PARA LA DETECCIÓN DE QUIMIOTAXIS BACTERIANA.

Nisenbaum Melina¹, Emilio Maldonado¹, J. Froilán González, Lucía Isabel Passoni, Silvia E. Murialdo.

E-mail: melinanisenbaum@gmail.com,
maldonadoemilio@gmail.com

Departamento de Ingeniería Bioquímica y Laboratorio de Bioingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Juan B. Justo 4302, Mar del Plata, Buenos Aires, 7600, Argentina.

La movilidad y la quimiotaxis bacteriana juegan roles vitales en la ecología de las poblaciones microbianas. La quimiotaxis consiste en el movimiento de los microorganismos bajo la influencia de un gradiente químico que los ayuda a encontrar óptimas condiciones para su crecimiento y supervivencia. La detección química de un sustrato mediante quimiorreceptores en la superficie celular genera cambios en la dirección de movimiento de la bacteria.

La quimiotaxis bacteriana contribuye a la virulencia de patógenos como *Vibrio cholera*, *Salmonella* y *Agrobacterium tumefaciens*. También promueve la formación de biofilms guiando las bacterias hacia los nutrientes absorbidos y brinda sostén a las superficies abióticas a través del flagelo. En conjugación con las capacidades degradativas de cada bacteria, la quimiotaxis hacia contaminantes ambientales podría contribuir a la habilidad de ésta para competir con otros

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
microorganismos en el ambiente y ser eficientes agentes para la biorremediación y remoción de contaminantes.

Los métodos tradicionales para el estudio de la quimiotaxis requieren altas concentraciones celulares y un tiempo considerable para poder detectar respuestas a simple vista. Tampoco resultan diferenciables el grado de acumulación de bacterias y el nivel de movilidad de las mismas.

En este trabajo se presenta una técnica que ofrece una alternativa de mayor sensibilidad que los métodos tradicionales que utilizan imágenes estáticas. Se propone el análisis de videos grabados con una cámara fotográfica digital adosada a un microscopio óptico. A posteriori se realiza el proceso de las secuencias de imágenes utilizando el concepto de entropía. Se obtiene como resultado una imagen compilada en la que es factible identificar zonas con diferentes grados de acumulación bacteriana en el contorno de un tapón de agarosa. De esta forma se puede estudiar la naturaleza de la respuesta de un organismo a un estímulo.

La entropía de las series temporales, correspondientes a la evolución del nivel de intensidad de cada píxel, es un estimador de la dinámica generada por el tránsito de bacterias en una determinada zona.

Los resultados obtenidos son alentadores dado que las regiones con mayor nivel de entropía se corresponden con áreas de alta concentración y movilidad bacteriana. Este proceso permitirá una evaluación rápida y de bajo costo computacional del fenómeno quimiotáctico observado con microscopía óptica.

POSTERS

SECCIÓN 1: BIODIVERSIDAD Y MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

P1: CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS (PSB) AISLADAS DE SUELOS DE LA PUNA, ARGENTINA

Emilce Viruel¹, Marcela Ferrero¹, María Ester Lucca¹, Faustino Siñeriz¹.

¹PROIMI-CONICET Av. Belgrano y Pje. Caseros (4000) Tucumán. emilceviruel@hotmail.com

El fósforo es uno de los nutrientes inorgánicos más requeridos por microorganismos y plantas. Los vegetales lo absorben del suelo, donde se encuentra en muy baja concentración. Estos bajos índices se deben a que el fosfato reacciona con iones de Ca, Fe o Al, provocando su precipitación y disminuyendo su biodisponibilidad. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados por los cultivos.

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) tienen la capacidad de crecer en bajas concentraciones de fósforo en medios con fosfato insolubles como única fuente de fósforo. Además de asimilar el elemento, solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales.

Se han aislado bacterias con alta afinidad al fosfato utilizando medio P₁ (1 μM de P) mediante técnicas de enriquecimiento dinámico en quimiostato a partir de muestras de rizosferas de la zona Andino Puneña, NOA. Los enriquecimientos fueron sembrados en placas con medio NBRIP (con 5 g/l de Ca₃(PO₄)₂ insoluble como única fuente de P) durante 14 días a 30°C. Las PSB fueron identificadas mediante aparición de halos claros alrededor de las colonias, determinándose el coeficiente de solubilización (diámetro del halo/diámetro de la colonia). La actividad solubilizadora se confirmó repicando las colonias en caldo NBRIP, incubándolas 72 horas a 30°C con agitación. Se midió en el sobrenadante el contenido de fósforo inorgánico soluble por el método del azul de molibdeno.

Se tomó como criterio la concentración de fosfato soluble residual en el sobrenadante junto con los valores del coeficiente de solubilización para escoger las bacterias solubilizadoras más eficientes. Las mismas se denominaron EV1, EV2, EV3 y EV4, siendo 470, 445, 390 y 458 ppm de P la concentración final en el sobrenadante y 26, 10, 18, 9 cm el coeficiente de solubilización, respectivamente. Se confeccionaron curvas de crecimiento en distintos medios (LB y medios mínimos con 1 y 100 μM de P). Se probó además distintas temperaturas (10, 20, 30 y 37°C). Las cepas están siendo caracterizadas mediante técnicas

moleculares (secuenciación del ADNr 16S), bioquímicas y microscópicas.

Se considera que la solubilización de distintas rocas fosfatadas y de otras fuentes de fósforo inorgánico por los microorganismos del suelo es una alternativa fundamental para incrementar la cantidad de nutriente disponible para las plantas, convirtiendo a las pasturas de altura en una fuente de mantenimiento tanto de las poblaciones autóctonas de camélidos como de ganadería de subsistencia de poblaciones puneñas en el noroeste argentino.

P2: QUANTITATIVE ASSESSMENT OF PHENOL HYDROXYLASE DIVERSITY IN BIOREACTORS USING A FULL CYCLE FUNCTIONAL GENE ANALYSIS

Laura A. Basile & Leonardo Erijman

INGEBI-CONICET-UBA. Vuelta de Obligado 2490 (1428) Buenos Aires, Argentina (e-mail: basile@dna.uba.ar)

Biodiversity has allegedly a significant influence upon the dynamics, stability and functioning of ecosystems. One of the practical consequences of diversity within microbial assemblages is the occurrence of functional redundancy, i.e. the ability of a number of different species to carry out similar functions. In this work, an approach to assess quantitatively the diversity of functional genes in complex microbial environments was developed, and applied to the analysis of the genetic diversity of phenol-degrading potential of communities from laboratory-scale activated sludge. A 620 bp fragment of the gene coding for the major subunit of phenol hydroxylase (LmPH) was amplified with conserved primers from activated sludge extracted from two reactors fed with synthetic sewage plus phenol, and used to generate clone libraries. Following phylogenetic analysis, 59 sequences were clustered into six distinct subgroups with a genetic distance of 0.08, which likely reflects functionally relevant differences in enzyme function. Seven sets of primers were designed to target the six groups and used to obtain quantitative information on the dynamics of LmPH gene diversity, using real time PCR assays throughout nine months of bioreactors operation. Total LmPH gene copy number remained approximately steady in phenol-amended and control reactors. However, the increase in phenol-degrading activity observed in phenol-amended sludge was accompanied by a parallel increase in LmPH gene diversity. This effect was reversed upon deletion of phenol addition. Simultaneous analysis of PCR-DGGE banding

patterns of 16S rRNA gene displayed variations over the time scale, but no significant differences were observed between phenol-amended and control reactors at each time point. In conclusion, our results indicate that a high genetic diversity for the LmPH gene emerges in sludge acclimatized to phenol, and the diversity is sustained as long as the supply of phenol is continued. The use of a full cycle functional gene approach appears a convenient strategy to get insight into functional redundancy in complex environments.

P3: LA INOCULACIÓN DE *ARABIDOPSIS THALIANA* CON *AZOSPIRILLUM BRASILIENSE* SP 245 AUMENTA EL CRECIMIENTO, LOS NIVELES DE ABA Y ALIVIA EL ESTRÉS HÍDRICO

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

La inoculación de cereales con bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) reduce la cantidad de fertilizante a utilizar y aumenta el rendimiento (Okon y Labandera-González 1994, *Soil Biol Biochem* 26, 1591-1601). Los estudios con PGPB se han centrado en el género *Azospirillum* y los efectos benéficos incluyen promoción del crecimiento de raíz y formación de pelos radicales (Kapulnik et al. 1985, *Can J Bot* 63, 627-631). Este efecto promotor se atribuye a fitohormonas producidas por la bacteria (Bottini et al. 2004, *Appl Microbiol Biotech* 65, 497-503). El estrés hídrico es una de las causas más importantes en la disminución del rendimiento vegetal. Las plantas responden y se aclimatan a distintas condiciones de estrés modificando su metabolismo, morfología y fisiología promoviendo mecanismos de defensa (Jiang y Zhang 2003, *Plant Cell Environ* 26, 929-939), por ejemplo produciendo más hormonas como ácido abscísico (ABA). *A. brasilense* sp. 245 produce ABA en medio de cultivo químicamente definido y dicha producción aumenta con el agregado de NaCl (Cohen et al. 2007, *Plant Growth Regul*, en prensa). Por otra parte, la gran disponibilidad de mutantes de *Arabidopsis thaliana* hacen de esta planta una herramienta fundamental para el estudio de la fisiología. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* sp 245 sobre la producción de ABA y el crecimiento de plantas sometidas o no a estrés hídrico. Se trabajó con *A. thaliana* silvestres, mutantes *aba-2-1* (bloqueo en la síntesis de ABA) y transgénicas que expresan el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor de *GLABRA2* (*pGL2:GUS*) que regula diferenciación de pelos radicales y tricomas. Las plantas se cultivaron en placas de Petri con medio MS modificado y fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
oscuridad. Para simular estrés hídrico las plantas silvestres se sometieron a marchitez temporaria. La inoculación promovió el crecimiento, ya sea en silvestres como mutantes *aba-2-1*, en: longitud y peso fresco (PF) de raíz, número de raíces laterales, abundancia de pelos radicales y tricomas, área foliar, PF de parte aérea, tanto en condiciones normales como bajo estrés hídrico. Además, la inoculación aumentó la concentración de ABA tanto en silvestres como en *aba-2-1*, en las que se midió concentraciones de la hormona similares a aquellas. La expresión de *GL2* por raíz fue mayor en las plantas inoculadas. Los resultados confirman que la bacteria promueve crecimiento y alivia el estrés en la plantas por medio de la producción de ABA e informan sobre los mecanismos involucrados.

P4: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA BACTERIA PRECIPITANTE DEL FE Y DEL MN, RELACIONADA CON LAS OXALOBACTERACEAE, EN LAS CERCANÍAS DE LA CENTRAL NUCLEAR DE EMBALSE, POSIBLEMENTE RELACIONADA CON PROCESOS DE BIOCORROSIÓN

Ana F. Forte Giacobone¹, Arturo L. Burkart¹, Eduardo Cortón², Alberto D. Keitelman³, Patricia Silva Paulo⁴

(1) Grupo Biocorrosión. División Corrosión - Dpto. Materiales, Centro Atómico Constituyentes. Comisión Nacional de Energía Atómica, Av. General Paz 1499, B1650KNA, San Martín, Buenos Aires.

(2) Grupo Biosensores y Bioanálisis. Dpto. Química Biológica. Facultad de Cs. Exactas y Naturales. UBA y CONICET, Ciudad Universitaria, 1428. Cap. Fed.

(3) REPSOL YPF - Ingeniería de Materiales. Dirección de Tecnología - Centro de Tecnología de Argentina, Baradero777, (1925) Ensenada, Buenos Aires.

(4) Grupo Pecuario. División Agropecuaria- Dpto. Aplicaciones, Centro Atómico Ezeiza. Comisión Nacional de Energía Atómica, Presbitero Luis Gonzalez y Aragón Nro.15 CP: B1802AYA, Ezeiza, Buenos Aires. ana.forte@gmail.com.

La Biocorrosión o Corrosión Inducida Microbiológicamente (MIC) es un fenómeno causado por procesos biológicos y electroquímicos que ocurren en la superficie de los metales como consecuencia del metabolismo de microorganismos adheridos a los mismos.

El primer paso para que ocurra MIC es la formación de un "biofilm", constituido tanto por los organismos como por productos generados por ellos y que permite el establecimiento de comunidades (cuyos miembros pueden interactuar en forma de consorcios), en algunos casos muy complejos. El recubrimiento de una superficie por un biofilm es llamado "biofouling" o bioensuciamiento.

En la Central Nuclear Embalse (CNE) se ha detectado en las sucesivas paradas programadas bioensuciamiento y biocorrosión en tuberías, cajas de agua e intercambiadores de calor que utilizan agua del

Embalse como refrigeración. El análisis por EDAX de depósitos extraídos del circuito secundario de refrigeración muestra la presencia de óxidos de hierro y manganeso, ubicándose los segundos hacia la luz del tubo. Por otra parte los niveles de Mn en el agua del lago son inferiores a 10 ppm, lo que descarta la presencia de los precipitados como consecuencia de autooxidación.

En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización de un cocobacilo Gram-negativo, aislado de muestras de aguas sub-superficiales del lago de Embalse, Córdoba, en las cercanías de la toma de agua de refrigeración de la CNE. Esta bacteria, precipitante de hierro y manganeso, aeróbica estricta, capaz de crecer en medios bajos en nutrientes, cuya secuencia del 16sRNA muestra una homología superior al 95% con bacterias pertenecientes a la familia oxalobacteraceae. Se destaca su capacidad de adhesión a diferentes aceros (tal como muestra el análisis por microscopía electrónica de barrido).

P5: AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD DECOLORANTE Y ANTIMICROBIANA.

I. Godoy¹, J. Fariña² & O. Delgado²

¹UNT, ²PROIMI/CONICET, Tucumán, Argentina, 4000. ile21bt@hotmail.com ☎ +54 381 4344888 - 📠 +54 381 4344887

Las Yungas son selvas de montaña que se extienden desde Venezuela hasta el noroeste argentino. Constituye uno de los ecosistemas con mayor biodiversidad de Argentina y uno de los más amenazados del mundo. Sin embargo, existen pocos reportes acerca del potencial biotecnológico de la microbiota de esta zona.

Los hongos filamentosos ofrecen grandes ventajas como sistemas productores de enzimas y otros metabolitos por su elevada capacidad biosintética y secretoria, gran versatilidad y alto rendimiento. Considerando dichas ventajas, se estudió la capacidad de diferentes aislamientos fúngicos para biodecolorar colorantes textiles reactivos así como también por su actividad antimicrobiana frente a patógenos de interés. Las muestras fueron tomadas de la zona pedemontana de Las Yungas en Diciembre de 2004. A partir de diferentes tipos de muestras (suelos, aguas, materia orgánica en descomposición, cuerpos de fructificación, etc.) colectadas asépticamente, y empleando técnicas de dilución cuando fue necesario, se realizaron cultivos en medio agarizado. Alícuotas de las diluciones, fragmentos de micelio o cuerpos de fructificación fueron transferidos a medio MYSA e incubados a 20°C, seguido del re-aislamiento, hasta lograr el crecimiento de colonias puras.

Se aislaron 280 hongos autóctonos de los cuales, 3 fueron seleccionados por su capacidad para biodecolorar Vilmafix Blue RR-BB, 200 ppm; y 5 por su

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 capacidad para producir compuestos antimicrobianos de amplio espectro, activos contra: *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 29213, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *B. subtilis* A1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris*, *Salmonella newport*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* O157:H7 Stx1/Stx2.

Para los hongos con capacidad decolorante, se detectó actividad lacasa, peroxidasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa en sobrenadantes de cultivos en ND-PAGE, así como también la producción de sideróforos que estarían involucrados en la biodecoloración.

Los aislamientos fueron caracterizados e identificados mediante la secuenciación del dominio D1/D2 del ADNr 26S y genes de citocromo oxidasa.

Los resultados obtenidos nos permiten aseverar que los hongos filamentosos aislados podrían emplearse para el tratamiento de efluentes textiles contaminados con colorantes, principalmente debido al perfil ligninolítico de los mismos. Por otro lado el aislamiento de hongos con capacidad para producir antimicrobianos activos contra diversos patógenos reviste particular importancia considerando la emergencia permanente de organismos resistentes a los antibióticos ya conocidos. Esto los convierte en potenciales productores a ser evaluados en la industria farmacéutica.

P6: DEGRADACION DE UN COLORANTE SINTETICO EN SUELO POR DOS CEPAS DE HONGOS LIGNINOLITICOS.

Giménez A. V., Papinutti L., Forchiassin F., Diorio, L.A. Lab. Micología Experimental. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA. Ciudad Universitaria, CP 1428. Correo: ailana_75@hotmail.com

La actividad industrial de la sociedad moderna produce cantidades masivas de compuestos xenobióticos, los cuales, en alta proporción, finalizan su ciclo entrando al ambiente. Un tratamiento de decontaminación al cual se le está prestando gran atención en los últimos años es la biorremediación, a partir de la cual se puede lograr la degradación parcial o completa de sustancias tóxicas utilizando, como agentes descontaminantes, microorganismos.

Entre los microorganismos capaces de degradar sustancias tóxicas, los hongos lignocelulósicos se encuentran entre los más interesantes. Su batería de enzimas ligninolíticas extracelulares les permite degradar un amplio rango de contaminantes, entre ellos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs), bifenilos policlorados (PCBs), tintes industriales, sin producir compuestos tóxicos secundarios en el proceso.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de degradación de un colorante sintético en

suelos contaminados artificialmente y su relación con la producción enzimática en dos cepas de hongos ligninolíticos nativos de nuestro país, *Stereum hirsutum* y *Fomes sclerodermeus*.

Se utilizaron las cepas de *S. hirsutum* (BAFC 2234) y *F. sclerodermeus* (BAFC 2752). Los inóculos se realizaron en recipientes plásticos, con salvado de trigo al 80% de humedad, y fueron sembrados con el micelio de la correspondiente cepa, extraído de una colonia de 5 días de crecimiento en agar malta. Para los cultivos se utilizaron erlenmeyers de 100 ml donde se introdujeron 12 g de suelo salpicado con una solución acuosa de 0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10 mM de Verde de Malaquita (VM). El suelo fue inoculado e incubado 20 días a 28°C. Para cada cepa se realizaron tratamientos estériles y no estériles. El VM retenido fue extraído con alcohol etílico de muestras de 2 g de suelo, agitación a 50°C por 2 h y centrifugación a 2000 rpm. Se midió absorbancia a 618 nm. Las actividades enzimáticas, lacasa y manganeso peroxidasa (MnP), se midieron a partir de extractos acuosos de suelo. Los resultados de actividad enzimática fueron expresados como U ($\mu\text{mol}/\text{min}$)/g de suelo seco.

Si bien ambas cepas fueron capaces de degradar el colorante, *S. hirsutum* mostró los mayores porcentajes de decoloración, mayores al 90% en el rango de concentraciones evaluadas con respecto al blanco, tanto en condiciones estériles como no estériles. La actividad enzimática, tanto de lacasa como de MnP, presentó los mayores valores también con la misma cepa.

Dados los resultados obtenidos, *S. hirsutum* se presenta como un organismo eficiente en la degradación del colorante y, en primera instancia, es factible de ser utilizado como agente biológico en biorremediación.

P7: BACTERIAS QUITINOLÍTICAS AISLADAS DEL TRACTO DIGESTIVO DE LAPAS (*Nacella (P) deurata*, *Nacella (P) magellanica*) EN EL CANAL DE BEAGLE

F. Penas², F. Gómez¹, & O. Delgado¹

¹ PROIMI/CONICET, Tucumán, Argentina, 4000² Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM.

federicopenas@hotmail.com ☎ +54 381 4344888 - 📠 +54 381 4344887

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, siendo el más importante en el ecosistema marino. Es un polisacárido estructural que se encuentra presente en el exoesqueleto de invertebrados marinos, insectos y en la pared celular de algunos hongos. La degradación de la quitina es un atributo importante de las bacterias marinas, debido al rol que juegan en la descomposición de materia orgánica. Para ello, los microorganismos poseen diversos mecanismos

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 involucrando a proteínas ligadas a quitina, sin embargo la hidrólisis por quitinasas es el paso clave en la solubilización y mineralización de este compuesto.

Se obtuvieron muestras de contenido intestinal de *Nacella (P) deurata*, *Nacella (P) magellanica*. La colecta se realizó en el Canal de Beagle en dos sitios con diferentes grados de disturbio antrópico, Isla conejo (IC) que al estar mas cerca a la región de Bahía Ushuaia recibe mayor aporte de compuestos provenientes de la ciudad y Bahía Lapataia (BL) que forma parte del Parque Nacional Tierra del Fuego y funciona como un sistema semi-cerrado sin aporte antropogénico significativo. Las muestras se inocularon en medio R2A suplementado con quitina coloidal e incubados a 8°C. La presencia de zonas claras, halos, alrededor de las colonias evidenció bacterias productoras de quitinasas. Aquellos microorganismos que presentaron mejor actividad en relación al tamaño del halo, se seleccionaron, caracterizaron e identificaron mediante secuenciación del gen ribosomal 16S.

Los resultados obtenidos de los recuentos en placa fueron los siguientes: *N (P) deurata* (IC): 1,26E+06 UFC/ml, (BL): 3,66E+06 UFC/ml, *N. (P.) magellanica* (IC): 2,94E+06.UFC/ml, (BL) 4,82E+06 UFC/ml, Se realizaron ensayos para otras especies de invertebrados (erizos y crustáceos) pero en ninguno de ellos se observó microorganismos capaces de degradar este sustrato, sin embargo, en las lapas se obtuvieron los siguientes porcentajes de bacterias quitinolíticas: 29.7 % y 14.3% para *Nacella (P) deurata* y 100%.y 0% para *Nacella (P) magellanica* en los sitios Isla Conejo y Bahía Lapataia respectivamente. Individuos de la misma especie, colectados en diferentes sitios arrojan resultados distintos por lo cual aparentemente deben ser tratados en forma independiente. A partir de estos resultados se podría pensar que el hecho de encontrar productores de enzimas en algunos invertebrados estaría relacionado con sus hábitos alimentarios y de vida, como así también por un efecto antropogénico en su hábitat. Las bacterias seleccionadas están relacionadas filogenéticamente al género *Shewanella*.

P8: AISLAMIENTO DE BACTERIAS PSICRÓFILAS /PSICROTOLERANTES CON POTENCIAL IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA A PARTIR DEL ECOSISTEMA MARINO SUBANTÁRTICO

F. Gómez¹, F. Penas², F. Siñeriz¹, G. Lovrich³ & O. Delgado¹

¹PROIMI/CONICET, Tucumán, Argentina, 4000.

²UNaM. ³Centro Austral de Investigaciones Científicas, Ushuaia, Argentina

fiogg@hotmail.com ☎ +54 381 4344888 - 📠 +54 381 4344887

La industria de las enzimas ha tenido un crecimiento continuo a escala mundial. La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria provienen de microorganismos procariontes y eucariontes inferiores, encontrando ellas una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, textil y farmacéutica lo que hace que se continúe con sistemas de screening y selección de nuevas cepas con características especiales para distintas aplicaciones. Una fuente poco estudiada de nuevas actividades enzimáticas son las bacterias marinas. Dentro de las áreas de posible exploración, las aguas subantárticas presentan atractivos considerables, que por estar en zonas costeras son de fácil acceso y presentan temperaturas que oscilan entre los 4,5 y los 10°C. Estas temperaturas se encuentran en el rango óptimo de crecimiento de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes, por lo que serían una potencial fuente de microorganismos capaces de crecer y producir enzimas con elevadas actividades específicas a bajas temperaturas.

Muestras de agua fueron colectadas estacionalmente (noviembre de 2004-agosto de 2006) de diferentes zonas del Canal de Beagle; fueron inoculadas en medio de cultivo R2A enriquecido con diferentes fuentes de carbono: celulosa, xilano, quitina y leche en polvo descremada e incubadas a 8°C. Se seleccionaron diferentes morfotipos coloniales para cada actividad teniendo en cuenta el tamaño de los halos de actividad en placa y los mejores productores fueron identificados mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S. Teniendo en cuenta la procedencia de las bacterias seleccionadas, los resultados de las distintas actividades son: Proteasa: Bahía Golondrina (primavera, 2004) 6% de microorganismos productores, Isla Conejo (verano, 2005): 22.9%. Quitinasa: Bahía Ushuaia (primavera, 2005): 99.4%, Isla Conejo (otoño, 2006): 10.5%. Celulasa: Bahía Golondrina (invierno, 2005): 6.2%, Isla Conejo (invierno, 2005): 19.4%. Xilanasa: Isla Conejo (invierno, 2005): 21.4%, Isla Conejo (primavera, 2005): 18.3%, Río Ovando (invierno, 2005): 9.1% y Bahía Ushuaia (primavera, 2005): 5.8%. Se detectó mayoritariamente la presencia de microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes. De acuerdo al análisis de secuencias, la mayoría de los aislamientos seleccionados están relacionados a los géneros *Pseudoalteromonas* y *Marinomonas*.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
P9: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS MICROBIANAS AUTOCTONAS PARA SER UTILIZADAS EN CELDAS DE COMBUSTIBLE MICROBIANAS (MFCs) DE TERCERA GENERACION

Natalia Sacco¹; Maria Celina Bonetto, Florencia Zalazar y Eduardo Cortón.

Laboratorio de Biosensores y Bioanálisis. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. Ciudad Universitaria, Pab. II, (1428), Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

¹nsacco@qb.fcen.uba.ar

El estudio de sistemas para la producción de energía eléctrica mediante la utilización de celdas de combustible basadas en la oxidación de hidrogeno ha avanzado rápidamente en los últimos 15 años; sin embargo, la fuente primaria para la producción de H₂ sigue siendo principalmente los combustibles fósiles. Las celdas de combustible microbianas (MFCs), de desarrollo más reciente, posibilitan la producción de electricidad utilizando como dadores de electrones y protones materia orgánica o residuos orgánicos, mediante la transferencia directa (MFCs de tercera generación) o no (primera y segunda generación) de los electrones producidos hacia los electrodos. Las MFCs han sido utilizadas con dos fines principales: como transductores de sistemas analíticos, o bien como métodos de producción de energía eléctrica en de muy baja potencia, en las que estos sistemas pueden tener ventajas respecto a las fuentes de poder convencionales.

El objetivo de este trabajo es el aislamiento y caracterización de cepas microbianas adecuadas (facultativas reductoras de Fe) de sedimentos de cuerpos de agua dulce de la Provincia de Buenos Aires para ser utilizadas en MFCs (para su uso primario como biosensores).

Sedimento muestreado a distintas profundidades (Río de La Plata), fue colocado en una columna de vidrio, 7 electrodos de carbono se situaron a diferentes profundidades (0-40 cm). Los electrodos (ánodos) se mantuvieron conectados (circuito cerrado) con un cátodo en el agua sobrenadante, bajo aireación constante. En estas condiciones esperamos el enriquecimiento de los electrodos por bacterias "anodofilas".

En la zona de muestreo se estudio el perfil de potencial rédox, pH, y conductividad. Semanalmente se ha medido el potencial desarrollado en cada electrodo a circuito abierto y al aplicarle una resistencia externa. La corriente producida en cada electrodo aumentó entre un 24 y 120 % por ciento, dependiendo de la profundidad a la que se encuentran los electrodos en los 115 días de comenzado el experimento. El incremento de potencial (y corriente) podría indicar una colonización de los electrodos por bacterias ánodofilas. Paralelamente las muestras de lodo fueron procesadas mediante técnicas de microbiología clásicas para el

aislamiento de microorganismos, 4 cepas candidatas están siendo caracterizadas. Experimentos para establecer el origen biológico del incremento de potencial así como la caracterización de los microorganismos esta en progreso.

P10: INFLUENCIA DE LOS CAMBIOS ESTACIONALES SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO EN EL COMPLEJO MÉDANOS DE CAUCETE, SAN JUAN

Salomón, M.⁽¹⁾, Noé, L.⁽²⁾, Abril, A.⁽²⁾, Toro, M.⁽¹⁾ & Vazquez, F.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Inst. Biotecnología-UNSJ. Av. San Martín 1109 (Oeste) San Juan.

⁽²⁾ Microbiología Agrícola. F.C.A.-UNC. Av. Valparaíso s/n. Ciudad Universitaria. Córdoba. salomonmv@gmail.com

La biomasa microbiana representa uno de los componentes vivos del suelo, junto con la fauna específica y las raíces de las plantas. Constituye alrededor del 5% de materia orgánica y cumple funciones vitales en el funcionamiento del ecosistema del suelo; por esto resulta lógica la inclusión de parámetros relacionados con la dinámica microbiana como indicador de calidad. La capacidad de mineralización de nitrógeno es la posibilidad de los suelos de transformar los compuestos nitrogenados en amonio/nitrato, bajo condiciones determinadas de temperatura y humedad. Este parámetro influye en la determinación de calidad del suelo, pero las significativas variaciones estacionales limitan su uso, por lo que interesa cuantificarlas. También los microorganismos celulolíticos (fundamentales en la degradación vegetal), dependen de las condiciones del microambiente para optimizar su función degradadora. En el ámbito de estudio existen diferencias significativas respecto de los niveles de humedad del suelo, en relación a cambios estacionales. El Objetivo del trabajo fue evaluar si el cambio estacional influye sobre la abundancia de microorganismos edáficos relacionados con la fertilidad en un complejo de médanos del monte. El trabajo se realizó en una zona de la provincia de San Juan donde existen bien definidos dos ambientes, médano e intermédano. En las estaciones primavera y verano, se tomaron muestras de suelo (0-20cm de profundidad) en cada ambiente. Se determinó humedad edáfica (pérdida de peso). La abundancia de grupos funcionales de microorganismos amonificadores, nitrificadores y celulolíticos se analizó mediante el método de NMP. La abundancia de fijadores de N de vida libre se analizó por recuento en placa. Los resultados indican diferencias significativas entre estaciones sólo con respecto a microorganismos celulolíticos ($p=0.0058$) y nitrificadores ($p=0.025$), pero en general la abundancia de todos los grupos funcionales fue mayor en verano. Teniendo en cuenta los sitios médano e intermédano en cada estación de año estudiada, los resultados

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 muestran diferencias significativas sólo para microorganismos celulolíticos ($p=0.0231$). Los datos obtenidos para microorganismos amonificadores y fijadores de nitrógeno, en todos los casos, tuvieron valores de abundancia más altos y con baja fluctuación; y los celulolíticos y nitrificadores tuvieron valores de abundancia bajos. Se concluye que la estacionalidad influye sólo sobre la abundancia de microorganismos edáficos más sensibles, pudiendo influir en su actividad y abundancia el cambio en la disponibilidad de agua de una estación a otra.

P11: PRESENCIA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN CUERPOS FRUCTÍFEROS DE UN HONGO ENDÉMICO (CYTTARIA HARIOTII) DE LA PATAGONIA.

Ulloa J R; Libkind, D; Fontenla, S; van Broock, M R
Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología. CRUB, UNCo. Quintral 1250, S.C. de Bariloche, Argentina.

rulloa@crub.uncoma.edu.ar

Las levaduras, y en particular la especie *Saccharomyces cerevisiae*, han estado asociadas al hombre desde épocas muy tempranas. A pesar de la estrecha relación de las levaduras sacaromícéticas con el hombre, poco se conoce sobre su distribución y ecología en ambientes naturales. Sin conocer de su existencia, las primeras civilizaciones las utilizaban empíricamente para elaborar sus bebidas y alimentos. En la región patagónica de Argentina los nativos fabricaban bebidas fermentadas en base a los cuerpos fructíferos (estromas) del hongo conocido como Llao-llo (*Cyttaria hariatii*), del cual el 10% de su peso seco corresponde a azúcares simples. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la flora de levaduras sacaromícéticas asociadas a los estromas de *C. hariatii* en el Parque Nacional Nahuel Huapi. Las muestras fueron incubadas a 10 y 30°C en un medio selectivo con etanol al 8%. Se obtuvieron 72 aislamientos, los cuales fueron agrupados e identificados molecularmente mediante MSP-PCR, estudios de RFLP-ITS y secuenciación de la región D1/D2 del ADNr 26S e ITS. Un total de 56 aislamientos fueron clasificados como levaduras sacaromícéticas, en base a la producción de ascosporas típicas o a los resultados moleculares. Las especies detectadas fueron *S. cerevisiae* (6), *S. uvarum* (27) y *S. bayanus* (23). Las dos últimas se caracterizan por su preferencia a ambientes fríos, lo que es coherente con el clima templado frío de la región. Por otro lado, ambas especies fueron aisladas preferentemente a 10°C, mientras que *S. cerevisiae* exclusivamente a 30°C. En numerosos casos se observó la presencia simultánea de 2 especies sacaromícéticas en una misma muestra y también, aunque en menor grado, se detectaron las 3 especies en una misma muestra. La caracterización genética y fisiológica de las cepas

nativas correspondientes a las 3 especies indica que éstas difieren considerablemente de las cepas de colección. Esto sugiere que se trataría de especies con características distintivas propias, posiblemente resultado de su aislamiento geográfico y de su adaptación a los sustratos y condiciones locales. El presente trabajo constituye el primer antecedente confirmado (por métodos moleculares) de la presencia de *S. cerevisiae* en ambientes naturales del PNNH y la Argentina. El presente trabajo contribuye al conocimiento ecológico y ecogeográfico de *S. cerevisiae* y de otras especies sacaromycéticas en ambientes naturales. Futuros estudios podrían contribuir a esclarecer los hábitats naturales de las diferentes especies de *Saccharomyces* nativas, la comprensión de los mecanismos que posibilitan su coexistencia y la comparación de la diversidad genética entre poblaciones salvajes y cepas domesticadas.

P12: BIOMASA MICROBIANA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SUELOS DE LOS PARCHES E INTERPARCHES DE *BULNESIA RETAMA* Y *LARREA DIVARICATA* EN LOS MEDANOS GRANDES, CAUCETE, SAN JUAN

Vega Avila A.D.¹ Toro M.E.¹, & Vazquez F¹.

¹ Instituto de Biotecnología – FI – UNSJ. Av. Lib. San Martín 1109 (Oeste) San Juan. vega_daniela06@yahoo.com.ar

La escasez de agua en los ecosistemas áridos y semiáridos provoca que la vegetación se distribuya en parches con una alta cobertura vegetal dispersos en una matriz de suelo de baja cobertura. Los grupos microbianos más importantes asociados al suelo de estas islas son hongos y bacterias, los cuales pueden encontrarse en estado de letargo y metabólicamente activos. La actividad enzimática del suelo resulta, básicamente, de la proliferación de distintos tipos de microorganismos. En este ambiente heterogéneo, las actividades de los microorganismos, difieren del comportamiento manifestado en el laboratorio, dado que los microorganismos coexisten con la mesofauna, la vegetación y las propiedades físicas y químicas del suelo. Por esto, la determinación de la actividad enzimática del suelo constituye un método para evaluar la fertilidad de los suelos como así también el potencial de este recurso natural. El objetivo del trabajo fue determinar la abundancia de microorganismos y la actividad enzimática en el suelo de los parches de *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata* e interparches. El trabajo se realizó mediante la toma de muestras de suelo de los parches e interparches, midiendo biomasa total a través del conteo de colonias y se evaluó la actividad enzimática en el suelo de xilanasas, amilasas, y celulasas. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que no existen diferencias significativas en la abundancia de bacterias, levaduras y hongos filamentosos entre los diferentes tipos de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
parches e interparches, sólo se observaron diferencias significativas en cada micrositio entre las abundancias de los microorganismos, en donde la abundancia de bacterias fue significativamente diferente de las levaduras y hongos filamentosos en los parches de *L. divaricata* ($p=0,0084$), en *B. retama* ($p=0,0022$) e interparches ($p=0,0073$). Los resultados de la actividad enzimática en el suelo fueron expresados en porcentajes de actividad, y los más altos de xilanasas y celulasas asociadas al suelo, se encontraron en el interparque (55-100%). Respecto de la actividad amilolítica, los datos obtenidos mostraron un porcentaje de actividad relativamente alto en los tres micrositios, oscilando entre el 60 y 100%. Se concluye que los porcentajes de actividad de cada una de las enzimas de suelo determinadas, no pueden correlacionarse con la abundancia de bacterias, y esto podría deberse a que si bien la abundancia de hongos filamentosos es baja en los micrositios, pueden ser una fuente importante de las enzimas hidrolíticas. Respecto de la biomasa, la abundancia de bacterias es significativamente mayor que la abundancia de hongos filamentosos en los tres micrositios.

P13: ABUNDANCIA MICROBIANA Y BACTERIAS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ASOCIADA A CANOPIA DE *BULNESIA RETAMA* Y *LARREA DIVARICATA*

Vega Avila A.D.¹ Toro M.E.¹, & Vazquez F¹.

¹ Instituto de Biotecnología – FI – UNSJ. Av. Lib. San Martín 1109 (Oeste) San Juan. vega_daniela06@yahoo.com.ar

La vegetación en los ecosistemas áridos está dominada por una estepa arbustiva xerófila, sammófila y halófila. Una de las familias dominantes de la estepa xerófila de la Provincia del Monte es la *Zigofiláceae* (plantas arbustivas). Dentro de esta familia se destacan especialmente las especies pertenecientes a los géneros *Bulnesia* y *Larrea*. Los microorganismos asociados a canopias de este tipo de vegetales, dada las temperaturas media y alto nivel de exposición, pueden presentar distribución y características particulares. Por otro lado, la determinación de la abundancia relativa de grupos microbianos y la detección de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de detritos vegetales, pueden correlacionarse con estudios posteriores sobre calidad de suelo asociados a estos vegetales. Los microorganismos son un recurso a partir del cual se pueden obtener enzimas como las xilanasas, amilasas, y celulasas las cuales son producidas por diversos géneros y especies de bacterias y hongos.

El objetivo del trabajo fue determinar la abundancia de microorganismos y las bacterias con actividad enzimática asociada con la degradación de detritos vegetales en la canopias de *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata* en los médanos de Caucete, San Juan. El

trabajo se realizó mediante la toma de muestras al azar en las canopias de las dos especies, midiendo biomasa total a través del conteo de colonias en medios de aislamiento. Luego se realizó el aislamiento de bacterias y se evaluó su actividad enzimática (xilanolítica, amilolítica, celulolítica) en placa con medios adecuados para la expresión de las enzimas estudiadas. Los resultados del análisis estadístico (ANOVA), realizado a los datos de abundancia de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, mostraron diferencias significativas en la población de bacterias asociadas a la especie *B. retama* con respecto a *L. divaricata* ($p=0,0001$). Los análisis en el nivel de canopia de *L. divaricata* mostraron que la abundancia de los hongos filamentosos fue significativamente mayor que la de bacterias y levaduras ($p=0,0123$). En la canopia de *B. retama* la abundancia de bacterias fue significativamente mayor que la de hongos filamentosos y levaduras, la cual fue nula ($p=0,0008$). Se determinaron cualitativamente que las bacterias aisladas de la canopia de *Larrea divaricata* presentaron actividad xilanolítica, amilolítica y celulolítica. Tanto en la canopia de *B. retama* como *L. divaricata* se detectaron bacterias poseedoras de más de una actividad hidrolítica.

P14: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE PSEUDOALTEROMONAS SP. P8 PRODUCTORA DE GLICOSIDASAS FRÍO-ACTIVAS

Alvarenga, A.E. (1), Cristóbal, H.A. (1) y Abate, C.M. (1, 2, 3)

(1) PROIMI - CONICET. (2) Fac. de Cs. Naturales e IML. (3) Fac. de Bqca., Qca. y Fcia. UNT, Av. Belgrano y Pje. Caseros. Tucumán, Argentina. E-mail: cabate@proimi.org.ar

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. Por lo tanto, la capacidad de degradar diversos substratos sería un atributo importante de las bacterias marinas. Las enzimas producidas por los organismos psicrófilos presentan una gran actividad específica a bajas y moderadas temperaturas y en general están asociadas con una elevada termosensibilidad, propiedades que pueden ser útiles en diferentes procesos industriales. Los estudios y el interés comercial de la mayoría de las enzimas producidas a partir de diferentes microorganismos han intensificado la búsqueda de nuevas especies como así también el desarrollo de su potencial tecnológico. La aplicación de enzimas y de microorganismos a la producción sostenible de químicos, biopolímeros, materiales y combustibles de fuentes renovables, definida como biotecnología industrial, ofrece grandes oportunidades para las industrias químicas y

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 farmacéuticas. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar fisiológica y molecularmente la cepa P8 aislada a partir de agua de mar correspondiente a la zona costera del Canal de Beagle (Punta Segunda, Ushuaia, Argentina). La cepa P8 fue desarrollada en medios mínimos conteniendo como fuentes de carbono papel, xilano y hemicelulosa (bagazo de caña de azúcar). Se evaluaron en placa la degradación de papel, hemicelulosa y xilano a 4 y 15 °C; determinando la presencia de actividades enzimáticas a través de un método cualitativo (Rojo Congo) que permitió observar halos de clarificación alrededor de las colonias. La caracterización bioquímica de la cepa P8 fue realizada a través de ensayos API20NE y crecimiento específico a 4 y 20 °C. Los ensayos moleculares fueron efectuados mediante análisis de restricción del ADN ribosómico 16S (ARDRA) y posterior secuenciación. La cepa P8 es un bacilo, Gram-negativo; fue seleccionada por degradar papel, xilano y hemicelulosa; determinando la presencia de las actividades: celulasa y xilanasa respectivamente. La cepa P8 mostró mayor actividad tanto celulolítica como xilanolítica a 8 y 20 °C. El patrón de bandas en el análisis de restricción permitió diferenciar la cepa P8 de otros géneros de microorganismos marinos. La identificación de la cepa P8 fue establecida dentro del género *Pseudoalteromonas*, del grupo *Proteobacteria*, subclase *gamma-proteobacteria*.

P15: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO EN LA RIZÓSFERA DE YERBA MATE (*Ilex paraguariensis* ST. HIL.)

Collavino, Mónica M.^{1,2}, Sansberro, P. A.², Mroginski, L. A.² y Aguilar, O Mario¹

¹Inst. de Bioq. y Biología Molecular, UNLP. ²Inst. de Botánica del Nordeste, UNNE.

e-mail de contacto: mcollavino@agr.unne.edu.ar

Las bacterias PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria) son capaces de solubilizar las formas no asimilables de fosfatos minerales presentes en el suelo mediante la producción de ácidos orgánicos y la quelación de óxidos de calcio, hierro o aluminio. Si bien estas bacterias se encuentran distribuidas en diferentes tipos de suelo, su establecimiento y competencia es afectado severamente por estreses tales como salinidad, pH y temperatura. Los suelos rojos misioneros, aptos para el cultivo de la yerba mate, son suelos ácidos cuyo uso se encuentra condicionado principalmente por la baja disponibilidad de fosfatos solubles a pesar del alto contenido de fósforo total. En este sistema, es probable que las plantas establezcan asociaciones rizosféricas con microorganismos solubilizadores de fósforo como estrategia para posibilitar su crecimiento. En este trabajo se analizó la diversidad de bacterias PSB presentes en la rizósfera de yerba mate con la finalidad

de seleccionar cepas adaptadas a suelos ácidos y capaces de solubilizar eficientemente fosfatos insolubles inorgánicos.

Para ello, a partir de muestras de suelo y de la rizósfera de plantas de yerba mate se estableció una colección de 250 bacterias con actividad solubilizadora seleccionadas en base a su capacidad de clarificar el medio ágar NBRIP por la solubilización del fosfato tricálcico. Los aislamientos PSB fueron analizados molecularmente mediante Rep-PCR utilizando los oligonucleótidos Box1, Rep y Eric encontrando que el análisis Eric-PCR fue más eficiente para agrupar y eliminar la redundancia de los aislamientos. Como resultado, se obtuvieron 48 perfiles Rep representativos la mayoría de ellos rizosféricos (71%). Los perfiles seleccionados fueron caracterizados mediante un análisis cuantitativo de la actividad solubilizadora en medio líquido. Se seleccionaron 24 aislamientos altamente eficientes en la solubilización de fosfato tricálcico, los mismos fueron identificados mediante el análisis de la secuencia del gen ADN_r 16S. Las bacterias solubilizadoras aisladas pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Exiguobacterium* y *Erwinia*. Asimismo, se realizaron ensayos de inoculación con los aislamientos *Enterobacter* sp. en plantines de poroto crecidos en medio con fosfato tricálcico como única fuente de fósforo. Se observó que en las plantas inoculadas con uno de los aislamientos ensayados, R4A, se produce un incremento significativo en el peso seco aéreo y radical, la superficie foliar total y los niveles de fósforo total en hoja en relación con la planta control sin inocular. Estos resultados implican que la presencia de la bacteria R4A en la rizósfera promueve el crecimiento y la capacidad de captación de fósforo en plantas de poroto en medio con bajos niveles de fósforo soluble.

P16: ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE AGUA Y SUELO DE LOS HUMEDALES LAGUNAS DE GUANACACHE

Riveros, N. (1); Carrera, S. (1); Vergara, C. (1); Augusto M. (2); Varela, P. (1)

(1) Instituto de Biotecnología- Fac. de Ingeniería – Universidad Nacional de San Juan.- Av. Lib San Martín 1109 (oeste)

(2) Instituto de Ciencias Básicas. Fac. de FFHA – Universidad Nacional de San Juan.- Av. Lib San Martín 1109 (oeste). E-mail: emilceriverosg@yahoo.com.ar

El Humedal Lagunas de Guanacache es el séptimo Sitio Ramsar argentino incluido en la Lista de Humedales de Importancia Internacional. Recibe productos liberados por la comunidad rural de la zona, que por volcado directo o por fenómenos atmosféricos o hidrobiológicos pueden contaminar las aguas superficiales y subterráneas y los sedimentos del cuerpo de agua. Puede detectarse bacterias patógenas, las que representarían un riesgo para la

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
salud humana. La determinación de bacterias coliformes fecales brinda información respecto de contaminación fecal proveniente de animales de sangre caliente, y es de importancia por la incidencia que la calidad del recurso hídrico tiene sobre el ecosistema y en la salud de la comunidad, que cuenta con un sistema precario de potabilización. Objetivos: Analizar la calidad microbiológica del agua y suelo del *Humedal Lagunas de Guanacache*. Metodología: Se analizaron cinco sitios en estación fría y cinco en estación cálida. Las muestras de agua fueron tomadas según normas de APHA. Las muestras de suelo fueron tomadas de 1 a 10cm de profundidad y de sitios que habiendo estado bajo el agua, se encuentren fuera del cuerpo de la misma. Se investigó bacterias coliformes fecales mediante la técnica de NMP (límites de aceptación del 95%) por fermentación en tubos múltiples con cinco repeticiones sobre medio Brila, y el aislamiento sobre placas de medio Endo C. Resultados y Discusión: Los resultados obtenidos muestran en invierno en agua valores de 9×10^3 bacterias / 100mL y en suelo de hasta $\geq 16 \times 10^3$ bacterias /100 mL, y en verano, en agua de 9×10^2 bacterias / 100mL, y en suelo 24×10^2 bacterias / 100mL, y la presencia en ambos casos de *E. coli*. La población de bacterias coliformes en las muestras de suelo tomadas en la rivera del cauce, indicaría que la zona podría ser reservorio de estos microorganismos. Además se ha observado que el NMP de bacterias coliformes fecales es mayor en la estación invernal lo que podría deberse a que en verano el caudal que ingresa a las lagunas es mayor, lo que ocasionaría una mayor dilución del material aportado por la actividad humana. Los valores obtenidos en este análisis preliminar, muestra la conveniencia de continuar con el trabajo tratando de correlacionar las variables que intervienen.

P17: *Escherichia coli* VEROCITOTOXIGÉNICO (VTEC) AISLADO DEL MEDIO AMBIENTE DE TAMBOS

Fernández, D. (1, 2), Sanz, M. E (1), Padola, N. L (1), Parma, A. E. (1, 3)

(1) Área de Inmunoquímica y Biotecnología, CONICET (2), CIC (3). Dpto. SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil.

E-mail: dfer_inm@vet.unicen.edu.ar

VTEC causa en el hombre colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico mediante la producción de verocitotoxinas (VT1 y VT2), y factores de virulencia adicionales como intimina (codificada en el gen *eae*), enterohemolisina (gen *ehxA*), y una adhesina (Saa) en cepas *eae*-. Esta bacteria se encuentra en el intestino bovino y es eliminada con las heces. La transmisión a humanos ocurre por consumo de alimentos contaminados, por contacto directo con animales y

personas portadoras, o por exposición al medio ambiente contaminado. La supervivencia de VTEC en el medio es importante en la persistencia y diseminación entre animales y en la transmisión al hombre.

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar feno-genotípicamente VTEC del medio ambiente de 5 tambos de la Cuenca Mar y Sierras.

De marzo del 2006 a abril del 2007 se tomaron 110 muestras, las cuales incluían: agua, sedimento de bebederos y alimento residual de diferentes categorías de animales, suelo de diferentes potreros, hisopados de baldes de guachera y sustituto lácteo o leche residual de los mismos, silo de maíz, efluentes, hisopados de pezoneras, filtros de ordeño y leche de tanque.

Las muestras se cultivaron en agua peptonada y caldo MacConkey; se sembraron en agar MacConkey y un subcultivo de la zona de crecimiento confluyente en caldo Luria Bertani se utilizó para extracción de ADN por lisis celular en caliente. Se utilizó PCR multiplex para identificar los genes *vt1* y *vt2*. A las muestras *vt+* se les realizó PCR para detectar *eae-γ* (específico de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 O157). Para la caracterización de los aislamientos se utilizó PCR multiplex (*vt1*, *vt2*, *eae*, *ehxA*, *saa*). El antígeno O se determinó por microaglutinación en placa.

Se detectaron 12 muestras VTEC+ (11%) en 3 de 5 tambos: 3 fueron de pezoneras, 2 de suelo, 2 de alimento y 1 de agua de la recría; 2 de balde y 1 de suelo de la guachera; y 1 de sedimento de bebedero de vacas. Ninguna fue *eae γ+*. Se caracterizaron 6 cepas VTEC: una O26 (*vt1+ eae+ ehxA+*) aislada de balde de guachera, dos O116 (*vt2+*) aislada de alimento y suelo de recría y una no tipable (*vt2+*) aislada de agua de recría. Una cepa (*vt2+ saa+ ehxA+*) aislada de pezonera presentó reacción cruzada con los antiseros O157 y O116 y una de las cepas (*vt1+*) aisladas de suelo de guachera mostró características autoaglutinantes. La amplia distribución de VTEC en el ambiente de tambos permite suponer un posible hábitat no animal para serogrupos potencialmente patógenos para el hombre, siendo un importante riesgo para la contaminación de la leche y personal del establecimiento.

SECCIÓN 2: BIORREMEDIACIÓN Y BIOCONTROL

P18: ESTUDIOS COMPARATIVOS ENTRE POBLACIONES ARGENTINAS Y EXTRANJERAS DE *Trichoderma harzianum* CON CAPACIDAD BIOCONTROLADORA.

V. Barrera¹, M. C. Martínez², L. Gasoni¹ y A. Romero³.
¹IMYZA, INTA, CC25 (1712) Castelar, Buenos Aires. ² Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, CC25 (1712) Castelar, Bs As. ³ FCEyN UBA, DBBE, Ciudad Universitaria, Pab. II, 4º piso. vbarrera@cnia.inta.gov.ar

Trichoderma harzianum es el estado anamórfico de especies del orden *Hypocreales* (Ascomycetes). Es un organismo saprófito, micoparásito facultativo habitante del suelo. El género *Trichoderma* está siendo ampliamente estudiado en cuanto a sus características genómicas por su capacidad en el control biológico de hongos fitopatógenos del suelo. Su actividad biocontroladora se basa en la producción de metabolitos con actividad fungistática. Con el objetivo de comparar las características morfogenéticas de las poblaciones de *T. harzianum* provenientes de distintos orígenes geográficos se estudió una colección de aislamientos provenientes de suelos de Argentina, España, India, Reino Unido y Colombia. Sobre esta colección se han llevado a cabo estudios de

caracterización mediante la aplicación de técnicas morfológicas, fisiológicas y moleculares. Los caracteres morfológicos analizados se basan en mediciones morfométricas de los conidios y diámetro de hifas. Se midió crecimiento, esporulación y alcalinización del medio de cultivo líquido utilizando distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Se realizaron amplificaciones de DNA genómico mediante RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) y UPPCR (Universal-Primed PCR). Los datos obtenidos fueron analizados por técnicas de agrupamiento aplicando el método de UPGMA utilizando el índice de asociación de Jaccard con NTSYSpc 2.02. Con las distintas técnicas empleadas se encontró que los caracteres fisiológicos y moleculares permitieron establecer agrupamientos basados en las diferencias geográficas, mientras que las características morfológicas permitieron detectar alta variabilidad intraespecífica.

P19: EFECTO DE LOS METALES PESADOS SOBRE LA MOVILIDAD BACTERIANA

Matías R. Barrionuevo y Diana L. Vullo

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

En los últimos años, diversos autores han puesto énfasis en la necesidad del estudio de la movilidad bacteriana y el fenómeno de quimiotaxis hacia los xenobióticos más comunes que contaminan los cursos de agua, con miras hacia el desarrollo de nuevas formas de depuración de los mismos. Se ha destacado, además, la importancia de la movilidad en la formación de biopelículas que facilitan la biodisponibilidad de los elementos contaminantes del suelo para su posterior degradación.

Además de hidrocarburos y pesticidas, los cursos de agua son frecuentemente contaminados con una variedad de metales provenientes de las actividades industriales y cuya presencia altera la distribución de la comunidad microbiana en los mismos debido a sus efectos tóxicos para muchos de sus integrantes.

En este trabajo se plantea el estudio de la movilidad bacteriana como ensayo preliminar para la determinación del efecto de los metales pesados sobre la quimiotaxis de dos cepas autóctonas, *Pseudomonas veronii* 2E y *Delftia acidovorans* AR, en presencia de Zn, Cu, Cd y Cr, metales de alta relevancia ambiental. Dichas cepas poseen alta capacidad de retención de Cu(II), Cd(II) y Zn(II) y de eliminar Cr(VI) en sistemas acuosos.

Los ensayos de movilidad se realizaron bajo diferentes condiciones de cultivo, siguiendo las siguientes estrategias: 1. Los microorganismos se preincubaron en presencia de los metales, determinando su movilidad en medio PYG suplementado con agar (3g/L) y concentraciones crecientes de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Cr(VI) por debajo de sus respectivas concentraciones inhibitorias mínimas. 2. Los microorganismos se preincubaron en presencia de metales, para luego evaluar su movilidad sin agregado de metales y 3. Los microorganismos no tuvieron una exposición previa a metales y luego se evaluó su movilidad con concentraciones crecientes de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Cr(VI).

Los resultados obtenidos para *Pseudomonas veronii* 2E indican que el Cr(VI) en concentraciones entre 0,3 y 0,4 mM afecta tanto la movilidad, como la aerotaxis, mientras que con el resto de los metales ensayados no se aprecian diferencias significativas con respecto al control. Estudios previos de la especiación de Cr en cultivos de *Pseudomonas veronii* 2E sugieren el uso del Cr(VI) como aceptor de electrones, siendo esta una posible explicación para la alteración de la movilidad evidenciada.

Por su parte, *Delftia acidovorans* AR, presenta alteraciones de la movilidad en presencia continua de todos los metales excepto Cr(VI), para el cual no

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 presenta alto nivel de tolerancia. Dichas alteraciones se traducirían en un efecto de agregación bacteriana y una disminución en la velocidad de desplazamiento.

P20: CRECIMIENTO EN MEDIO SINTÉTICO DE DOS ESPECIES DE HONGOS AÉREOS CON POTENCIAL UTILIDAD EN LA BIORREMEDIACIÓN DE URANIO.

S. Cavalitto^{3,4}, R. Gargarello^{3,4}, D.E. Di Gregorio^{1,2,4*}, J.O. Fernández Niello^{1,2,4}, H. Huck^{1,2}, H. Somacal², G. Curutchet^{2,4}, A. Pardo^{3,4}.

¹ Departamento de Física, Comisión Nacional de Energía Atómica, Av. Gral. Paz 1499, 1650 San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina. ² Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Gral. San Martín, Alem 3901, 1653 Villa Ballester, Provincia de Buenos Aires, Argentina. ³ Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Saenz Peña 352. Bernal. Provincia de Buenos Aires, Argentina. ⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Metal uptake by microbial biomass has been extensively investigated to remove metallic and radionuclide pollutants from aqueous solutions. This process has special interest in the purification of large volumes of wastewater with low concentrations of metals since it is difficult or expensive to accomplish it by conventional metal-removal processes like chemical precipitation, reverse osmosis, membrane separation and ion exchange. In this work we present results of stoichiometry and kinetic of growth of two low pH and highly uranium resistant air-borne fungi, which were isolated from contaminated bacterial cultures. Preliminary uranium sorption by the two fungal species was measured by means of gamma ray spectroscopy. Results show good growth in synthetic medium with glucose and ammonia as carbon and nitrogen source respectively. Typical oxidative metabolism of carbohydrates was found. In vivo uptake of the radionuclide was negligible, but dry biomass biosorption shows good performance. Strains show good potential for bioremediation.

P21: BIOCONTROL DEL QUEMADO DEL ARROZ MEDIANTE EL USO DE CEPAS DEL HONGO *Trichoderma harzianum*

VF Consolo¹, GL Salerno¹, CI Mónaco² y CA Cordo².
¹Centro de Investigaciones Biológicas-Fundación Para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Vieytes 3103, 7600 Mar del Plata.²Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 60 y 119, La Plata, Argentina. faconsolo@fiba.org.ar

El “quemado” o “brusone” causado por el hongo *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc. estado anamórfico de *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. es una de las principales enfermedades que ataca a los cultivos de arroz. En Argentina, la presencia del patógeno ocasiona pérdidas todos los años. La forma más usual de controlar la enfermedad es mediante el uso de fungicidas preventivos. Una estrategia complementaria y ambientalmente favorable es la posibilidad de realizar control biológico del patógeno. Entre los hongos antagonistas las especies del género *Trichoderma* son exitosamente utilizadas para el biocontrol de patógenos de crucíferas, solanáceas y algunas gramíneas. Se ha postulado que los hongos del género *Trichoderma* pueden reducir el nivel de daño de las enfermedades en el cultivo del arroz pero hasta el presente no se ha descrito el efecto de *Trichoderma* sobre el hongo *P. grisea*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente tres cepas de *T. harzianum* y evaluar su potencialidad como agente de biocontrol del hongo *P. grisea*. Mediante la técnica de UP-PCR y utilizando dos pares de cebadores fue posible distinguir dos haplotipos diferentes (A y B). Se realizaron cultivos duales *in vitro* en todas las combinaciones entre las cepas de *Trichoderma* T5, T10 y T11 y 10 aislamientos de *P. grisea*. Se determinó que las tres cepas del antagonista inhibieron el crecimiento micelial de *P. grisea* entre un 27 y un 55%. El haplotipo A presentó únicamente una interacción de tipo B2 con los aislamientos de *P. grisea* ensayados, mientras que el haplotipo B presentó alternativamente interacciones de tipo B1 y B2 con *P. grisea*. Se están llevando a cabo estudios de interacción *Trichoderma-Pyricularia in vivo* para determinar si existe una reducción en la infección de plantas de arroz susceptibles al quemado.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
P22: OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE TRABAJO PARA LA ELIMINACIÓN DE METALES DE SISTEMAS ACUOSOS POR TRATAMIENTO BIOLÓGICO: PARECE FÁCIL, PERO NO LO ES.

M.A.Daniel, H.Ceretti, S.Ramírez, A. Zalts y D.L.Vullo
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

La remoción y recolección de metales como el Cd, Zn y Cu de efluentes industriales constituye una importante medida para la protección del ambiente. Los microorganismos pueden adaptarse a la presencia de metales desarrollando diversos mecanismos de tolerancia, tales como la biosorción. El interés en dicho mecanismo radica en la posibilidad de desarrollar técnicas de biorremediación de bajo costo, ya que presenta una cinética rápida y no requiere un metabolismo microbiano activo.

El objetivo del presente trabajo es optimizar los parámetros de funcionamiento de un biorreactor donde bacterias inmovilizadas retengan Cd(II) presente en un efluente modelo por el mecanismo de biosorción. En base a los resultados de trabajos anteriores se seleccionó a *Pseudomonas veronii* 2E, aislada a partir de muestras del Río Reconquista. Dicha cepa presenta altos porcentajes de retención del metal y posee la capacidad de fijarse a diversas superficies poliméricas. Se diseñaron dos biorreactores en columnas de diferentes volúmenes de trabajo, 50mL y 200mL, siendo aireación, homogeneización, masa celular, control de temperatura (32°C), tiempos de incubación y metodología de muestreo, las condiciones experimentales a adecuar para su funcionamiento.

Dicho funcionamiento consta de dos etapas sucesivas:

- **Inmovilización celular:** según la columna se utilizaron 0,27g o 0,71g de cubos de 1cm de arista de espuma de poliuretano (esponja Mortimer®) como relleno. El inóculo de ambos reactores correspondió al 1% del volumen final. Los controles realizados fueron: entrada y salida de aire, temperatura, homogeneización, estructura de la matriz, tiempo de incubación y densidad celular. Se realizaron cambios periódicos del medio de cultivo para lograr un máximo rendimiento en biomasa adherida. Luego de cuatro lavados sucesivos con agua (18 MΩcm, Millipore) se han inmovilizado hasta 0,13g biomasa/ g matriz.

- **Proceso de biosorción:** se cargó cada columna con el efluente modelo (0,5mM Cd(II) en 10mM buffer HEPES pH=7,5), determinando Cd total en solución, por voltamperometría de preconcentración electrolítica, inicialmente y luego de 24 hs. de incubación. Se repitió el procedimiento en tres ciclos sucesivos. Los cambios registrados en la concentración de Cd pueden interpretarse en función de su retención tanto por las células inmovilizadas como por las presentes en suspensión debido a su desprendimiento. La masa celular se controló tanto en la matriz como en las

muestras obtenidas en cada ciclo para la estimación de la eficiencia del proceso.

P23: CULTIVOS MIXTOS DE BACTERIAS AUTÓCTONAS EN LA BIOTRANSFORMACIÓN DE Cr(VI)

Luciana Garavaglia¹, Marcela Ferrero² 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. PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros (T4001MVB) S.M. Tucumán.

Numerosas actividades industriales utilizan el Cr en el proceso de producción, por lo tanto es común encontrar en sus efluentes la especie Cr(VI). Esta especie de cromo es altamente tóxica, por poseer propiedades mutagénicas y carcinogénicas. En tratamientos biológicos de dichos efluentes pueden utilizarse microorganismos con capacidad de biotransformar Cr(VI) en Cr(III), especie de estado de oxidación de menor riesgo ambiental. Dependiendo de las condiciones fisicoquímicas ambientales, es posible insolubilizar el Cr(III) como Cr(OH)₃, facilitando su remoción.

El objetivo del presente trabajo es utilizar cultivos mixtos para mejorar la eficiencia de la eliminación de Cr(VI) en sistemas acuosos. Para ello, contamos con tres cepas aisladas de ecosistemas de conocidos niveles de contaminación con metales e identificadas por secuenciación del gen 16S r-ARN, *Pseudomonas veronii* 2E, *Klebsiella oxytoca* P2 y *Klebsiella ornithinolytica* 1P. Dichas cepas experimentaron resistencia a altas concentraciones de Cr(VI) y a su vez su crecimiento provoca una disminución en los niveles de Cr(VI) en cultivos en lote. Se evaluó la remoción de Cr(VI) en sistemas en lote con cultivos mixtos dobles y triple. La concentración inicial de Cr(VI) en el medio de cultivo fue de 0,05 mM (2,6 mg/L), cercana a las encontradas en los efluentes industriales de rutina. La composición a lo largo del proceso de cada uno de los cultivos mixtos se monitoreó por la técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Se logró mejorar la eficiencia removiendo un máximo de 75% de Cr(VI) a finales de la fase exponencial (6 hs.), mediante la acción conjunta de *Pseudomonas veronii* 2E y *Klebsiella ornithinolytica* 1P, en cuyo cultivo coexistieron ambas cepas en cada fase de crecimiento. En este caso la concentración final de Cr(VI) alcanzada se encuentra dentro de los valores recomendados por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. para la descarga de efluentes.

Como resultado de las otras combinaciones *Klebsiella oxytoca* P2 - *Klebsiella ornithinolytica* 1P, *Pseudomonas veronii* 2E - *Klebsiella oxytoca* P2, y *Pseudomonas veronii* 2E - *Klebsiella oxytoca* P2 -

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
Klebsiella ornithinolytica 1P no se obtuvieron mayores rendimientos en comparación a los cultivos puros previamente ensayados. Además se observó la predominancia de una de las especies frente a las otras.

La utilización del cocultivo *Pseudomonas veronii* 2E - *Klebsiella ornithinolytica* 1P representa una alternativa interesante para la continuación del estudio en el diseño de un proceso de remediación eficiente de efluentes contaminados con Cr(VI).

P24: PROTECCIÓN DE PLANTAS DE SOJA CONTRA DAMPING-OFF A TRAVÉS DE BACTERIZACIÓN PREVIA DE SEMILLAS.

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

El damping-off es una enfermedad causada por un complejo de varias especies de hongos habitantes del suelo o las semillas sembradas. Puede causar mermas en el rendimiento del cultivo de soja si la infección es generalizada, este escenario es posible cuando la siembra es temprana y las condiciones climáticas de temperaturas bajas y alta humedad propician el desarrollo de los agentes etiológicos.

En ensayos *in vitro* previos, de selección de cepas bacterianas biocontroladoras aisladas de suelos agrícolas, utilizamos una cepa de *Pythium ultimum*, especie que forma parte del complejo de damping-off. Seleccionamos tres cepas bacterianas para realizar ensayos en maceta. Las cepas utilizadas fueron, *B. amyloliquefaciens* BNM340 cepa con capacidad de liberar al medio de cultivo sustancias degradadoras de las paredes celulares (SDPC) tales como las iturinas; *Pseudomonas putida* BNM296 productora de sideróforos, antibióticos como pioluteorina y pirrolnitrina y algún lipopéptido aún no identificado SDPC y *P. putida* BNM297 productora de sideróforos, ácido cianhídrico y lipopéptidos degradadores. Inoculamos semillas de soja con una suspensión bacteriana de 5.10⁵ bacterias/semilla y estas semillas fueron sembradas en macetas con vermiculita infestada con 1.10⁴ propágulos/gramo de sustrato. Se registró la emergencia una vez por semana y luego de 20 días de desarrollo en condiciones controladas, las plantas fueron evaluadas a través de la expresión de síntomas de enfermedad. Para ello se utilizó un índice de daño (ID) que ponderó la severidad de los síntomas. El ensayo se repitió en tres oportunidades con resultados similares todas las veces.

Las plantas de soja enfrentadas a *P.ultimum* provenientes de semillas inoculadas con *B. amyloliquefaciens* BNM340 casi no fueron afectadas por damping-off (ID:19%). Las plantas provenientes de semillas inoculadas con *P. putida* BNM296 también fueron protegidas del patógeno pero de una forma

menos notoria. (ID: 45%), mientras que la cepa de *P. putida* BNM297 falló como biocontroladora en las condiciones ensayadas (ID: 93%).

Los resultados obtenidos para la cepa *B. amyloliquefaciens* BNM340 y la cepa *P. putida* BNM296 son muy alentadores, ubicándolas como buenas candidatas para formar parte de futuros inoculantes biológicos de semillas. Se sabe que muchas veces los efectos antagonistas encontrados no se correlacionan con los efectos biocontroladores, las cepas que no muestran capacidad antagonista en placa luego resultan ser excelentes biocontroladores o al revés. En el caso de BNM297 los resultados negativos de antagonismo en placa, coincidieron con los resultados en maceta ya que no logró controlar la enfermedad.

P25: SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA CONTROL BIOLÓGICO DE LA PUDRICIÓN GRIS

María Cristina Nally¹, Virginia Mercedes Pesce¹, María Eugenia Toro¹, Fabio Vazquez¹ y Lucía Inés Castellanos de Figueroa²

¹ Instituto de Biotecnología- FI- UNSJ. Avda. Lib. Gral. San Martín 1109 (Oeste)-(5400)- San Juan. e-mail: cristinanally@yahoo.com.ar

² PROIMI. Tucumán

Introducción: En la actualidad la detección de microorganismos productores de sustancias inhibitorias hacia hongos fitopatógenos se ha transformado en un campo muy activo de investigación. Microorganismos antagonistas de variados tipos pueden dar origen a sustancias específicas o bien constituir la base de nuevos biopesticidas. Actualmente están realizando investigaciones con levaduras ya que las mismas son capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Esta clase de estudios constituyen un valioso aporte en la búsqueda de nuevas alternativas de manejo de enfermedades y plagas en los cultivos comerciales. El **Objetivo** de esta investigación, es avanzar en el control biológico de la enfermedad "Pudrición gris" en uva (*Vitis vinifera*), causada por *Botrytis cinerea*, mediante la utilización de levaduras antagonistas. **Materiales y Métodos:** En una primera etapa, el trabajo ha consistido en la selección de levaduras antagonistas a *B.cinerea*. Muestras de uva infectadas con el hongo en estudio fueron suspendidas en solución fisiológica (0.7 % Cloruro de sodio) con la finalidad de aislar *B.cinerea* y levaduras en placas de Czapeck agar y YEPD agar (Yeast Extract- Peptone-Dextrose), respectivamente. También se ensayaron cepas de levaduras del Instituto de Biotecnología, UNSJ. La selección de levaduras fue realizada mediante pruebas de antagonismo *in vitro*. Cultivos puros de *B.cinerea* fueron enfrentados a levaduras en placas de Petri (Czapeck- Extracto de Levadura- Agar). **Resultados:** Los resultados obtenidos se consiguieron tanto con levaduras aisladas de ambientes enológicos y asociadas a los distintos estados de la fermentación, como con aislamientos provenientes de uvas

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 infectadas con *B. cinerea* y otros géneros de hongos filamentosos. De los 234 aislamientos de levaduras, 97 presentaron actividad antagonista a *B.cinerea*. Estas cepas de levadura evidenciaron un efecto positivo en detener el crecimiento del hongo fitopatógeno en estudio. **Conclusión:** El método utilizado permite detectar microorganismos antagonistas a *B.cinerea*. Los resultados sugieren que el aislamiento de levaduras autóctonas, las cuales coexisten con hongos filamentosos en la superficie de la uva o áreas dañadas por estos, puede resultar aptas para su empleo como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos.

P26: RELACIONES ANTAGÓNICAS ENTRE CEPAS DE LEVADURAS KILLER Y *Botrytis Cinerea* Pers. ex Fr.

María Cristina Nally¹, Virginia Mercedes Pesce¹, Yolanda Paola Maturano¹, María Eugenia Toro¹, Lucía Inés Castellanos de Figueroa² y Fabio Vazquez¹

¹ Instituto de Biotecnología-FI-UNSJ. Avda. Lib.Gral.San Martín1109 (Oeste)-(5400)-San Juan.e-mail:cristinanally@yahoo.com.ar

² PROIMI.Tucumán.

Introducción: El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. se combate con fungicidas en cultivos de uva. Sin embargo, este patógeno ha desarrollado resistencia a las dicarboximidas, lo cual cada vez hace que sean menos efectivas. Agentes de biocontrol podrían ser un componente importante y efectivo en el control de *B.cinerea*. Hongos, bacterias y levaduras son utilizados como agentes de biocontrol. Algunas levaduras secretan exotoxinas (proteínas o glicoproteínas) que producen desequilibrios fisiológicos en células sensibles poseedoras de receptores específicos, eliminándolas. Estas toxinas, han sido definidas como toxinas *killer*. **Objetivo:** Determinar si existe relación entre la presencia de fenómeno *killer* en cepas de levaduras y la disminución del crecimiento de *B.cinerea*, en condiciones *in vitro*. **Materiales y Métodos:** Se trabajó con 210 cepas de levadura y una cepa de *B.cinerea*, pertenecientes al Cepario del IBT.UNSJ. La actividad *killer* se evaluó en placas a partir de interacciones cruzadas, sembrando las cepas ensayadas sobre medio YEPD-Agar-MB bufferizado con citrato fosfato 0.1M a pH 4.6 y como *lawn* (3×10^6 cel/ml). Las cepas fueron incubadas a 25°C, durante 72 horas. La presencia de levaduras *killer* se determinó mediante la presencia de halos de inhibición alrededor de la misma. Pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron en placas (Czapeck-Extracto de levadura agarizado, pH 5) las cuales fueron incubadas a 25°C, durante 10 días y en oscuridad. En cada placa se sembró el hongo en el centro y 4 levaduras en forma equidistante. La inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno se determinó cuando su radio micelial era menor al del control positivo (*B.cinerea* sembrada sola en el medio de la placa). **Resultados:** De las 210

levaduras en estudio, 83 fueron *killer* sobre alguna de las levaduras con las cuales se la contrastó, de estas, 63 aislamientos pudieron inhibir el crecimiento de *B.cinerea*. El 31.74% de las levaduras que inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno pudo eliminar entre 23.8 y un 64.76% de las levaduras sobre los cuales se ensayo la actividad *killer*. Solo el 3.3% del total de las levaduras estudiadas no produjo toxinas *killer* pero si inhibió a *B.cinerea*. Conclusión: Los resultados expuestos sugieren que la presencia del fenotipo *killer* en levaduras autóctonas puede ser uno de los factores que influyen en la disminución del crecimiento de *B.cinerea*.

P27: ESCOBAJO COMO SUSTRATO DE HONGOS CAUSANTES DE PUDRICIÓN BLANCA PARA LA PRODUCCIÓN DE LIGNOCELULASAS Y DEGRADACIÓN DE COLORANTES

Papinutti L, Levin L, Mouso N, Forchiassin F.

Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Buenos Aires, 1428. leandru@bg.fcen.uba.ar

Los hongos causantes de pudrición blanca son un grupo fisiológico capaz de degradar todos los componentes de la madera hasta su completa mineralización. En el primer paso de este proceso están involucradas enzimas extracelulares del tipo hidrolasas y oxidasas o peroxidasas. Celulasas y xilanasas corresponden al primer tipo de enzimas mientras que las ligninasas, lacasa y manganeso peroxidasa son del segundo. Todas estas enzimas tienen importancia industrial, las ligninasas en particular por su falta de especificidad son capaces de degradar diversos compuestos xenobióticos. La fermentación en estado sólido es la técnica más promisoría para su producción a gran escala, además los residuos sólidos residuales luego de la extracción de enzimas pueden ser utilizados en varios procesos: biorremediación, fertilización, alimento para animales, etc. En este trabajo se cultivaron cuatro cepas de hongos causantes de pudrición blanca: *Fomes sclerodermeus*, *Stereum hirsutum*, *Coriolus versicolor* f. *antarcticus* y *Trametes trogii* para estudiar el crecimiento y producción de lignocelulasas usando como sustrato escobajo, residuo de la industria vitivinícola. Se probó además la posibilidad de uso del residuo sólido (escobajo + micelio) en biorremediación de colorantes. Las mayores pérdidas de peso seco fueron producidas por *S. hirsutum*, superando el 40%. Todas las cepas produjeron las actividades enzimáticas medidas. Se alcanzaron altos niveles de ligninasas con *C. versicolor* f. *antarcticus* a los 40 días de cultivo. *S. hirsutum* dio muy buenas actividades celulasa y xilanasas (60 ds), aunque *T. trogii* fue el mejor productor de xilanasas a los 20 días. Se utilizaron los colorantes xilidina, cristal violeta, RBBR, índigo

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 carmín, verde de malaquita y azure B, en una relación de 1 g (peso fresco) del residuo sólido y 10 ml del colorante 100 µM, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a las λ máximas para cada colorante. *C. versicolor* f. *antarcticus* mostró la mayor decoloración en coincidencia con las mayores actividades lignolíticas detectadas. Este sistema tiene buenas perspectivas de uso en biorremediación de efluentes coloreados por degradación y/o adsorción al residuo.

P28: ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENICA DE LAS PROTEÍNAS S-LAYER DE *Bacillus sphaericus* 2362

Mariano Prado Acosta, Sandra M. Ruzal y Carmen Sánchez Rivas

Departamento de Química Biológica. Facultad Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria Pabellón II. 4º piso. (1428) Buenos Aires. Argentina.

Las proteínas S-layer están presentes en especies de distintos géneros bacterianos tanto de Gram positivas como de Gram negativas así como también en Archaea. Son arreglos monomoleculares cristalinos de una única proteína o de una glicoproteína que se auto ensamblan a una forma multimérica. Estas cubren la superficie entera de la célula representando hasta el 15% de las proteínas.

Bacillus sphaericus es un microorganismo gram positivo esporoformador muy variable, pudiéndose distinguir 5 grupos de homología (I a V) y siendo las del grupo II las variables que presentan características entomopatogénicas. Esta se debe esencialmente a la formación de inclusiones proteicas durante el proceso de esporulación. Las propiedades insecticidas son muy específicas para larvas de ciertas especies de mosquitos, en especial las del género *Culex sp*, y algunas especies de *Anopheles*.

Durante el crecimiento vegetativo, su pared celular se recubre de una envoltura de proteínas S-layer. En este trabajo se analizó su posible actividad larvicida.

La proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 fue purificada y su pureza analizada en geles de SDS-PAGE. Se determinó mortalidad de larvas de *Culex sp* en estadios tempranos III-IV y V. Con una concentración de proteínas de 4 mg/ml, se observó una alta mortalidad de larvas que alcanzan el 100% cuando se utilizan estadios tempranos y del 80 % en estadios más tardíos. También se comprueba un efecto sinérgico entre las proteínas S-Layer y las esporas del mismo microorganismo: en condiciones donde cada una por separado logra una mortalidad menor al 20%, juntas alcanzan un 75% de mortalidad. La S-layer se agregaría a la lista de toxinas de fase vegetativa presentes en este micro-organismo, lo que indicaría que *B. sphaericus* sería un bioinsecticida en todas las etapas de su crecimiento.

Esta característica convierte a las proteínas S-layer en una nueva herramienta de gran interés para el control biológico de ciertos insectos como los mosquitos,

vectores de diversas enfermedades que afectan al hombre.

P29: RESISTENCIA A METALES PESADOS DE LEVADURAS AISLADAS DEL RÍO AGRIO Y EL LAGO CAVIAHUE: AMBIENTES ACUÁTICOS ÁCIDOS DE ORIGEN VOLCÁNICO.

G. Russo^{1*}; D. Libkind¹; M. Gadanho²; M.R. van Broock¹.

1Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, CRUB, Universidad Nacional del Comahue UNComa, Bariloche, Argentina – INIBIOMA – CONICET. 2Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT-UL), Lisboa, Portugal

*grusso@crub.uncoma.edu.ar

Actualmente el campo de la biotecnología fomenta el estudio de la diversidad microbiana presente en ambientes extremos. Esto se debe a que dichos microorganismos podrían poseer características fisiológicas útiles para su utilización en procesos biotecnológicos de interés (bioremediación, bioindicadores, etc.). En el caso de ambientes acuáticos ácidos, la información disponible acerca de biodiversidad microbiana es escasa y se relaciona principalmente con bacterias y algas. Los ambientes acuáticos ácidos se caracterizan por la presencia de altas concentraciones de metales pesados, considerados en su mayoría tóxicos para el medioambiente. El río Agrío y el lago Caviahue (Provincia de Neuquén) conforman un ambiente acuático ácido de origen volcánico que presenta valores de pH desde 1,5 hasta 6,5 a lo largo de un trayecto de 25 km. En esta presentación reportamos el aislamiento e identificación de 28 especies de levaduras. Siete de ellas fueron sometidas a análisis de resistencia a los metales: Cu, Ni, Zn, Li, Co, Mg y Mn, obteniéndose las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Los valores de CMI obtenidos para cepas de una misma especie fueron similares, lo que sugiere que el grado de tolerancia a metales pesados sería una característica especie-específica de las levaduras analizadas. El cobre y el níquel resultaron los metales más nocivos a valores máximos de CMI de 0,2 g L⁻¹. Por el contrario, el magnesio y el manganeso mostraron CMI superiores a los 25 y 50 g L⁻¹ respectivamente. Las especies *Cryptococcus* sp. 1 y *Cryptococcus* sp. 2, ambas aisladas de los sitios más ácidos (pH 1.8 a 2.2), evidenciaron tolerancia a metales pesados con valores de CMI, desde 0.2g.L-1 (Cu), hasta 50 g. L-1 (Mg). Las levaduras aisladas de ambientes acuáticos ácidos presentan características fisiológicas únicas como resultado de la adaptación al ambiente que habitan. La tolerancia a metales pesados por ejemplo, resulta de interés biotecnológico por su potencial utilización en procesos de bioremediación.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
P30: *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Hypocreales): PRIMER REGISTRO EN PLANTHOPPERS (Hemiptera: Cixiidae) ASOCIADOS A CULTIVOS DE ARROZ EN SUDAMÉRICA.

Andrea V. Toledo¹, Ana M. Marino de Remes Lenicov², Alvaro Foieri²

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP, calle 60 y 119 s/n, 1900, La Plata, Bs. As., Argentina. andytoledo75@yahoo.com.ar

² División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP, Paseo del Bosque s/n, 1900, La Plata, Bs. As., Argentina.

El arroz, *Oryza sativa* L. (Graminae), es uno de los cultivos más importantes en los trópicos, debido a su gran variedad de usos y a su adaptabilidad a un amplio rango de condiciones climáticas, edáficas y culturales. Sin embargo estos cultivos son afectados por un gran número de enfermedades y de insectos que disminuyen su producción. Una de las mayores plagas del arroz la constituyen los Hemiptera Fulgoromorpha de las familias Delphacidae y Cixiidae, conocidos como *planthoppers* o *chicharritas*, los cuales se encuentran presentes en áreas templadas y tropicales y ocasionan extensos daños por su alimentación sobre las plantas o por actuar como vectores de virus. El desarrollo de resistencia por parte de las poblaciones de insectos y el conocido impacto ambiental negativo que ocasiona el control químico, nos convoca a la búsqueda de otras estrategias de control. En estos ecosistemas, en los cuales la temperatura y la humedad son elevadas, los hongos entomopatógenos son considerados agentes de control biológico potencialmente importantes. En el presente trabajo se da a conocer el hallazgo de *Hirsutella citriformis* (Ascomycota: Hypocreales) afectando naturalmente a adultos de *Oliarus dimidiatus* (Cixiidae). Este hallazgo constituye la primera cita de este hongo entomopatógeno sobre una especie de reconocida importancia numérica sobre cultivos de arroz en la Argentina. La especie fúngica fue caracterizada morfológicamente a partir del insecto hospedador, aislada en cultivos axénicos y depositada en la Colección de Hongos Entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica bajo el número de acceso ARSEF 8378.

P31: PRIMER REGISTRO DE *Hirsutella* (Ascomycota: Hypocreales) Y *Pandora* (Zygomycota: Entomophthorales) INFECTANDO NATURALMENTE DERMAPTEROS Y PSOCOPTEROS.

Andrea V. Toledo¹, Richard A. Humber², Claudia C. López Lastra³

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Calle 60 y 119 s/n, (1900), La Plata, Bs. As., Argentina. andytoledo75@yahoo.com.ar

² USDA-ARS Plant Soil and Nutrition Laboratory, Tower Road, Ithaca, NY 14853, USA.

³ Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) UNLP-CONICET, Calle 2 Nro. 584 (1900), La Plata, Bs. As., Argentina.

Los hábitos alimenticios herbívoros de algunas especies de "tijeretas" (Insecta: Dermaptera) hacen que con frecuencia sean consideradas plagas de cultivos mantenidos en invernáculo o a campo. Por otro lado varias especies de insectos correspondientes al orden Psocoptera, conocidos como "piojos de los libros", poseen una gran afinidad por los víveres almacenados, y si bien no ocasionan daño directo, sus poblaciones alcanzan densidades inaceptables. En el

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 presente trabajo se dan a conocer los primeros registros de los hongos entomopatógenos *Hirsutella strigosa*, *Hirsutella citrifomis* (Ascomycota: Hypocreales) y *Pandora nouryi* (Zygomycota: Entomophthorales) infectando naturalmente a adultos de *Doru lineare* (Dermaptera: Forficulidae), *Ectopsocus californicus* (Psocoptera: Ectopsocidae) y *Heterocaecilius* sp. (Psocoptera: Pseudocaeciliidae) respectivamente. Estos hallazgos constituyen la primera cita de la ocurrencia natural de hongos entomopatógenos afectando a Psocoptera, así como también el primer registro de *P. nouryi* en otros hospedadores que no pertenecen a la Familia Aphididae (pulgones). Las tres especies fúngicas fueron caracterizadas morfológicamente a partir de los insectos infectados. Debido a que los intentos de obtener cultivos axénicos no fueron exitosos, las preparaciones microscópicas y fotografías de los entomopatógenos y de sus hospedadores fueron depositadas como material de herbario de referencia en el Instituto de Botánica Carlos Spegazzini.

SECCIÓN 3: INTERACCIÓN MICROORGANISMO-HOSPEDADOR

P32: ESTUDIO DE COMPLEMENTACION FISIOLÓGICA EN LA SIMBIOSIS ACTINORRÍCA POR ANÁLISIS DE OCUPACION DE NÓDULOS RADICULARES.

Danay Valdés La Hens y Luis G. Wall

Programa Interacciones Biológicas – Universidad Nacional de Quilmes

R. Sáenz Peña 352, B1876BXD BERNAL, lqwall@unq.edu.ar

Se conoce como simbiosis actinorríca a la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno por interacción entre diversos actinomycetes del género *Frankia* y diversas plantas leñosas que se distribuyen en 250 especies entre 25 géneros y 8 familias, en las cuales se reconoce un origen filogenético que las emparenta con las leguminosas y *Parasponia*, que forman simbiosis similares con bacterias genéricamente denominadas rizobios. En nuestra búsqueda de aislamientos de *Frankia* de nódulos de *Alnus acuminata* (aliso del cerro) de bosques nativos de la zona fitogeográfica de la Yunga en Tucumán, descubrimos una serie de actinomycetes nocardioformes fijadores de nitrógeno que no son

Frankia, algunos de los cuales son capaces por sí solos de inducir nódulos radiculares fijadores de nitrógeno en *Alnus acuminata* en forma similar a como lo hace *Frankia*. Estos actinomycetes nocardioformes infectan y nodulan con muy baja eficiencia en las raíces, cuando son inoculados en forma individual y lo hacen mostrando patrones de especificidad y reconocimiento simbiótico en forma similar a *Frankia*. Sin embargo, cuando estos actinomycetes nocardioformes son co-inoculados con una cepa de *Frankia* heteróloga incapaz de inducir nodulación en *Alnus acuminata*, la nodulación aumenta significativamente respecto de la inoculación individual. El análisis de ocupación de los nódulos utilizando un sistema de plantas trampas inoculadas con macerados de nódulos o raíces de las plantas que habían sido co-inoculadas muestran que solo ingresan al nódulo los actinomycetes nocardioformes sugiriendo una complementación fisiológica en trans por parte de la cepa de *Frankia* no infectiva. Estos descubrimientos en su conjunto amplían el paradigma actual de la simbiosis actinorríca y abren nuevas posibilidades para el estudio de señales en el proceso de reconocimiento en la simbiosis actinorríca.

P33: A PHAGE DISPLAY LIBRARY APPROACH TO ISOLATE FACTORS THAT PROMOTE ADHESION OF BRUCELLA TO HOST TISSUES

Diana M. Posadas; Verónica Ruiz; Fernando A. Martín; Angeles Zorreguieta.

Fundación Instituto Leloir, IIBBA CONICET y FCEyN, Universidad de Buenos Aires. Patricias Argentinas 435, (1405) Bs As, Argentina. e-mail: dposadas@leloir.org.ar

Brucella is an intracellular pathogen responsible of the zoonotic disease called brucellosis. A key feature of *Brucella* virulence is its ability to invade and proliferate inside professional and non-professional phagocytic cells, were it establishes.

It is well known that attachment of bacteria to host cells is one of the earliest steps in many infectious processes. Firm adhesion of *Brucella* to the tissues of their hosts allows a close contact between bacterial and eukaryotic cells, a prerequisite for the progress of the infection. Attachment appears to be a complex multistep process consisting of several, both specific and unspecific, interactions. It has been shown that brucellae are able to adhere to the surface of cultured epithelial cells and that sialic acid residues were involved in the interaction of *Brucella* with erythrocytes, macrophages and epithelial cells, indicating the presence of bacterial lectins participating in the recognition of cellular receptors. *Brucella* also was able to bind to several extracellular matrix proteins, in particular fibronectin and vitronectin, as other pathogenic organisms. However, we still know very little about the adhesion mechanism used by different *Brucella* and what physiological changes are induced in the bacteria upon direct physical contact with host cells. We are interested in discover which are the factors that promote adhesion and invasion of the host tissues in *Brucella*. Shotgun phage display cloning is a useful tool for studying interactions between bacterial and host proteins. Libraries are constructed by cloning randomly fragmented prokaryotic DNA into phagemid vectors. Theoretically, these libraries consist of phages that together display all proteins encoded by the bacterial genome. From such a library, polypeptides with affinity for another molecule can be isolated by affinity selection, panning. This procedure can lead to the selection of clones that present a true binding ability.

We used this technique to identify bacterial adhesins, receptors and their minimal binding domains. A *B. suis* phage display library was constructed by cloning shotgun digested genomic DNA into the pG8SAET phagemid vector. The phages were panned several times against immobilized ligands; fibronectin and fetuin were used as ligands in different panning experiments. After enrichment for a certain binding capacity, a number of candidates were selected and the sequences of the inserted foreign DNA were determined. The interaction of these phage candidates with the ligand will be analyzed further in future experiments.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 P34: ESTUDIOS *IN VITRO* DE LAS INTERACCIONES ENTRE LA MICROBIOTA BACTERIANA ASOCIADA A LA CUTÍCULA DE DELFÁCIDOS Y CICADÉLIDOS (HEMIPTERA: AUCHENORRHYNCHA) Y SUS HONGOS PATÓGENOS.

Andrea V. Toledo¹, Adriana M. Alippi¹, Ana M. Marino de Remes Lenicov².

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP. Calle 60 y 119 s/n, 1900, La Plata, Bs. As., Argentina. andytoledo75@yahoo.com.ar

² División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Paseo del Bosque s/n, 1900, La Plata, Bs. As., Argentina.

Los hemípteros auquenorrincos, representados en todas las regiones del mundo, reúnen la mayor cantidad de especies vectoras de microorganismos fitopatógenos. *Delphacodes kuscheli* (Delphacidae) y *Dalbulus maidis* (Cicadellidae) son considerados los vectores que provocan las enfermedades más severas al maíz en el continente americano. Entre estas patologías se destacan *Mal de Río Cuarto (MRCV)*, endémica de la Argentina y *Corn Stun (CSS)*, distribuida desde el sur de los Estados Unidos de América hasta zonas templadas de nuestro país. En varias regiones del mundo se ha evaluado la potencialidad de algunas especies fúngicas como agentes de control de estos hemípteros, sin embargo, poco se conoce acerca de las limitantes de su accionar sobre la superficie cuticular de estos insectos. Estudios previos han revelado que, para algunos sistemas, el fracaso del hongo al invadir el tegumento del hospedador se atribuye a la existencia de una antibiosis ejercida por la microbiota natural alojada en la cutícula, formada principalmente por otros hongos y bacterias. Ensayos experimentales sobre estos auquenorrincos infectados con *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) han revelado diferencias en los niveles de mortalidad, por lo que en el presente trabajo se propone estudiar el efecto antagónico de la microbiota cuticular de estas dos especies de insectos contra la capacidad invasiva de este entomopatógeno. A partir de hembras y machos de *D. kuscheli* (30) y *D. maidis* (37), mantenidos sobre trigo y maíz respectivamente bajo invernáculo, se aislaron 67 cepas bacterianas. Los insectos provinieron de diferentes muestreos y fueron recolectados al azar desde las jaulas de cría. Las cepas aisladas correspondieron a Bacilos Gram (+) formadores de esporas (52,3%), Bacilos Gram (+) (26,9%), Bacilos Gram (-) (11,9%) y Cocos Gram (+) (8,9%). Todos los aislamientos fueron sometidos a un *screening* preliminar a fin de seleccionar las cepas inhibitoras del crecimiento *in vitro* de *B. bassiana*. El efecto antagónico se evaluó en placas de Petri conteniendo un disco central de micelio fúngico y 3 discos equidistantes de cada una de las cepas bacterianas a evaluar. A partir de estos ensayos se seleccionaron las 22 cepas más antagonistas (9 aisladas de *D. kuscheli* y 13 de *D. maidis*), las cuales

ocasionaron una inhibición del crecimiento de 38,1%-74,3% y 28,4%-82,1%, respectivamente.

P35: BIOFILM EN *XANTHOMONAS AXONOPODIS PV CITRI*, SU REGULACION Y RELACION CON SU CAPACIDAD INFECTIVA

Pablo S. Torres¹, Lorena Sendín², Florencia Siciliano³, M. Paula Filippone², Florencia Malamud¹, Luciano A. Rigano¹, Gustavo Gudesblat¹, Atilio P. Castagnaro², M. Rosa Marano³ y Adrián A. Vojnov¹
avojnov@fundacioncassara.org.ar

¹Fundación Pablo Cassará, Centro de Ciencia y Tecnología Dr Cesar Milstein. Saladillo 2468, C1440FFX, Buenos Aires. ²Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán. ³Instituto de Biología Molecular de Rosario, Rosario.

La Cancrosis de los cítricos es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis pv citri* (*Xac*) sobre plantas de cítricos, es altamente contagiosa, se disemina rápidamente y tiene un potencial de daño muy alto. Provoca defoliación, caída y/o lesiones en los frutos (que afectan su calidad comercial) y decadencia general de los árboles afectados. *Xac* coloniza el apoplasto de la célula vegetal de frutos, hojas y tallos e induce la formación de grandes pústulas, conduciendo a la hipertrofia e hiperplasia celular y posterior necrosis o muerte celular.

En los genomas de *Xanthomonas campestris pv campestris* y *Xac*, conjuntamente secuenciados (da Silva y col., 2002 *Nature*. 417:459-463), se ha

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 detectado la presencia de un grupo de genes, *rpf* (del inglés *r*egulation of *p*athogenivity *f*actors). Estudios realizados con *Xcc* han demostrado que este grupo modula la expresión de diversos factores de virulencia censando la densidad de población bacteriana a través de moléculas señales difusibles (DSF), permitiéndole a la bacteria expresar los genes que codifican para estos factores en el momento que sean necesarios. Por otra parte, en los últimos veinte años, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular, planctónica o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran principalmente formando estructuras tridimensionales denominadas biofilms. Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijos a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes. En nuestro laboratorio hemos comenzado a estudiar un nuevo tipo de biofilm en *Xcc*. Este biofilm posee estructuras tridimensionales definidas y se desarrolla exclusivamente en un medio mínimo siendo condiciones muy cercanas a las que posee la bacteria *in vivo*, es decir en la planta. Además, se ha podido observar una relación directa en la capacidad de producir biofilms y la virulencia de estas bacterias (Torres, et al., 2007. *Environmental Microbiology* 9(8):2101-9). En el presente trabajo, demostramos que *Xac* también desarrolla estructuras de biofilm en medio mínimo, que la formación de las mismas esta regulada por el sistema *rpf*/DSF y que resultan ser importantes para el desarrollo de canchros sobre plantas de limonero.

SECCIÓN 4: MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

P36: CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS REGULATORIOS INVOLUCRADOS EN LA HOMEOSTASIS DE Mg²⁺ EN *Salmonella enterica*

Barchiesi, Julieta; Castelli, Maria E.; Soncini, Fernando C.; Garcia Véscovi, Eleonora.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N.R., Rosario, Argentina. E-mail: barchiesi@ibr.gov.ar.

El Mg²⁺ es un catión de vital relevancia biológica, requerido para una extensa variedad de funciones celulares. En *Salmonella typhimurium* la concentración de Mg²⁺ es modulada a través del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ. Dicho sistema, en ambientes con niveles de Mg²⁺ limitantes, activa la

expresión de diversos genes, entre ellos, dos loci que codifican para dos de los transportadores de Mg²⁺ presentes en *Salmonella*, *mgtA* y *mgtCB*.

Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que los genes *mgtA* y *mgtCB* están también regulados por los niveles de magnesio intracelular mediante un mecanismo dependiente de la región 5' no traducida del gen e independiente del sistema PhoP/PhoQ.

Paralelamente, y con el objeto de detectar la posible presencia de un factor regulatorio involucrado en el mecanismo descrito, se generó una biblioteca de expresión genómica de *Salmonella* y se aisló un clon que mostró activación de la fusión transcripcional *mgtA-lacZ*. Este clon albergaba el gen *rob*. *Rob* es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, que incluye a las proteínas MarA y SoxS. Los tres reguladores reconocen una secuencia

consenso común de 20 pb, con un motivo altamente degenerado, denominado caja mar/sox/rob, y poseen diferentes efectos cuantitativos sobre promotores individuales de un conjunto de genes comunes a los mismos. La activación del regulón en *E. coli* confiere a la bacteria resistencia a antibióticos, superóxidos y solventes orgánicos.

En el laboratorio, ensayos de actividad β -galactosidasa permitieron determinar que el efecto inductor de la expresión de *mgtA* por Rob se verifica de modo independiente de PhoP/PhoQ, y de la regulación Mg^{2+} -dependiente. Además, no se observó activación de *mgtA* por reguladores homólogos a Rob, como MarA y SoxS, en un entorno génico salvaje.

Mediante ensayos de extensión del cebador, retardo del ADN en geles y de huella digital se caracterizó la región promotora de *mgtA* dependiente de Rob y se corroboró la presencia de una caja mar/sox/rob.

Posteriormente, con la finalidad de determinar la implicancia fisiológica de la regulación de *mgtA* por Rob, se ensayó el efecto de la mutación en dicho gen sobre la resistencia a solventes orgánicos. Sorprendentemente, la resistencia a ciclohexano mediada por Rob se vio disminuida en un entorno *mgtA*⁻, demostrando que MgtA interviene directa o indirectamente, a través de la regulación homeostática del Mg^{2+} celular, en la resistencia a ciclohexano inducida por Rob.

Estos resultados revelan que la regulación Rob-dependiente adiciona un nivel de complejidad extra al control de la expresión de MgtA.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
P37: METABOLISMO DE CITRATO EN *Enterococcus* Y SU APLICACIÓN EN LA GENERACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE AROMA

Blancato, VS; Repizo, G; Guibert L y Magni C
Dpto. de Microbiología, IBR-CONICET, U.N.R.
Suipacha 531, Rosario, Argentina E-mail:
magni@ibr.gov.ar

Los *Enterococcus* son microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias lácticas. Si bien comparten numerosas propiedades de interés con este grupo, son considerados patógenos oportunistas. A pesar de ello, numerosas especies de enterococcus poseen una larga historia de aplicaciones industriales y probióticas. Entre ellas podemos mencionar el rol en el desarrollo de las características organolépticas durante la maduración de muchos quesos. Debido a que los enterococcus pueden dominar la flora no inicial de muchos quesos, estos contribuirían al desarrollo del aroma y sabor durante la maduración. No sólo son capaces de mejorar el sabor y aroma por medio de su metabolismo primario y secundario, sino que también pueden producir varias enzimas que interactúan con los componentes de la leche, así promoviendo otras transformaciones bioquímicas importantes. Un ejemplo de esto es la fermentación del citrato, que en enterococcus conlleva a la producción de compuestos generadores de aroma de cuatro carbonos (C4), principalmente diacetilo, acetoina y butanodiol, que mejoran las propiedades de los quesos. Así, la utilización del citrato presente en la leche por BL tiene un efecto altamente positivo sobre la calidad del producto final.

En este trabajo se presentan resultados relacionados con la caracterización del metabolismo de citrato en *E. faecalis*. Se determinó que los genes involucrados en la degradación de citrato (genes *cit*) se encuentran organizados en una estructura de diverjón (operones *citHO* y *oadDBcitCDEFXoadACitMG*). Por ensayos de Northern blot y fusiones transcripcionales de las regiones promotoras de los operones se pudo establecer que el metabolismo es inducido en presencia de citrato y reprimido por la presencia de azúcares fácilmente metabolizables. Generando cepas mutantes se comprobó que los genes *cit* requieren para su activación el regulador transcripcional CitO, y además, que éste interactúa con el citrato. La presencia de los genes *cit* fue establecida tanto en cepas provenientes de aislados clínicos como de derivados lácteos. Asimismo, se inició la caracterización de los genes que codifican las enzimas involucradas en la ruta de generación de compuestos C4. Éstos se hayan formando un operón el cual sería regulado transcripcionalmente por un regulador cuyo gen se transcribe en forma divergente con respecto al operón.

P38: ANÁLISIS DEL EFECTO DE MUTACIONES EN GENES FERMENTATIVOS (*pta* y *ldh*) SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN *E. coli* RECOMBINANTE

Giordano Andrea M., de Almeida Alejandra y Pettinari M. Julia.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. E-mail andy_gior@yahoo.com.ar

Los polihidroxicanoatos (PHA) son plásticos biodegradables acumulados como sustancia de reserva en respuesta a condiciones de stress ambiental o desbalance nutricional por un gran grupo de especies bacterianas. El polihidroxibutirato (PHB) es el PHA producido por la mayoría de los microorganismos y el más conocido.

En el laboratorio se aislaron y caracterizaron los genes responsables de la síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. Los genes *phaBAC* se clonaron en un plásmido de expresión, originando el plásmido pJP24. Este plásmido se introdujo en la cepa K1060 de *Escherichia coli*, resultando en la cepa K24. Al estudiar la estabilidad de pJP24, se encontró que el plásmido perdía estabilidad al aumentar la densidad del cultivo. Una de las estrategias empleadas para lograr la estabilidad de los genes en las recombinantes es la introducción de los genes en el cromosoma.

El objetivo del trabajo es evaluar diferentes mutantes de *E. coli* para la elección de un gen blanco para la inserción de los genes *pha* en el cromosoma bacteriano.

Se sabe que entre los productos metabólicos mayoritarios de las cepas de *E. coli* recombinantes están los ácidos láctico y acético. La producción de estos ácidos consume una gran cantidad de carbono y poder reductor, y además, su acumulación en el medio de cultivo inhibe el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, se utilizarán los genes involucrados en la síntesis de lactato (*ldh*) o acetato (*pta*) como genes blanco para la inserción de los genes *pha*.

Se construyeron cepas isogénicas con mutaciones en los genes mutantes *ldh*, *pta* y *pta ldh* mediante transducción generalizada, y luego se transformaron con pJP24. Se realizaron ensayos en erlenmeyer para comparar la cinética de crecimiento y producción de PHB de las mutantes, de la cepa parental sin mutaciones en ninguno de los dos genes utilizando un medio semisintético y fuentes de carbono alternativas (glucosa o glicerol). En ambas fuentes de carbono se obtuvo una menor producción de PHB en la cepa *pta*, y una cantidad similar en las cepas salvaje y *ldh*.

Mediante transducción generalizada, se introdujo la mutación *ldh* en la cepa K24. Se realizaron los ensayos en erlenmeyer utilizando distintas fuentes de carbono (glucosa o glicerol) y se compararon la cinética de crecimiento, producción de PHB y otros productos metabólicos a fin de caracterizar el metabolismo de las diferentes cepas para evaluar la utilización de *ldh* como

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
gen blanco para la inserción de los genes *pha* en el cromosoma de *E. coli*.

P39: EFECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEASA EXTRACELULAR DE LA ARQUEA HALOALCALÓFILA *Natrialba magadii*

E. Madrid¹, R. Paggi¹, C. D'Alesandro y R. De Castro. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN-UNMdP. CC1245, (7600) Mar del Plata. E-mail eamadrid@mdp.edu.ar ¹-contribuyeron en forma equitativa.

Muchas especies de bacterias responden coordinadamente a la presencia de señales que se acumulan en el medio cuando la población alcanza una densidad celular elevada (*quorum sensing*). Este mecanismo de regulación ha sido muy poco estudiado en microorganismos que habitan en ambientes extremos y, en particular, no ha sido comprobado en las arqueas. La arquea haloalcalófila *Nab. magadii* (crecimiento óptimo en 20% NaCl y pH 12) produce una serín proteasa extracelular, NEP, al final del crecimiento exponencial. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de NEP durante las distintas etapas del crecimiento y en cultivos jóvenes suplementados con medios condicionados (MC) obtenidos de cultivos de alta densidad celular. Cultivos con una DO₆₀₀ ~0,3 fueron incubados en presencia y ausencia de filtrados de un medio cosechado al final de la fase exponencial (DO₆₀₀ 1,64). La expresión de NEP fue analizada a diferentes niveles: actividad azocaseinolítica extracelular en función del crecimiento, determinación de transcriptos y proteína correspondientes a NEP por RT-PCR y Western Blotting, respectivamente, en tres puntos representativos de las fases exponencial media (DO₆₀₀ 0,5), exponencial tardía (DO₆₀₀ 1,0) y estacionaria (DO₆₀₀ 1,8). La actividad proteolítica en el medio se detectó durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria, correlacionándose con el aumento (9 veces) en el nivel de transcriptos específicos de NEP. La presencia de la proteasa en esta etapa del crecimiento también fue confirmada por Western Blot. Sin embargo, en el cultivo joven suplementado con MC se observó la inducción temprana tanto de la actividad proteolítica como de los transcriptos de NEP en relación al cultivo control sin adiciones, siendo similares las velocidades de crecimiento (g= 5:30 h). El incremento en los transcriptos de NEP fue 3 veces mayor con respecto al cultivo control en la misma etapa del crecimiento mientras que ambos cultivos mostraron similar expresión de transcriptos en la fase estacionaria. Paralelamente, se registró mayor acumulación de proteasa en el medio extracelular de los cultivos incubados con MC, mediante Western blot. En su conjunto estos resultados muestran que la producción de NEP está regulada transcripcionalmente durante el crecimiento alcanzando mayores niveles en

la medida en que la densidad del cultivo aumenta. Por otra parte, los ensayos con MC sugieren que "señales"/factores presentes en cultivos de alta densidad podrían intervenir en este proceso mediante un mecanismo del tipo *quorum sensing*.

(Este trabajo fue financiado por subsidios de ANPCyT, CONICET y UNMDP).

P40: PLASMID EXPRESSION OF *mutS*, -L, AND/OR -H GENE IN *E. coli dam* CELLS RESULTS IN STRAINS THAT DISPLAY REDUCED MUTATION FREQUENCY

Martina, Mariana A.; Jacquelin, Daniela K.; Argaraña, Carlos E. y Barra José L.

Departamento de Química Biológica, CIQUIBIC (UNC – CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, X5000HUA - Córdoba – Republica Argentina. E-mail: mamartina@fcq.unc.edu.ar

Escherichia coli MutS, -L, -H, and Dam (DNA deoxyadenosine methyltransferase) proteins are the principal components of the postreplicative DNA mismatch repair system (MRS). The transitory hemimethylated state of adenines in the genome GATC sequences of *E. coli* provide the strand discrimination signal to direct the MRS action toward the damaged DNA strand. *E. coli dam* cells possess an active but non-directed MRS; therefore, assembly of MutSLH complex at a mismatched base pair can result in MutH mediated cleavage of GATC sites in both DNA strands. Double-strand breaks on a fraction of the replication errors occurring in *dam* cells can cause cell death, selectively eliminating these putative mutants from the population. An increased level of MutS, -L or -H in *E. coli dam* cells results in a more active MRS. We show that *E. coli dam* cells transformed with plasmids containing either the *mutS*, *mutL*, or *mutH* gene display a mutation frequency 3-8 times lower than that of the parental *dam* strain, due to increased mismatch-stimulated cell killing. Transformed strains are also more susceptible to killing by the base analogue 2-aminopurine. However, *dam* and *dam* transformed cells have similar duplication time, proportion of live/dead cells, and morphology. *dam* strains of some bacterial species (*Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, and certain strains of *Yersinia pseudotuberculosis*) are attenuated. Therefore, *dam* strains are being used as live vaccines to generate immune protection against virulent wild-type bacteria in chickens, calves and mice; and are also being used to deliver viral antigens to generate immune protection against viral diseases. However, the fact that these *dam* strains are mutators is an undesirable characteristic. Our results suggest that their mutator activity can be greatly reduced by insertion of a plasmid containing the *mutS* or *mutL* gene. Then, transformed

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
dam strains are potentially useful as a source of a live vaccine because of lower mutation frequency.

P41: IDENTIFICATION AND MAPPING OF THE SIGMA-54 DEPENDENT *PpchP* PROMOTER of *Pseudomonas aeruginosa*

Massimelli, M. Julia; Bucchieri, Virginia and Lisa, A. Teresita.

Dpto. Biología Molecular, FCEFQyN, UNRC, Ruta 36, Km 601, RiolV, Córdoba, Argentina.

Recently, we initiated studies aimed at understanding the regulation of *pchP* gene in *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a phosphorylcholine phosphatase. We studied the molecular mechanisms of *pchP* transcriptional regulation, using a combination of RT-PCR, *lacZ* transcriptional fusions, site-directed mutagenesis of putative promoter sequences and real-time quantitative RT-PCR. The experimental evidence indicates that regulation of *pchP* expression is complex. The promoter is induced by choline and derivatives in an independent way of phosphate concentration, and it is strongly repressed by the addition of succinate and ammonium to choline-containing growth cultures.

Bioinformatic predictions and the fusion of different *pchP* upstream fragments to *lacZ* indicated that the region from -91 to -55 contains the *pchP* promoter. The score obtained for *pchP* promoter in PromScan analysis was 0.69, with a highlighted sequence of -91 **CGGGCGC(AGGGT)₅TTGCG** -77. This program normally describes as sigma-54 promoter the sequences with homologies higher than 0.8, which are very close to the consensus **TGGCAC-N₅ -TTGCa/t**. However, and as marked in bold, the *pchP* promoter presents the conserved bases from -12 and -24 boxes. Site directed mutagenesis of bases located in the aforementioned region showed that the bases located between position -80 to -68 are essential for promoter activity, but the bases located in the downstream region from -55 to -68 are apparently not required for RNA polymerase binding. We also observed that when a TTG sequence in sigma-54 box was changed to TGG, promoter activity increased 2 to 3-fold over wild-type promoter. Our results also indicated that *pchP* far upstream sequences, specifically the bases located from -189 to -170, are required for high-level *pchP* expression. This result suggested that this promoter could be a sigma-54 dependent promoter, and that this region could contain an "activator" binding site. The introduction of a promoter fusion in a sigma-54 deletion mutant showed a remarkable reduction of *pchP* promoter activity in the absence of this factor. The mutant also showed the absence of characteristic induction peak in response to choline in the latency phase, showing instead a constant activity level along the entire growth curve. The reduction of *pchP* expression in the sigma-54

mutant was corroborated by complementation. Finally, a putative IHF element in *pchP* promoter was located around -50 bp upstream of +1 site, in an AT rich region. This IHF was shown to be essential to produce a functional promoter, since if ATs were changed to CGs the promoter resulted unable to transcribe the reporter gene. All these data strongly suggest that *pchP* promoter is regulated by the sigma-54 factor.

P42: ROLE OF *mutS* and *dinB* IN THE EMERGENCE AND INSTABILITY OF THE MUCOID PHENOTYPE IN *Pseudomonas aeruginosa*.

Moyano A.J., Luján A.M., Argaraña C.E. and Smania A.M.

CIQUIBIC-CONICET, Fac. Cs. Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.

E-mail: amoyano@mail.fcq.unc.edu.ar

Pseudomonas aeruginosa colonizes the respiratory tract of Cystic Fibrosis (CF) patients, where a high proportion of mutators along with mucoid, alginate-overproducing variants, emerge leading to chronic infection and a poor prognosis for the patient. Alginate is an important virulence factor and its overproduction confers increased resistance to the host immune response, protects bacterial cells from reactive oxygen intermediates, and plays an important role in the development and in the architecture of biofilms. Mucoid conversion generally involves mutations inactivating the *mucA* gene via introduction of frameshifts, producing premature stop codons as well as other coding alterations. Among them, *mucA22*, a deletion of a G residue within a homopolymeric track of five Gs, is the most common allele in CF isolates. Irrespective of the kind of mutation carried by the *mucA* gene, the mucoid phenotype is typically unstable under standard laboratory conditions due to second site suppressor mutations. This study correlates the activity of factors determining the mutation rate, such as MutS and DNA polymerase IV (Pol IV), with the emergence of mucoid variants as well as the instability of this phenotype. MutS is a main component of the Mismatch Repair System involved in the correction of errors produced in DNA replication. Pol IV, encoded by the *dinB* gene, is an error-prone DNA polymerase member of the Y family of DNA polymerases that is involved in "stress-induced mutagenesis". Our results show that: (i) the emergence frequency of mucoid variants was higher in isolates arising from mutator *mutS* populations compared with the wild-type strain; (ii) mucoidy was highly unstable in the mutator strain; (iii) in both strains mucoid conversion occurred mainly by mutations in the *mucA* gene; (iv) however, the mutator strain harboured mostly *mucA22*, while the wild type showed a wider spectrum of *mucA* mutations with low incidence of *mucA22*; (v) in any case the reversion process occurred via correction of the *mucA* mutation; (vi) disruption of *dinB* in the wild-type and *mutS* strains decreased drastically the emergence frequency of

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 mucoid variants; (vi) as well, disruption of *dinB* in mucoid variants derived from the wild-type and *mutS* strains contributed to stability of the mucoid phenotype by decreasing the reversion frequency to a non-mucoid state. Taken together results demonstrate antagonistic effects between MutS and Pol IV in the generation of mucoid variants as well as in the maintenance of mucoidy. At present efforts are being made pursuing the identification of the genes involved and the reversion pathways for each genetic background.

P43: DISPERSIÓN DEL INTRÓN DEL GRUPO II BACTERIANO DE CLASE C *S.ma.12* EN BACTERIAS PROCEDENTES DE DIVERSOS AMBIENTES

Cecilia Quiroga¹, María Soledad Ramírez¹, Nelda Olivera² y Daniela Centrón¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155, P12, CABA (1121). ²CENPAT-CONICET, Puerto Madryn, Chubut. ARGENTINA. Email: ceciliaquiroga@yahoo.com.ar

Los intrones del grupo II se encuentran ampliamente distribuidos en Eucariotas y Procariotas. Estos elementos poseen la capacidad de movilizarse a nuevas regiones del genoma utilizando como intermediario una molécula de ARN. Los intrones del grupo II bacterianos se asocian generalmente con otro tipo de elementos móviles, como ser secuencias de inserción, transposones, plásmidos o cassettes. Un subgrupo de intrones, los intrones bacterianos de la clase C, pueden encontrarse en diferentes contextos genómicos pero comparten la particularidad de insertarse en las inmediaciones de una estructura secundaria del ADN. Los intrones de la clase C insertados en cassettes de resistencia a antibióticos no se transcriben, lo cual sugiere que existe una copia en otro contexto genómico responsable de la diseminación del intrón.

El intrón de clase C *S.ma.12* se encuentra insertado en un cassette de resistencia a antibióticos de un aislamiento clínico multiresistente de *Serratia marcescens*. El análisis comparativo de genomas bacterianos identificó un intrón homólogo a *S.ma.12* en *Pseudoalteromonas tunicata* D2. A fin de determinar la procedencia del intrón *S.ma.12* se analizaron varios aislamientos clínicos de *S. marcescens* (n=20) provenientes de diferentes hospitales y se compararon con diversos aislamientos ambientales de *Serratia* spp. (n=3) y *Pseudoalteromonas* spp. (n=8) de ambientes acuáticos, y otras bacterias de la familia de las Alteromonadales (*Shewanella* spp. (n=7), *Colwellia* spp. (n=1) y *Olleya* spp. (n=1)) de ambientes marinos. La identificación del intrón *S.ma.12* se realizó por PCR con cebadores específicos y degenerados, seguido por el análisis de secuencias de los respectivos productos de la amplificación y genómica comparativa.

Ninguno de los aislamientos clínicos de *S. marcescens* posee un intrón bacteriano de clase C *S.ma.12*,

mientras que sólo 1 aislamiento ambiental de *Serratia* spp. posee un intrón de esta clase. Por otro lado, todos los aislamientos de *Pseudoalteromonas* spp., 2 de *Shewanella* spp. y aquellos de *Colwellia* spp. y *Olleya* spp. mostraron la presencia de un intrón de grupo II. El análisis comparativo de los genomas de diversas cepas de *Pseudoalteromonas* spp. y *Shewanella* spp. corroboraron la presencia de un intrón bacteriano de clase C (50% de identidad contra la secuencia nucleotídica de *S.ma.12*).

Por lo tanto, la presencia de intrones con elevada similitud a *S.ma.12* en estas especies bacterianas sugiere o bien un ancestro común en ambientes acuáticos o eventos de transferencia horizontal de genes en este nicho.

P44: EFECTO DEL FACTOR σ^S (RpoS) EN LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN *Pseudomonas putida*

Laura J. Raiger-Iustman, Beatriz Méndez y Jimena Ruiz.

Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Ciudad Universitaria. Pabellón II. Piso 4to. Capital Federal. Argentina. e-mail: lri@qb.fcen.uba.ar

En bacterias Gram negativas, la subunidad alternativa de la ARN polimerasa σ^S regula la expresión de genes involucrados en la resistencia a distintos tipos de estrés. En el caso de *Pseudomonas*, σ^S también regula la expresión de metabolitos secundarios y de factores de virulencia.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres que se acumulan en el interior de las células bacterianas cuando éstas crecen en condiciones de exceso de carbono.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con *Pseudomonas putida* demostraron que la capacidad de degradación de PHA incrementaba la resistencia al estrés y el contenido intracelular de σ^S . En base a estos resultados, el objetivo de este trabajo fue determinar si el factor σ^S está involucrado en la regulación de los genes de la polimerasa y/o la depolimerasa de PHA.

Pseudomonas putida KT2440 posee dos PHA polimerasas: PhaC1 y PhaC2, y una depolimerasa: PhaZ. Los estudios realizados hasta el momento indicarían que los genes *phaC1* y *phaZ* estarían regulados por el mismo promotor, denominado pC1. Para analizar si el factor σ^S está o no implicado en la regulación de los genes *phaC1* y *phaZ* se realizó una fusión traduccional al promotor pC1 (*pC1::lacZ*) en un entorno salvaje (*P. putida* KT2440) y en un entorno *rpoS* (*P. putida* SDM75).

Los resultados obtenidos demuestran que durante la fase exponencial de crecimiento, la expresión de β -galactosidasa resulta igual en las dos cepas, pero durante la fase exponencial tardía y la fase

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 estacionaria (momento en el que aumenta la concentración intracelular de σ^S) la expresión de β -galactosidasa en la cepa mutante aumenta significativamente mientras que en la cepa salvaje se mantiene constante. Por otro lado, la degradación del PHA se induce más tempranamente en la cepa mutante que en la salvaje. Asimismo, la sobreexpresión del factor σ^S , tanto en la cepa salvaje como en la mutante, trajo como resultado una marcada inhibición en la expresión del gen *lacZ* fusionado al promotor pC1.

De estos datos se concluye que en ausencia de σ^S existe probablemente una desregulación de los genes expresados a partir del promotor pC1 y que el factor σ^S estaría actuando en forma indirecta disminuyendo la expresión de los genes del metabolismo del PHA.

P45: GENE CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF AN ORGANIC SOLVENT-TOLERANT PROTEASE SECRETED BY THE HALOALKALIPHILIC ARCHAEON *Natrialba magadii*

Diego M. Ruiz¹, Julie A. Maupin-Furlow² and Rosana E. De Castro¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN-UNMDP Funes 3250 4° Nivel, Mar del Plata 7600 Argentina. ² Department of Microbiology and Cell Science, University of Florida, Gainesville, FL USA. E-mail: dmrui@mdp.edu.ar

Archaea, the third domain of life, includes microorganisms which are mostly extremophiles. Haloarchaea grow optimally in 15-30% NaCl and, as an adaptation to the environment, halophilic enzymes are active and stable in low water solutions, features that are of interest for the application of halophilic enzymes as biocatalysts in aqueous-organic solvent media. The haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii* (optimum growth in 20% NaCl and pH 12) secretes an organic solvent-tolerant protease NEP (*Natrialba magadii* Extracellular Protease) that has been biochemically characterized. The aim of this work was to clone and express the gene encoding NEP in the haloarchaeal host *Haloferax volcanii*. The complete gene for NEP was isolated from a genomic library of *Nab. magadii* by hybridization with a specific PCR probe. The nucleotide sequence of *nep* revealed an ORF of 1623 bp encoding a predicted 56.4 kDa polypeptide containing 20% acidic amino acid residues (pI 3.77) typical of haloarchaeal proteins. The translated protein, which included a putative 121-amino acid prepropeptide and 420 amino acids of mature protease, showed similarity to archaeal halolysins as well as to bacterial serine proteases of the subtilisin family. The prepropeptide contained the Tat consensus motif suggesting that NEP is a substrate of the Tat protein secretion pathway. The 5' region contained A/T rich sequences that match the consensus of a typical haloarchaeal promoter (box A). For the heterologous expression, the coding region of *nep* was amplified by PCR and cloned into *E. coli*

pET24b expression vector. Then, the sequence containing *nep* stop codon or the His6-tag were excised from pET-based constructs and subcloned in the shuttle vector pJAM under the haloarchaeal rRNAP2 promoter. After passage through a *dam*- *E. coli* strain, pJAM-NEP and pJAM-NEP-His6 were transformed into *Haloferax volcanii* DS70. Recombinant NEP (*HvNEP*) was successfully secreted and expressed as an active enzyme in *Hfx. volcanii*. Moreover, the protease activity detected in the culture medium was about 100-fold higher than that produced by *Nab. magadii*. The recombinant enzyme displayed similar electrophoretic mobility and antigenic behavior as native NEP. Current studies are focused on the determination of the biochemical properties and solvent tolerance of *HvNEP* as this will benefit basic studies as well the potential application of haloarchaeal enzymes in biotechnology.

This work was supported by research grants from ANPCyT, CONICET and UNMDP.

P46: COORDINACIÓN DEL METABOLISMO DE LA SACAROSA Y DEL NITRÓGENO EN *Anabaena* sp. PCC 7120.

Clarisa Marcozzi y Graciela L Salerno; Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA), Vieytes 3103, CC1348, 7600 Mar del Plata, Argentina. cmarcozzi@fiba.org.ar

Las cianobacterias son procariontes autótrofos que pueden llevar a cabo procesos de la conversión fotoquímica de la energía, la asimilación reductiva del CO₂ y la fijación del N₂. En las cianobacterias la transcripción de genes relacionados con la utilización de fuentes de N alternativas al amonio, es activada por un regulador de la transcripción que pertenece a la familia de CAP (proteína activada por catabolito) denominado NtcA. *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosas fijadora de N₂ para lo cual diferencia heterocistos. En este microorganismo se ha demostrado que NtcA cumple un rol fundamental para el desarrollo de estas células. En *Synechococcus* sp. PCC 7942, cianobacteria unicelular no fijadora de N₂, recientemente ha sido descrita una proteína de interacción a NtcA denominada PipX. Se ha demostrado que PipX también interacciona con PII (proteína sensora y reguladora del metabolismo del C). PipX tendría un rol central en la red de señalización por N, conectando los metabolismos del N y del C. La proteína homóloga a PipX en *Anabaena* sp. aún no ha sido caracterizada.

La síntesis de sacarosa (Sac) en *Anabaena* sp. PCC 7120 se lleva a cabo a través de la acción secuencial de las enzimas sacarosa-fosfato sintasas (codificadas por los genes *spsA* y *spsB*) y sacarosa-fosfato fosfatasa (codificada por el gen *sppA*), y su clivaje es catalizado por la sacarosa sintasa

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 (codificada por el gen *susA*). Si bien el metabolismo de la Sac ha sido ampliamente estudiado en plantas, en los organismos procariontes fue sólo recientemente descrito y poco se conoce de su regulación. El objetivo de este trabajo es analizar la coordinación de los genes involucrados en el metabolismo de la Sac con el del N a través de las proteínas NtcA y PipX en *Anabaena* sp. PCC 7120. Los genes *ntcA* y *pipX* de esta cepa fueron clonados y sobreexpresados en *E. coli*. Las proteínas de fusión GST-NtcA y GST-PipX fueron purificadas y separadas de la proteína GST por digestión con trombina. Experimentos de retardo en gel, realizados con las proteínas purificadas, han demostrado la interacción de NtcA con fragmentos de los promotores de los genes *spsA*, *spsB*, *sppA*, *susA* y *glnA* (gen que codifica para la glutamina sintetasa, utilizado como control positivo). Cuando la proteína PipX fue incubada junto a NtcA en los ensayos de cambio en la movilidad electroforética, se observó la presencia de una banda súper retrasada. En conclusión, los resultados sugieren que las proteínas PipX y NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 podrían estar interaccionando, coordinando la regulación del metabolismo de la Sac y del N. Financiado por ANPCyT, CONICET, Univ. Nac. de Mar del Plata y FIBA

P47: LA SACAROSA-FOSFATO FOSFATASA DE *Synechococcus marinus* PODRÍA ESTAR RELACIONADA CON EL ESLABÓN PERDIDO EN LA EVOLUCIÓN DE ESTA PROTEÍNA

Andrea C. Cumino, Macarena Perez Cenci, Graciela Salerno. Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA), Vieytes 3103, CC1348, 7600 Mar del Plata, Argentina. acumino@fiba.org.ar

El metabolismo de sacarosa ha sido recientemente descrito en cianobacterias, demostrándose que tanto la síntesis como degradación del disacárido tienen lugar por la acción de enzimas similares a las de plantas. La enzima sacarosa-fosfato-sintasa (SPS) es una glucosiltransferasa que sintetiza sacarosa-6-fosfato a partir de UDP-Glc y/o ADP-Glc y Fru-6-P, y está asociada metabólicamente a una fosfohidrolasa específica, la sacarosa-fosfato-fosfatasa (SPP); ambas enzimas son responsables de la síntesis neta del disacárido. En las denominadas cianobacterias del océano abierto ("open ocean species"), que se encuentran en la base de la radiación filogenética de estos microorganismos, están los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*. En todos los genomas secuenciados pertenecientes a cianobacterias de estos géneros se ha descrito al menos un MLA (marco de lectura abierta) con alta homología a las SPSs, conteniendo un dominio GTD (Glucosyl-Transferase Domain). Sin embargo, no resulta obvia la identificación de MLA de la fosfohidrolasa específica (un dominio independiente

PHD, Phospho-Hydrolase Domain), que correspondería a la enzima SPP. Recientemente se ha cristalizado una SPP cianobacteriana, que pertenece a la superfamilia de las HAD (Pfam00702b) que incluye fosfatasas y fosfotransferasas, definidas por tres motivos característicos.

En la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. PCC 7002 fue identificada y caracterizada una SPS bidominio (GTD-PHD) denominada Sym-SPS, estructura comúnmente encontrada en cianobacterias de este grupo, que se habría originado de la fusión de un GTD y PHD. Por otro lado, se postula que eventos posteriores de duplicación génica habrían dado origen a las SPPs y a un número creciente de parálogos de SPSs y SPPs desde las cianobacterias filamentosas a las plantas. En este trabajo, mediante PSI-BLAST fue identificado y caracterizado funcionalmente el primer gen de *spp* (Sym-SPP) de una cianobacteria marina. Este gen está superpuesto en 8 nucleótidos al gen que codifica Sym-SPS, pudiendo corresponderse a una única unidad transcripcional bicistrónica. La secuencia deducida de aminoácidos de Sym-SPP presenta una baja homología con las SPPs (15%). En contraste, el dominio PHD de Sym-SPS presenta mayor homología con las SPPs (29%). Sym-SPP tiene afinidad y especificidad de sustrato, y efectores similares a los descritos para las SPPs de otras cianobacterias, pero bajo reconocimiento antigénico por anticuerpos anti-SPP de *Anabaena* sp. PCC 7120. La proteína Sym-SPP conserva los aminoácidos reportados como involucrados en la catálisis (Asp9 responsable del ataque nucleofílico y en el extremo C-terminal una Lys que estabiliza el intermediario fosforilado). Esta proteína es un típico ejemplo donde la conservación de la estructura es lo fundamental para la actividad y especificidad catalítica.

(Financiado por FIBA, ANPCyT (PICT 2005), CONICET y UNMdP).

P48: CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA SERIN PROTEASA ATP-DEPENDIENTE, LonB, DE 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 haloalcalófilas viven en condiciones de salinidad y pH extremas (~4 M NaCl y pH 9-11), siendo *Natrialba magadii* una especie representante de este grupo. Las proteasas de estos microorganismos resultan de especial interés debido a que son capaces de tolerar condiciones extremas requeridas para algunas de sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. La degradación de proteínas dependiente de energía juega un rol fundamental en el

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 recambio de proteínas reguladoras de vida corta y en el control de calidad de las proteínas intracelulares. La serin proteasa intracelular Lon es ATP-dependiente y forma un complejo soluble en bacterias, mitocondrias y cloroplastos (LonA), en cambio en arqueas se encuentra asociada a la membrana (LonB). Lon contiene un dominio ATPasa perteneciente a la superfamilia AAA⁺ y un dominio proteolítico con una particular diada catalítica S-K. Las proteasas Lon son enzimas claves en la proteólisis selectiva manteniendo la homeostasis celular, sin embargo, aún no se conoce su rol fisiológico en las arqueas y no han sido caracterizadas en el grupo de las haloarqueas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la serin proteasa Lon de *Nab.magadii* mediante el clonado del gen y el análisis del perfil de expresión de transcritos de Lon a lo largo de la curva de crecimiento en *Nab.magadii*. El gen completo se obtuvo a través de dos estrategias diferentes: 1) mediante el *screening* de una biblioteca genómica de *Nab.magadii* con una sonda específica obtenida por PCR, utilizando la información de secuencias del gen *lonB* de los genomas haloarqueanos, 2) por PCR inversa, para conocer el extremo 5' del gen. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló un único ORF de 2340 nt que codifica un polipéptido de ~83 kDa con un pI teórico $\cong 4,8$. La proteína deducida contiene los dominios característicos de la familia de proteasas Lon, tales como el dominio proteolítico (Ser⁶⁴⁹-Lys⁶⁹⁷) y el dominio de unión a membrana dentro del módulo AAA⁺. Sin embargo, difiere del resto de proteasas LonB por poseer un número mayor de residuos Cys. Por otra parte, se analizaron los niveles de mRNA de *lon* durante las diferentes etapas del crecimiento de *Nab.magadii* mediante RT-PCR: exponencial temprana, tardía y estacionaria (DO₆₀₀=0,4; 1,1 y 2,9, respectivamente). Los resultados indicaron que la expresión de Lon es mayor en etapas tempranas del crecimiento y disminuye (~3,5 veces) en la fase estacionaria de crecimiento. Se sugiere que esta enzima participaría en el recambio de proteínas intracelulares durante el crecimiento activo. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la proteólisis en microorganismos extremófilos. (Subsidiado por ANPCyT, CONICET y UNMdP).

P49: PARTICIPACIÓN DE LA FERREDOXINA NADP(H) REDUCTASA DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* EN LA RESPUESTA A ESTRES OXIDATIVO

María Laura Tondo; María Laura Delprato; Jorgelina Ottado y Elena G. Orellano.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, UNR. Suipacha 531 S2002LRK, Rosario. E-mail: tondo@ibr.gov.ar; orellano@ibr.gov.ar

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) es una bacteria Gram (-), aerobia obligada, que infecta plantas de cítricos produciendo una enfermedad severa conocida como cancrrosis de los cítricos o cancrrosis Asiática. La infección bacteriana de una planta induce la activación de una serie de mecanismos de defensa. Una de las respuestas más tempranas, la explosión oxidativa, consiste en la rápida acumulación de especies reactivas del oxígeno (EROs), lo que constituye una barrera para el desarrollo del patógeno. La capacidad de la bacteria invasora de sobrevivir y proliferar dentro de la planta requiere de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para detoxificar rápidamente las EROs y reparar el daño oxidativo de sus componentes celulares. Una de las enzimas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo en bacterias es la ferredoxina-NADP(H) reductasa (Fpr), la cual media reacciones redox reversibles entre NADP(H) y transportadores electrónicos de un electrón, tales como ferredoxina y flavodoxina. La actividad Fpr se cree que modula la homeostasis de NADP(H) en condiciones de estrés. El objetivo de este trabajo es caracterizar la enzima Fpr de Xac y evaluar su participación en la respuesta a estrés oxidativo.

El gen *fpr* de Xac fue amplificado por PCR a partir de ADN genómico de dicha bacteria y clonado en el vector pET28. La proteína recombinante fue expresada y purificada mediante cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. Las propiedades espectrales y los parámetros cinéticos para el sustrato NADPH de la enzima purificada fueron similares a los informados para otras reductasas bacterianas. La expresión del gen *fpr* en Xac fue estudiada mediante RT-PCR y *Western blot* tanto en condiciones control como en presencia de agentes generadores de anión superóxido, tales como metil viológeno (MV) y dimetoxinaftoquinona. Los resultados obtenidos indican que el gen *fpr* se expresa en Xac en condiciones normales de crecimiento y es inducido bajo condiciones de estrés oxidativo. Por otra parte, la funcionalidad de la Fpr de Xac fue estudiada mediante complementación de una cepa de *Escherichia coli fpr⁻*, la cual presenta una mayor sensibilidad al MV. Los ensayos de inhibición del crecimiento en placas conteniendo gradientes de MV indican que la enzima de Xac es capaz de sustituir a su homólogo de *E. coli* en la respuesta a estrés oxidativo, brindando protección frente al agente oxidante. En conjunto estos resultados permiten sugerir la participación de la Fpr de Xac en la respuesta a estrés oxidativo en esta bacteria.

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
P50: SUCROSE METABOLISM GENES IN NON-PHOTOSYNTHETIC BACTERIA

Leticia L. Torres y Graciela L. Salerno.

Centro de Investigaciones Biológicas, Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), 7600-Mar del Plata, Argentina. E-mail: ltorres@fiba.org.ar

Sucrose metabolism has been described only in oxygenic photosynthetic organisms. Particularly, in prokaryotes it is found only in members of the phylum *Cyanobacteria*. These microorganisms are able to biosynthesize the disaccharide through a two step pathway catalyzed by sucrose-phosphate synthase (SPS, A/UDP-glucose: D-fructose-6-phosphate 2- α -D-glucosyltransferase, EC 2.4.1.14) and sucrose-phosphate phosphatase (SPP, sucrose-6^F-phosphate-phosphohydrolase, EC 3.1.3.24). Also they can cleave the disaccharide by the action of sucrose synthase (SuS, ADP-Glucose: D-fructose 2- α -D-glucosyltransferase, EC 2.4.1.13). SPSs and SPPs of extant organisms were proposed to be proteins with multiple domains with a modular architecture that might have arisen from primordial domains shuffled during evolution. The biochemical characterization of *Anabaena* SPSs and SPP uncovered minimal catalytic units, defined by a Glucosyl-Transferase Domain (GTD) and a PhosphoHydrolase Domain (PHD), respectively. While a single GTD is a characteristic of SPSs from filamentous cyanobacteria (e.g. *Anabaena*, *Nostoc*), the bidomainal GTD-PHD is found in most unicellular strains (e.g. *Synechocystis*, open ocean strains SPS). In contrast, all characterized SPPs are built by a single PHD and SuSs contain only a GTD. Although sucrose metabolism genes are likely to be restricted to cyanobacteria, homologs to those genes can be found in several non-photosynthetic bacterial genomes from the phylum *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Most of those homologs codified for putative proteins that show a GTD-PHD arrangement, without an extra PHD. The analysis of their genome arrangements revealed that downstream those GTD-PHD there is generally a putative SuS gene. The occurrence of sucrose-metabolism genes organized in operons in cyanobacterial genomes is scarcely observed (*Synechococcus* sp PCC 7002, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421); however, bacterial sucrose-genes homologs always display a cluster organization. Whether this SPS/SPP/SuS nucleotide sequences are related to sucrose metabolism or to other metabolic pathways is still unknown and only experimental evidence will address this question. The existence of putative sucrose metabolism-related genes in 1 out of 54 non-photosynthetic microorganisms, suggests that those sequences might have been received by lateral gene transfer from cyanobacteria. The genomic cluster organization of the bacterial putative sucrose-related genes strongly supports this hypothesis.

Supported by ANPCyT, CONICET, UNMdP and FIBA.

P51: PREDICCIÓN DE PEQUEÑOS ARNs NO CODIFICANTES (sRNAs) EN LAS REGIONES INTERGÉNICAS CROMOSOMALES DE *Sinorhizobium meliloti*.

Claudio Valverde, Gustavo Parisi, Jonathan Livny.
Programa 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 sRNAs son moléculas de ARN que no codifican polipéptidos (mRNAs) ni están directamente involucrados en el proceso de traducción en los ribosomas (rRNAs o tRNAs), sino que participan en la regulación de diversos procesos celulares a nivel post-transcripcional a través de interacciones antisentido con mRNAs blanco o indirectamente a través de la interacción con proteínas de unión a mRNA. Desde el año 2001, asistimos a una verdadera explosión de reportes de la expresión de sRNAs en diferentes especies modelo como *E. coli*, *B. subtilis* y *V. cholerae*. Las evidencias indican que la expresión de sRNAs regulatorios es un fenómeno ubicuo en los sistemas biológicos. En nuestro laboratorio comenzamos a estudiar la riboregulación (o procesos regulatorios de la expresión génica mediados por sRNAs) en la bacteria

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
Gram negativa *Sinorhizobium meliloti*, un modelo procariótico de interacción con raíces de leguminosas y de fijación biológica de nitrógeno en simbiosis.

Los sRNAs se pueden identificar mediante aproximaciones bioquímicas, genéticas o bioinformáticas. En este último caso, se requiere como mínimo la secuencia del genoma de la especie de interés y un conjunto de características de los sRNAs descritos en otras especies. En esta ocasión se presentarán los resultados preliminares de la predicción de genes que codificarían sRNAs en las regiones intergénicas del cromosoma de *S. meliloti*, sobre la base del análisis conjunto de bases de datos generadas con diferentes algoritmos predictivos y de análisis de secuencia de ADN (promotores, terminadores de transcripción Rho-independientes, orientación de ORFs vecinos, BlastN y análisis de patrones de sustitución de bases mediante QRNA). La destilación de la información predictiva generada permitió arribar a una lista de 14 regiones génicas con mayores chances de expresar sRNAs, los cuáles se encuentran en proceso de detección mediante *Northern blot* a partir de muestras de ARN total de células de *S. meliloti* sometidas a diferentes condiciones de cultivo.

SECCIÓN 5: BIOTECNOLOGÍA Y FERMENTACIONES

P52: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN FILME ACTIVO ANTIMICROBIANO CONTENIENDO BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *Lactobacillus curvatus* CRL705

Mariana Blanco Massani, Patricia Castellano y Graciela Vignolo.

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), Chacabuco 145 Tucumán, Argentina. e-mail: marianablanca@cerela.org.ar

El concepto de envase activo ha sido introducido en el mercado de alimentos a fin de extender su vida útil y/o mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los mismos como una respuesta a los continuos cambios en las demandas del consumidor. Se considera que un envase puede calificarse como activo cuando desarrolla alguna otra función que la de proporcionar una barrera inerte frente a las condiciones externas. Entre estas funciones podemos mencionar la regulación del contenido en gases (oxígeno, dióxido de carbono, etileno, etc); el control de la humedad (aditivos absorbentes, etc); la acción de diversas enzimas (control del colesterol y la lactosa) y la liberación de sustancias antimicrobianas (etanol,

bacteriocinas, funguicidas, etc). La inclusión de estas últimas en filmes despierta un gran interés en la industria alimentaria debido al consumo cada vez mayor de alimentos minimamente procesados libres de conservantes. El uso de envases antimicrobianos asegura que solo bajos niveles del biopreservante estarán en contacto con el alimento, comparado con la adición directa de los mismos en el producto. Se han estudiado como antimicrobianos para el desarrollo de envases activos ácidos orgánicos y sus sales (propionatos y sorbatos), fungicidas (imazalil, etc.), enzimas (lysozima, ect.) y bacteriocinas, entre otros. Estas últimas son sustancias producidas por numerosas especies de bacterias lácticas con capacidad inhibitoria frente a microorganismos contaminantes y patógenos de alimentos incluyendo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

El desarrollo de un filme activo antimicrobiano para ser usado en el envasado de salchichas y el estudio de sus propiedades físico-mecánicas constituyen el objetivo de este trabajo.

Se determinó la concentración mínima de las sustancias antimicrobianas, lactocina 705 y AL705 activas contra *L. plantarum* CRL691 y *L. innocua* 7 respectivamente, necesaria para obtener un filme activo. Se estudió además la influencia de la agitación y el tiempo de contacto requerido para el desarrollo del mismo. Luego de sumergir el filme en soluciones de diferentes concentraciones de las bacteriocinas producidas por *L. curvatus* CRL705, la mínima concentración necesaria para obtener un envase activo fue de 133 UA/ml y 200 UA/ml de lactocina 705 y AL705, respectivamente. El tiempo de contacto óptimo fue de una hora y el proceso de agitación favoreció solo la incorporación de lactocina AL705, bacteriocina antilisteria. Las propiedades de barrera, mecánicas y de migración tanto del filme tratado como del filme sin tratar no presentaron diferencias significativas. La posibilidad de obtener filmes activos, mediante la incorporación de bacteriocinas, destinados al envasado de productos mínimamente procesados (susceptibles a contaminaciones post-proceso) permitiría extender la vida útil y asegurar la calidad higiénico-sanitaria de los mismos.

P53: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PhaP EN *E. coli* RECOMBINANTE PRODUCTORA DE PHB

de Almeida Alejandra¹, Nikel Pablo I^{1,2}., Giordano Andrea M.¹, Méndez Beatriz S.¹, Pettinari M. Julia¹

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, ²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina. E-mail: ale@qb.fcen.uba.ar

Los plásticos biodegradables son una alternativa a los plásticos derivados del petróleo ya que pueden ser degradados por microorganismos del suelo y además pueden ser sintetizados a partir de fuentes de carbono renovables. En particular, los polihidroxialcanoatos (PHA) son los únicos plásticos 100% biodegradables. Los mismos son producidos por varios géneros bacterianos, los cuales los utilizan principalmente como sustancia de reserva bajo condiciones de crecimiento desfavorables. El PHA más conocido es el polihidroxibutirato (PHB).

Los gránulos de PHB en los productores naturales están localizados en el citoplasma y están rodeados por una capa proteica y lipídica. Las proteínas más abundantes de los gránulos se denominan fasinas, cuyos genes se denominan generalmente *phaP*. Las fasinas son proteínas hidrofóbicas, de bajo peso molecular, las cuales actúan como una barrera entre el citoplasma celular y el polímero, evitando su interacción con otros componentes celulares. En los productores naturales, las fasinas afectan el tamaño de

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 los gránulos de PHB, y la cantidad de polímero acumulado.

Los genes responsables de la síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. han sido previamente clonados en nuestro laboratorio, y expresados en *E. coli*. Una de las cepas recombinantes que producen el polímero a partir de diferentes fuentes de carbono se denominó K24K.

El objetivo de este trabajo es analizar la fisiología y la acumulación de PHB en una cepa de *E. coli* productora de PHB, que a su vez exprese la proteína fasina. Para ello se clonó el gen *phaP* de *Azotobacter* sp., y se introdujo en la cepa K24K, resultando en la cepa K24KP. La correcta expresión de la proteína fasina fue analizada mediante Western blot. Las cepas K24K y K24KP fueron sometidas a ensayos en erlenmeyer y a fermentaciones de tipo batch, con glicerol como fuente de carbono. En ambos casos se observó un mayor crecimiento y una mayor acumulación de PHB en la cepa que expresa la fasina. Estos resultados indican que la cepa que expresa PhaP presenta una mayor capacidad para producir PHB, haciéndola una mejor opción para la producción de este polímero a partir de glicerol.

P54: PRODUCTIVIDAD Y RENDIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DEL VARIETAL BONARDA EN VIÑEDOS UBICADOS EN EL VALLE DE TULUM, SAN JUAN-ARGENTINA.

Fabani MP^{1,2}, Baroni V², Toro ME¹, Wunderlin DA², Vazquez F¹.

¹Universidad Nacional de San Juan, FI, Instituto de Biotecnología, Av. San Martín 1109 (Oeste) 5400

²Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Dto. Bioquímica Clínica-CIBICI, Ciudad Universitaria, 5000.

*E-mail: paufabani@unsj.edu.ar

TE/ FAX: +54-0264-4211700

El glicerol es el mayor subproducto fermentativo producido por *Saccharomyces cerevisiae*, el cual indirectamente contribuye a los caracteres sensoriales del vino. En vinos secos es posible encontrarlo en concentraciones que oscilan entre 4-10 gL⁻¹. El glicerol es un compuesto no-volátil, pero contribuye significativamente a la dulzura natural y cuerpo del vino, por lo cual su producción por parte de levaduras se debe considerar en la selección de estas para uso enológico. La cantidad de glicerol formado durante la fermentación vínica se ve influenciada por diversos factores, como la variedad de uva, su grado de madurez, la temperatura de fermentación, la concentración de SO₂, el pH del mosto, la aireación y fundamentalmente por la cepa de levadura y su nivel de inoculación. En cuanto al proceso, se relaciona su producción con los niveles de etanol detectables en el transcurso del mismo. El **objetivo** del presente trabajo fue estudiar las características de seis aislamientos de *S. cerevisiae* respecto de la producción etanol y

glicerol y su relación respecto de las concentraciones de biomasa producidas durante el proceso. Las microvinificaciones para cada una de las 6 levaduras aisladas de *S. cerevisiae*, se realizaron por duplicado en Erlenmeyers equipados con válvulas de Müller, utilizando mosto estéril a 27° Brix, inoculado con 10^6 - 10^7 cél/mL e incubados estáticamente a 25°C durante 21 días. La producción de CO₂ se determinó por pérdida de peso de los sistemas fermentantes y mediante un factor de conversión se calculó el porcentaje de etanol producido, el peso seco de biomasa se determinó por exposición a 105°C hasta peso constante y el contenido de glicerol fue medido por HPLC mediante IR. Con los datos obtenidos se calculó la productividad y el rendimiento de etanol y glicerol. **Resultados**, Etanol: 13,5-15,4%; Glicerol: 9,8-11,7g.Lt⁻¹. Productividad (g/Lt.h), Etanol: 0,29-0,35; Glicerol: 0,020-0,023. Rendimiento (g etanol/g azúcares consumidos), Etanol: 0,54-0,66; Glicerol: 0,036-0,043. Biomasa 1,5-2,8 g.Lt⁻¹. En función de los resultados obtenidos, se concluye que las 6 levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas poseen características fermentativas satisfactorias para poder utilizarse en ensayos posteriores como inóculo en fermentaciones a escala de laboratorio y finalmente poder utilizarlas en establecimientos vitivinícolas, para obtener de este modo vinos varietales con características propias de la región estudiada.

P55: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* AISLADAS DE UVAS BONARDA, EMPLEANDO ANÁLISIS DE RFLP DE LA REGION ITS

Fabani MP^{1,2}, Toro ME¹, Castro O³, Wunderlin DA², Vazquez F¹.

¹Universidad Nacional de San Juan, FI, Instituto de Biotecnología, Av. San Martín 1109 (Oeste) 5400

²Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Dto. Bioquímica Clínica-CIBICI, Ciudad Universitaria, 5000.

³ Fundación Instituto Leloir, Av. Patricias Argentinas 435, Ciudad de Buenos Aires.

*E-mail: paufabani@unsj.edu.ar TE/ FAX: +54-0264-4211700

En los últimos años, los métodos de genética molecular han cobrado relevancia en la identificación y caracterización de levaduras relacionadas con la industria vitivinícola, comparados con métodos tradicionales basados en características morfológicas y fisiológicas. Este interés se debe a que estas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo, pudiendo dar resultados inciertos. Además, se necesitan de 50-100 ensayos para tener una identificación adecuada. Las técnicas de biología molecular son de ejecución sencilla, con tiempo de realización relativamente corto y poseen una alta reproducibilidad, independiente del estado fisiológico del cultivo. El **objetivo** del trabajo fue confirmar

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 mediante técnicas moleculares de RFLP en la región 5.8S-ITS, 6 aislamientos del varietal Bonarda que habían sido identificadas previamente por métodos bioquímicos como *Saccharomyces cerevisiae*. Se realizó el aislamiento y cuantificación del ADN total. Posteriormente se analizó los perfiles de restricción (RFLPs) del ADN ribosomal de la región 5.8S-ITS, la cual se amplificó empleando los primers ITS1 e ITS4. El ADN amplificado fue digerido sin previa purificación con las enzimas de restricción *HaeIII* e *HinfI*, e incubado a 37°C durante toda la noche. También se obtuvieron los perfiles de restricción (RFLPs) del ADN mitocondrial realizando la digestión del ADN total con la enzima *HinfI* e incubado a 37°C durante 24 horas. Los productos de PCR y sus fragmentos de restricción, así como el ADN total digerido, fueron separados en geles de azarosa al 1% y 2%, mediante electroforesis. **Resultados:** La región 5.8S-ITS amplificada por PCR mostró una banda de aproximadamente 850 pb, los patrones de bandas para las enzimas fueron para *HinfI* (365+155) y para *HaeIII* (320+230+180+150), correspondiendo dichos tamaños a patrones de bandeado de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los perfiles de ADNm permitieron diferenciar a nivel de cepa los aislamientos. Con los resultados obtenidos se confirmó la identificación previa realizada empleando métodos tradicionales, aunque en menor cantidad de tiempo y además permitió agrupar los aislamientos en tres clases de cepas diferentes en función de los resultados de los perfiles de ADNm obtenidos.

P56: PRODUCCION DE SURFACTINA POR *Bacillus subtilis* O9 Y RECUPERACION POR FORMACION DE ESPUMA

Marcelo Flores^{1,3}, María Ester Lucca^{2,3}, Joaquín A. Orejas¹

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.

²Microbiología Superior, Facultad de Bioquímica, Qca. y Farmacia, UNT

³PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET

e-mail: mflores@ing.unrc.edu.ar,

jorejas@ing.unrc.edu.ar

Surfactina reduce la tensión superficial del agua desde 72 a 28 mN m⁻¹. Tiene capacidades detergentes, emulsificantes, de formación de espumas y dispersiones, que lo convierten en un componente químico de gran versatilidad y de extensa aplicación en diversos procesos.

En el presente trabajo se realiza un estudio de la producción de surfactina por *Bacillus subtilis* O9, en un biorreactor de tanque agitado aireado, operado en forma discontinua. La espuma fue colectada en forma continua en recipientes estériles a medida que se

producía, para lo cual se diseñó un tubo colector, y fue almacenada a -18 °C para favorecer su colapso. Las experiencias fueron realizadas en un biorreactor Applikon con un volumen de trabajo de 1.7 litros, provisto de un agitador tipo Rhuston. La velocidad de agitación fue 200 rpm y el caudal de aire 1 v.v.m. La temperatura se mantuvo en 30 °C y el pH en 7. El medio de cultivo fue químicamente definido. Como fuente de carbono se empleó sacarosa.

La capacidad de transferencia de oxígeno define claramente dos etapas en el proceso de producción, una primera etapa donde se favorece la producción de biomasa y una segunda etapa donde se favorece la producción de surfactina. En la etapa inicial la concentración de biomasa aumentó exponencialmente alcanzando la velocidad específica de crecimiento máxima de 0.45 h⁻¹ y la concentración de sacarosa disminuyó sólo un 6.2 %. Por su parte la producción de surfactina y la generación de espuma fueron muy bajas. La segunda etapa se desarrolló en condiciones de agotamiento de oxígeno disuelto, disminuyó la velocidad específica de crecimiento, el consumo de sacarosa aumentó y la producción de surfactina, al igual que la formación de espuma, aumentaron drásticamente. El volumen colectado de espuma presentó un aumento de 11,3 veces el valor de las 10 horas, en tanto que para la producción total de surfactina el aumento fue de 6,76 veces.

La producción de surfactina final fue de 1.37 gr a las 30 horas, de los cuales el 98.3 % se encontraba en la espuma. Los resultados experimentales presentados muestran que la extracción continua de espuma es un excelente método de recuperación y concentración de surfactina del caldo de cultivo. También permite disminuir los costos de extracción y purificación.

P57: EFECTO PROTECTOR DE TREALOSA Y SACAROSA EN *Lactobacillus kefir* DESHIDRATADO POR CALOR

Natalia Gambino^{1,2}, Elizabeth Tymczyszyn¹, Andrea Gómez-Zavaglia¹

¹ Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956 2ºP. (1113) Buenos Aires

² Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Maimónides. Hidalgo 775 (1405) Buenos Aires
gambinonatalia@gmail.com

El kefir es una leche fermentada originaria del Cáucaso euroasiático que se obtiene inoculando la leche con los gránulos de kefir. Estos gránulos están compuestos por un 10 % de materia seca (grasa -0.3 %-, proteína -3.3%-, sustancias solubles no nitrogenadas -5.8 %- y cenizas -0.7 %-) y contienen una microflora compleja constituida por bacterias lácticas y levaduras que se desarrollan en asociación simbiótica [1-4]. En los gránulos del kefir coexisten diversos microorganismos

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
que interactúan entre sí y pueden producir desbalances que traen aparejadas variaciones de calidad en el producto y una consecuente disminución del valor comercial. Por esta razón, es importante seleccionar los microorganismos más apropiados desde el punto de vista tecnológico y probiótico y establecer las condiciones ideales de fermentación y conservación que aseguren su máxima recuperación.

Así, este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto protector de trehalosa y sacarosa en el secado por calor de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348. Para ello cultivos en fase estacionaria fueron deshidratados en centrífuga de vacío a 70 °C durante 30 minutos en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de trehalosa o sacarosa. Se determinó el tiempo de latencia y el número de bacterias viables con el fin de evaluar la concentración más adecuada de protector para cada condición de secado.

Tanto la trehalosa como la sacarosa resultaron ser efectivas sustancias termoprotectoras ya que aumentaron significativamente el número de células viables y disminuyeron el tiempo de latencia de las cinéticas de crecimiento luego de la deshidratación por calor.

Agradecimientos: la cepa utilizada para la realización de este trabajo ha sido obtenida del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

Referencias

- [1] Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grain. J. Dairy Res. 68(4): 639-652.
- [2] Abraham, A., De Antoni, G. (1999) Characterization of kefir grains grown in milk and in soy milk. J. Dairy Res. 66: 327-333
- [3] Arana, I., Ortigosa, M., Irigoyen, A., Ibáñez, F.C., Torre, P. (2005) Isolation and identification of potentially probiotic lactobacillus strains from kefir. Milchwiss. 292-294
- [4] Kuo, C.Y., Lin, C.W. (1999) Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. Aust. J. Dairy Technol. 54: 19-23.

P58: INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE *STREPTOCOCCUS EQUI* Y EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Darío Gómez¹, Faustino Siñeriz², Joaquín Orejas¹

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.

²PROIMI (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) CONICET
e-mail: dgomez@ing.unrc.edu.ar,
jorejas@ing.unrc.edu.ar

El ácido hialurónico (AH) es un mucopolisacárido, constituido por unidades repetitivas de ácido D - glucurónico y N-acetilglucosamina. Posee importantes funciones biológicas y estructurales en el cuerpo, debido entre otras, a sus distintivas propiedades viscoelásticas. Su biocompatibilidad y características fisicoquímicas, hacen del AH un producto de amplia aplicación en las industrias farmacéuticas y cosméticas. Se halla en los tejidos blandos de animales superiores, incluyendo al ser humano. Tradicionalmente, se extrae de animales, pero debido al riesgo de infecciones virales y al alto costo de purificación asociado a estas fuentes, dicha tecnología esta siendo desplazada por la de cultivos bacterianos.

S. equi subsp. zooepidemicus y *S. equi subsp. equi*, son las dos subespecies típicas empleadas en su obtención. Estas bacterias producen ácido láctico (AL) y son nutricionalmente exigentes. Es por esto que crecen sobre medios de cultivo complejos conteniendo extracto de levadura, peptonas o suero.

El objetivo del trabajo es determinar la composición de un medio de cultivo que permita obtener buenos rendimientos de AH. El microorganismo empleado es *S. equi subsp. equi DGV06*, aislado y caracterizado en la UNRC (Gómez y otros (2006)). Se realizaron experiencias en erlenmeyer en las que se cuantificaron a lo largo del tiempo: concentración de biomasa, AH, glucosa residual y AL. La temperatura fue mantenida en 37°C, velocidad de agitación de 180 rpm, aerobiosis y pH controlado sólo por la acción de la solución amortiguadora incluida en el medio de cultivo.

Una serie de experiencias se realizaron empleando el medio formulado por Armstrong y Johns (1997). Se obtuvieron así, bajos rendimientos en biomasa y AH a lo largo de todo el cultivo. Esto se interpretó como una consecuencia del rápido descenso de pH del medio de cultivo, originado por la producción de AL, la que excede la capacidad amortiguadora del medio empleado. Por esta razón se definió un nuevo medio al que se le incorporó un amortiguador de pH distinto, además de disminuir la concentración de fuentes de carbono y de nitrógeno utilizadas en el medio original.

Las mejoras fueron sustanciales. La máxima concentración de biomasa aumentó 2.5 veces, en tanto que la de AH fue 41.3 veces mayor. Se estima que estas mejoras son consecuencia de que el pH en la

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
formulación desarrollada, nunca fue inferior a 6.14 en tanto que en el medio de partida descendió hasta valores del orden de 4.5

P59: ACTIVIDAD LIPASICA Y ESTERASICA DE LAS QUERATINASAS DE *Paecilomyces marquandii* Y *Doratomyces microsporus* EN BIOTRANSFORMACIONES

L. Imanishi^a, M. A. Zinni^a, M. Mohorčić^b, J. Friedrich^b, L. E. Iglesias^a, y A. M. Iribarren^{a,c}.

^aUniversidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 180 - (1876) Bernal, Provincia de Buenos Aires,

^bNational Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, SI-1000 Ljubljana, Eslovenia, ^cINGEBI (CONICET) - Vuelta de Obligado 2490 - (1428) Buenos Aires. E-mail: leiglesias@unq.edu.ar

La selectividad de las enzimas, su capacidad de operar en condiciones suaves de reacción y su carácter sustentable hace que la biocatálisis, a través de las biotransformaciones, provea una metodología muy conveniente para aplicar en química orgánica de síntesis.

Uno de las clases de enzimas más empleadas en biocatálisis son las hidrolíticas, entre las que se destacan las lipasas, esterasas y proteasas. Muchas de estas enzimas son extracelulares, fácilmente accesibles y conducen a la obtención selectiva de compuestos orgánicos difíciles de obtener satisfactoriamente por otros procedimientos.

Dentro de las enzimas hidrolíticas, las queratinasas son un tipo de proteasas extracelulares que *in vivo* hidrolizan queratinas y pertenecen a la familia de las serina-proteasas. Presentan resistencia a altas temperaturas y al pH e hidrolizan enlaces peptídicos, con reconocimiento de una amplia variedad de aminoácidos.

Debido a que no hay antecedentes sobre el comportamiento de las queratinasas en biocatálisis, en nuestro laboratorio estamos estudiando la actividad de las queratinasas de *Paecilomyces marquandii* (PMK) y *Doratomyces microsporus* (DMK) frente a sustratos no naturales. Las muestras de PMK y DMK se obtuvieron mediante un cultivo sumergido del hongo en un bioreactor de laboratorio. A partir del medio extracelular, las correspondientes enzimas se semipurificaron por ultrafiltración, diálisis y liofilización, obteniéndose un crudo sobre el que se realizaron los estudios de actividad.

Se efectuaron ensayos de determinación de la actividad lipásica y esterásica de ambas queratinasas empleando, respectivamente, palmitato de p-nitrofenilo y acetato de p-nitrofenilo, comparando los resultados obtenidos. Por otra parte, como modelo de sustrato no natural se eligió aspartamo (Asp-PheOMe), que contiene un enlace peptídico y un enlace éster, y se estudió su hidrólisis catalizada por PMK y DMK. El análisis de los productos formados durante las

biotransformaciones sugieren mecanismos de hidrólisis diferentes para cada queratinasa.

Referencias

1. H. Gradisar, S. Kern, J. Friedrich, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000** 53, 196.
2. H. Gradisar, J. Friedrich, I. Krizaj, R. Jerala, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005** 71, 3420.

P60: INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS DE *Aspergillus flavus* AFUBA5 CON SOBRENADANTES DE KEFIR. León Peláez, A^{1,2,3}. De Antoni, G.L^{1,2,4}. Giannuzzi, L^{2,1}. Cátedra de Microbiología UNLP,²CIDCA-Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos.Calle 47 y 115.La Plata, Argentina.³Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.⁴CICPBA. aleon@farmacia.udea.edu.co.

Aspergillus flavus y *A.parasiticus* causan pérdidas económicas en alimentos en zonas tropicales y la ingesta crónica de aflatoxinas se asocia al cáncer de hígado, teratogénesis e inmunosupresión. En Colombia, el consumo de “arepa Antioqueña”, producto derivado de maíz contaminado con hongos y aflatoxinas se asocia al cáncer gástrico y de hígado. El estudio de leche fermentada de kefir es una alternativa para inhibir hongos y secuestrar toxinas, siendo adicionada durante la fabricación de la arepa, convirtiéndola en un producto de valor probiótico.

El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones de fermentación del Kefir que reducen e inhiben *in Vitro* el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas del hongo toxigénico AFUBA5.

Se obtuvo kefir con gránulo al 10% en leche, a 20, 30 y 37°C y a pH final 4,5, 3,5, 3,3 y 3,0. Al agar extracto de malta se le adicionó sobrenadante de kefir en concentraciones 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000, inoculando el hongo en el centro del agar e incubando a 30°C. A partir del diámetro de las colonias en función del tiempo, se calculó la velocidad de crecimiento radial (K_d) (mm/h) y la fase de latencia (lag) (h) como medida de la inhibición o retraso en el crecimiento fúngico. La concentración de ácido acético y láctico en el sobrenadante se determinó por cromatografía de HPLC y la concentración de micotoxinas en el medio de cultivo por Inmunofluorescencia. A pH 4,5, 3,5 y 3,3 los valores medios de K_d son respectivamente 0,67, 0,54 y 0,51 y Lag. 14,6, 21,7 y 25,8. A pH 3,0 se alcanza inhibición total. Sólo se observó efecto inhibitorio significativo con respecto al control ($p < 0,05$) en las diluciones 1:1 y 1:10. De las tres temperaturas ensayadas, a 37°C se presentó un aumento significativo del poder inhibitorio, lo cual se relaciona con la presencia de un pico correspondiente al ácido propiónico determinado por HPLC.

El descenso de retraso K_d por la acción sinérgica del ácido acético-láctico y propiónico. La concentración de aflatoxinas disminuye empleando sobrenadantes a pH

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 3,5 y 3,3 en valores de 10,23 ppb y 3,498 ppb respectivamente y ésta es inferior al límite máximo permitido en Colombia de 20 ppb. De allí que el kefir es un producto de uso potencial como bioconservante en la fabricación de productos fácilmente contaminables por hongos y será evaluado en la fabricación de la “arepa antioqueña”.

P61: CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA ÓPTIMAS DE GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS PARA SU USO COMO INOCULANTE

Giorello N, Gómez C, Molinari L y Luna F*
CINDEFI-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas-UNLP, 50 e/115 y 116. La Plata, Bs As, CP 1900.
*mafla@quimica.unlp.edu.ar

El empleo de microorganismos como fitoestimulantes o biocontroladores es una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes y agroquímicos en pos de una agricultura sustentable. Las bacterias pioneras en esto fueron las del género *Rhizobium*, utilizadas en la práctica agrícola por su capacidad de fijar nitrógeno en asociaciones simbióticas con leguminosas. Actualmente, además de este último, se han descrito una gran variedad de mecanismos por los cuales los microorganismos, llamados PGPB (plant-growth-promoting-bacteria), ejercen efectos beneficiosos sobre las plantas. El grupo de PGPB incluye bacterias de diferentes especies y cepas dentro de los géneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, entre otros. Nuestro grupo de trabajo ha comenzado a estudiar la interacción planta-microorganismo entre varias especies vegetales y *G. diazotrophicus*, diazótrofo endófito natural de caña de azúcar. Consideramos que es imprescindible el uso de un “buen inoculante” tanto en los ensayos en invernadero como a campo para evaluar los posibles efectos beneficiosos que un microorganismo puede ejercer sobre las plantas en estudio, ya que el empleo de un inoculante con un bajo recuento inicial, o baja supervivencia, puede enmascarar algún efecto positivo ejercido por el microorganismo sobre el vegetal. En el presente trabajo, se ha estudiado el crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL 5 bajo diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de obtener suspensiones de alta concentración celular y que se mantengan viables por un largo período de tiempo. Como resultado de una serie de ensayos con diferentes medios de cultivo se obtuvieron valores de concentración celular del orden de 1.10^{10} UFC.mil⁻¹ a las 48 hs de proceso con un valor de pH cercano a 6, un consumo prácticamente total de la fuente de carbono y producción de polisacáridos extracelulares. Con las suspensiones obtenidas se evaluó la capacidad de colonización de los microorganismos en plantas de trigo y sorgo utilizando diferentes dosis de inoculante. A tiempo cero

postinoculación (PI) de la semilla no se observaron diferencias entre los inóculos procedentes de los diferentes cultivos y se encontró población endofítica inclusive cuando la dosis empleada fue del orden de 10^2 UFC por semilla. Por otro lado, se evaluó la supervivencia de los microorganismos tanto en los medios líquidos obtenidos como en las semillas inoculadas. En medio líquido se mantuvo un título de 10^8 UFC.ml⁻¹ a los 6 meses y en la semilla los microorganismos permanecieron viables a los 15 días PI, y con un título mayor con el agregado de exopolisacárido de este microorganismo como aditivo.

P62: DETECCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LEVADURAS AUTÓCTONAS DE USO ENOLÓGICO

Maturano Y.P.¹, Toro M.¹, C. de Figueroa L.² & Vazquez F.¹

(¹) Instituto de Biotecnología-FI-UNSJ-CONICET. Av. San Martín 1109 (O) San Juan. (²) PROIMI. Av. Belgrano y P. Caseros. Tucumán.

p maturano@unsj.edu.ar

Introducción: La Fermentación del mosto de uva en vino puede describirse como el producto de la acción de un cultivo mixto de microorganismos que involucra tanto a levaduras del género *Saccharomyces* (generalmente predominante en las fermentaciones vínicas), como a otros géneros, comúnmente denominados no-*Saccharomyces*, que contribuyen a los caracteres organolépticos del vino. En el proceso de vinificación es importante determinar el potencial de las levaduras autóctonas para producir enzimas hidrolíticas que modifican ciertos componentes de los mostos y de esa forma resaltar los atributos sensoriales de los vinos. Diversos tipos de actividades enzimáticas producidas por levaduras pueden contribuir al mejoramiento tanto del proceso de elaboración como de la calidad del vino.

El **objetivo** de esta investigación fue determinar actividades enzimáticas en cepas de levaduras autóctonas de origen enológico.

Metodología: Se emplearon 161 cepas de levadura del Ceparario del Instituto de Biotecnología-UNSJ: 45 no-*Saccharomyces*, 111 *Saccharomyces* sp., 5 cepas de referencia: *Pichia stipitis* NCYC1940, *Saccharomyces cerevisiae*: ATCC38636, ATCC36900. *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomycopsis fibuligera*. Se ensayaron las siguientes actividades enzimáticas: amilolítica, xilanolítica, lipolítica, pectinolítica, proteolítica, celulolítica, esterasa, β -glucosidasa. La Determinación cualitativa se llevó a cabo mediante detección en placa con medios inductores específicos para cada actividad. La presencia de actividad enzimática se confirmó mediante la formación de halos de inhibición alrededor de las colonias de levaduras sembradas sobre dichos

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 medios específicos. Todos los experimentos se desarrollaron bajo dos valores de pH: 4,5 y 6,5 y se incubaron a 25°C durante 1 semana.

Resultados: el 100% de las cepas de levaduras expresaron al menos una actividad enzimática. A pH 4,5 todas las cepas presentaron actividad lipolítica y a pH 6,5 el 97,43% de las mismas. Por otro lado, no se encontraron actividades amilolítica, xilanolítica, celulolítica y pectinolítica bajo condiciones de pH 4,6. Sólo las no-*Saccharomyces* presentaron actividades celulolítica, amilolítica, xilanolítica en proporciones de 22,22%(10/45), 26,66%(12/45) 15,55%(7/45) respectivamente. Acerca de la actividad β -glucosidasa, el 24,35% de las cepas fueron positivas en ambas condiciones de pH ensayadas.

Conclusión: este estudio revela el potencial que poseen las levaduras autóctonas, tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*, para producir enzimas con aplicación positiva desde el punto de vista enológico. De esta manera, existe una alternativa para la introducción de nuevas formas y procedimientos en la elaboración de este tipo de productos.

P63: CARACTERES CULTURALES Y DE LA ACTIVIDAD HESPERIDINA HIDROLASA DEL ACTINOMICETO SES201

Laura Mazzaferro, Marisol Minig, Javier D. Breccia Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas Y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). Ruta 35, km 334, (6300) Santa Rosa, La Pampa. Email: lsmazzaferro@exactas.unlpam.edu.ar

Los precursores de aroma en la uva son principalmente conjugados di-glicosilados de residuos alifáticos, C₁₃-norisoprenoides, metabolitos del ácido shikímico y monoterpenos (Linskens & Jackson, 1995). La liberación de los compuestos volátiles se produce naturalmente durante la maduración del vino. Sin embargo en los vinos básicos el tiempo de maduración no es suficiente para desarrollar un bouquet de calidad, dando lugar a la utilización de biocatalizadores como aditivos para acelerar dicho proceso.

El actinomiceto SES201 aislado en nuestro laboratorio, produce una hidrolasa disacárido específica (HSPasa) cuando crece en hesperidina como fuente de carbono (Mazzaferro y Breccia, 2005). Este es capaz de crecer en el rango de pH de 4.5 a 10. El análisis de imágenes de las colonias microbianas aplicando el software ERDAS[®] viewfinder 2.1 mostró un incremento de la fase de latencia a bajos valores de pH (pH 4.5; 2.3 días y pH 8.0; 0.6 días), junto a una fuerte tendencia a alcalinizar el medio de cultivo, mientras que la mayor velocidad de crecimiento se detectó en el plateau de pH 6 - 8.

Para evaluar el potencial de la actividad HSPasa producida por la cepa SES201 se midió el efecto de diferentes concentraciones de etanol sobre la actividad. Se observó que a la concentración de etanol normalmente encontrada en vinos ($\approx 12\%$ v/v), la actividad remanente es del 11%. Estos datos contrastan con las glicosidasas descritas en la literatura cuya actividad disminuye un 50% en presencia de 12% v/v etanol (Orrillo et al., 2007; Spagna et al., 2000). Por otra parte, se detectó un 60% de unión a butil-agarosa en ausencia de sales cosmotrópicas. Estos datos nos llevaron a estudiar la localización de la enzima, esta se encontró unida a las células durante el crecimiento micelial del microorganismo, mientras que se detectó en forma soluble luego de la esporulación. En contraste con la mayoría de las glicosidasas descritas que son intra o extracelulares. Todos los datos mencionados sugieren la presencia de dominios hidrofóbicos en la estructura proteica.

P64: GLICOSIL-HIDROLASAS DEL ACTINOMICETO SES201

Marisol Minig, Laura Mazzaferro, Javier D. Breccia
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). Ruta 35, km 334, (6300) Santa Rosa, La Pampa. Email: marisolminig@exactas.unlpam.edu.ar

Las glicosidasas (EC 3.2.1.-) poseen un importante número de aplicaciones biotecnológicas, tal es el caso del mejoramiento del aroma de vinos básicos por deglicosilación de los terpenoides precursores del aroma. También la hidrólisis de flavonoides en la industria cítrica para la clarificación o reducción del sabor amargo de los jugos de fruta. Dado que dichos compuestos contienen un residuo disacárido en su estructura, los extractos comerciales utilizados contienen varias actividades enzimáticas (α -L-ramnosidasa y β -D-glucosidasa entre otras), realizando una liberación secuencial de los monosacáridos constituyentes (Van Rensburg & Pretorius, 2000).

La cepa SES201 aislada en nuestro laboratorio, produce una hidrolasa disacárido específica, capaz de hidrolizar hesperidina en sus dos componentes: el disacárido rutinosa y la flavanona hesperetina (Mazzaferro y Breccia, 2005). Esta enzima, muestra actividad a bajos valores de pH (aprox. 25% en el rango pH 2.5-3.5), lo que la hace apta para emplearse en una biotransformación de alimentos como la deglicosilación de precursores de aromas o sabores amargos en un único paso.

La producción de la actividad hesperidinasa (HSPasa) en cultivo continuo del actinomiceto SES201, se indujo con pulsos de distintos flavonoides (hesperidina,

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 naranjina y rutina). Presentó la máxima producción de HSPasa a las 24 h con hesperidina y naranjina. Mientras que con rutina la máxima producción fue a las 5 h. Esto sugiere la existencia de distintos mecanismos de inducción, o bien la presencia de más de una enzima con actividad sobre hesperidina. Estos tiempos de inducción coinciden con las diferencias estructurales de los flavonoides en la unión del disacárido a la aglicona, en C₇ para hesperidina y naranjina y C₃ en rutina.

Los cultivos en lote con los flavonoides antes mencionados como fuente de carbono, mostró la inducción de 2 actividades específicas de los flavonoides hesperidina y rutina. Ambas actividades se encuentran bajo purificación y caracterización.

P65: OPTIMIZACION DE LA BIOCONVERSION DE XILOSA EN XILITOL EN ESCALA INDUSTRIAL

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

El xilitol es un azúcar alcohol no calórico importante para la industria alimenticia y farmacéutica. Este polialcohol tiene propiedades anticariogénicas y además puede ser suministrado a personas diabéticas. Se utiliza fundamentalmente para la fabricación de golosinas y dentífricos. Las levaduras, especialmente las del género *Candida*, son las que bioconvierten xilosa en xilitol. Este bioproceso depende de variables de operación tales como: pH, nivel de oxigenación, temperatura, concentración de los constituyentes del medio de cultivo, etc.

El objetivo de este trabajo es seleccionar cepas de levaduras productoras de xilitol, teniendo en cuenta fundamentalmente, las condiciones de operación, los valores de rendimiento y productividad.

Se utilizaron las siguientes cepas de levaduras: *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426, *Candida parapsilosis* NRRL Y-12969, *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075, *Candida boidinii* NRRL Y-2332, *Candida tropicalis* NRRL Y-12968. En fermentaciones en pequeña escala, usando medios inóculos, se determinó la concentración de biomasa mediante peso seco y N° de células/mL utilizando la cámara de Neubauer en el microscopio, además se midió la evolución del pH y de las concentraciones de xilosa y de xilitol durante el tiempo del proceso. Se optimizaron diferentes métodos analíticos: xilosa, DNS (azúcares reductores-dinitrosalicílico-espectrofotómetro); xilosa y xilitol, mediante el uso del HPLC: columna LiChrosorb-NH₂, 5 μ m, 200 x 46 mm, detector IR; se varió la polaridad de la fase móvil, mediante la variación de la concentración de acetonitrilo y de agua, también se estudió el efecto del pH, del caudal del flujo y de la concentración de las muestras detectables.

En los ensayos realizados se determinó que 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* (20,09; $5,07 \times 10^9$), *C. tropicalis* (6,27; $1,91 \times 10^9$) y *C. parapsilosis* (2,85; $2,53 \times 10^8$) a las 40; 20 y 40 horas de fermentación, respectivamente. 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* son más esféricas. En cuanto al tamaño no hay diferencias. Mientras que *D. hansenii* fue la de menor desarrollo de biomasa con un valor máximo de 1,67 g/L y $7,50 \times 10^{10}$ 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*. Los valores de pH alcanzados al final fueron entre 2,5-3,0. Del análisis de las diferentes curvas de crecimiento se determinó, la velocidad específica de crecimiento (μ), calculada entre el tiempo cero y tiempo en donde se registró el máximo N° de microorganismos se obtuvieron los valores en (h^{-1}): *C. boidinii*, 0,24; *D. hansenii*, 0; *C. parapsilosis*, 0,19; *C. guilliermondii*, 0,2 y *C. tropicalis*, 0,27.

P66: EVALUACIÓN DE MUTANTES *arcA* DE *Escherichia coli* PARA LA SÍNTESIS MICROAERÓBICA DE ETANOL A PARTIR DE GLICEROL

M. Cecilia Ramírez¹, Pablo I. Nikel^{1,2}, Miguel A. Galvagno^{1,3}, Beatriz S. Méndez²

¹Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM-CONICET, 1650, San Martín; ²Dpto. Química Biológica, FCEyN; y ³Dpto. Ingeniería Química, FI, Universidad de Buenos Aires, 1428, Ciudad Universitaria. E-mail: pablo@qb.fcen.uba.ar

En *Escherichia coli* el control de las vías metabólicas por redes regulatorias globales permite al microorganismo optimizar la generación de energía de acuerdo a los niveles de O₂ en el medio. El sistema de transducción de señales de dos componentes ArcAB modula la expresión de alrededor de 135 genes de acuerdo con las condiciones redox de crecimiento y la disponibilidad de O₂. La utilización de mutantes *arc* de *E. coli* para la síntesis de metabolitos reducidos de interés biotecnológico (e.g., etanol, succinato, polihidroxicanoatos) en bioprocesos desarrollados en condiciones de baja disponibilidad de O₂ podría constituir una alternativa interesante a los procesos biotecnológicos tradicionales, normalmente aeróbicos. Por otro lado, resulta muy importante estudiar la fisiología de *E. coli* en condiciones de cultivo compatibles con bioprocesos industriales.

Se trabajó con *E. coli* CT1061 (*arcA::IS10*) transformada con el plásmido pADH_{Lm} (porta el gen *adhE* de *Leuconostoc mesenteroides*, que codifica una acetaldéhidol/alcohol deshidrogenasa bifuncional) y se

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 evaluaron distintas condiciones de cultivo conducentes a maximizar la síntesis de etanol, disminuyendo al mismo tiempo la producción de metabolitos de fermentación oxidados (e.g., acetato y lactato). En una primera etapa, se trabajó en frascos agitados en condiciones microaeróbicas, obteniendo $9,3 \pm 0,4$ g etanol L⁻¹ en cultivos de 72 h en un medio semi-sintético conteniendo 30 g glicerol L⁻¹ (un sustrato carbonado promisorio para su utilización biotecnológica, dado que constituye un sub-producto de la industria del biodiesel). Al mismo tiempo, se produjeron 1,2 g acetato L⁻¹ (acetato/etanol = 10 mol mol⁻¹) y 0,8 g lactato L⁻¹. El desvío de la fuente carbonada hacia la síntesis de lactato se evitó construyendo una mutante *ldhA* (lactato deshidrogenasa) derivada de CT1061. Para maximizar la productividad volumétrica de etanol, se trabajó en cultivos en dos etapas en biorreactor. Luego de 12 h de crecimiento aeróbico ($\mu = 0,25 h^{-1}$) se suprimió el suministro de O₂, estableciéndose rápidamente condiciones microaeróbicas. En dichos cultivos (48 h), se alcanzaron concentraciones de $23,9 \pm 1,2$ g etanol L⁻¹. El rendimiento respecto a glicerol fue $Y_{P/S} = 1,33 g g^{-1}$, y la productividad volumétrica total fue 0,49 g etanol L⁻¹ h⁻¹ (3,9 veces mayor que la obtenida en frascos agitados). Nuestros resultados muestran que esta mutante puede utilizarse como biocatalizador eficiente para la síntesis de compuestos reducidos en condiciones de baja disponibilidad de O₂.

P67: DESHIDRATACIÓN DE *Lactobacillus bulgaricus*: EVALUACIÓN DE LOS SITIOS DE DAÑO Y LA ACCIÓN PROTECTORA DE LOS AZÚCARES

Elizabeth Tymczyszyn, Rosario Díaz, Andrea Pataro, Natalia Sandomato, Andrea Gómez - Zavaglia, Anibal Disalvo.

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956 2°P. (1113) Buenos Aires. elitym@yahoo.com.ar

Estudios previos sobre *Lactobacillus bulgaricus*, mostraron que sustancias protectoras como trehalosa, sacarosa o maltosa aumentan la recuperación de estos microorganismos durante la deshidratación térmica y osmótica. [1-2].

La ausencia de agua puede generar cambios estructurales en membranas y proteínas que reducen la viabilidad celular cuando éstas son rehidratadas.

Uno de los factores que aumentan la eficiencia en los procesos de conservación por deshidratación es la adición de moléculas que pueden sustituir agua en las estructuras biológicas, como por ejemplo diferentes azúcares, denominados termoprotectores.

El objetivo de este trabajo es estudiar la evolución del daño producido en bacterias lácticas durante las etapas de deshidratación y establecer en cada una de

ellas los cambios en la capacidad de recuperación midiendo a) la viabilidad, b) el potencial superficial y e) el volumen celular de *L. bulgaricus*.

Cada una de estas propiedades se determinó en función de la actividad de agua remanente después del proceso de deshidratación por calor y vacío a diferentes temperaturas y se relacionó con el daño a membrana y a proteínas a través de las medidas de permeabilidad y de la actividad proteolítica. La disminución de la actividad de agua mostró un daño progresivo de todas las estructuras celulares, siendo la membrana el principal sitio de daño. La presencia de azúcares modifica el límite de actividad de agua que puede alcanzarse sin provocar daños irreversibles tanto a nivel de la membrana como de la actividad enzimática. El mantenimiento del potencial superficial y el volumen celular se relacionó con la mayor capacidad de recuperación de bacterias luego del proceso de deshidratación-rehidratación en presencia de sacarosa. Agradecimientos: la cepa utilizada para la realización de este trabajo ha sido obtenida del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

Referencias

[1] Gómez Zavaglia A.; Tymczyszyn E. E., De Antoni G., Disalvo E. A. J Appl Microbiol, 95 (2003) 1315–1320

[2] E.E. Tymczyszyn, A. Gómez-Zavaglia and E.A. Disalvo. J Appl Microbiol 102 (2007) 845-851

P68: GLICOSILACIÓN DE MACROLIDOS POR EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA RUTA DEL AMINOAZÚCAR L-MEGOSAMINA EN *Escherichia coli*.

Salvador Peiru, Mariana Useglio, Eduardo Rodriguez y Hugo Gramajo.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR) - Area Microbiología CONICET, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, (S2002LRK) Rosario, Argentina. E-mail: erodriguez@ibr.gov.ar

Megalomicina es un compuesto policetónico producido por *Micromonospora megalomicea* constituido por un esqueleto macrolactona de 14 miembros con tres residuos de azúcares unidos al mismo. Este compuesto posee una estructura similar a la eritromicina con el agregado del aminoazúcar L-megosamina en la posición C-6. Originalmente fue descubierto como agente antibacteriano inhibidor de la síntesis proteica, sin embargo recientemente se observó que este compuesto inhibe fuertemente la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ 2 µg/ml) y amastigotes intracelulares. Debido a que la eritromicina no muestra actividad frente a *T. cruzi*, se ha propuesto que el residuo de L-megosamina es fundamental para la actividad antiparasitaria de megalomicina. En este trabajo identificamos y expresamos en forma heteróloga los

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
genes involucrados en la biosíntesis de L-megosamina. Para ello cada gen fue amplificado y clonado secuencialmente en vectores de expresión para *Escherichia coli*, formando el operón megosamina. La expresión de cada gen fue confirmada por SDS-PAGE y la ruta de biosíntesis de L-megosamina completa fue verificada a través de experimentos de bioconversión. De esta manera, mediante el agregado de eritromicina A, como así también azitromicina, a cultivos de *E. coli* que expresaban el operón megosamina pudimos obtener la correspondiente 6-megosaminil-eritromicina A y 6-megosaminil-azitromicina. Estos resultados no solo verifican el correcto funcionamiento de la ruta completa de síntesis de L-megosamina, sino también la flexibilidad de las proteínas MegCI-MegCVI involucradas en la transferencia de L-megosamina a las distintas macrolactonas. Estos resultados abren la posibilidad de generar bibliotecas de análogos de megalomicina a través de la ingeniería de rutas de biosíntesis de azúcares o por combinación con modificaciones químicas de las macrolactonas y de esta manera generar compuestos más potentes contra *T. cruzi* o compuestos con igual o mayor potencia pero con mejores propiedades farmacocinéticas (PK) y/o actividad antibacteriana reducida.

P69: FIRST-GENERATION MICROBIAL FUEL CELLS AS METABOLIC TRANSDUCERS FOR ENVIRONMENTAL BIOSENSORS

Florencia Zalazar, Natalia Sacco, Maria Celina Bonetto and Eduardo Cortón, Grupo de Biosensores y Bioanálisis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. fzalazar@qb.fcen.uba.ar

Environmental biosensors are a growing area of application, despite the still small participation on the worldwide biosensor market, where clinical glucose sensors explain close to 90% of the total sales. Several bioanalytical parameters, as BOD (biochemical oxygen demand and toxicity, among others) are related or can be related to the measurement of metabolic respiratory activity or correlated parameters. The standard BOD method involve usually 5 days incubation of 250 mL samples; these and other reasons make this test unable to work many critical situations, where on-line and on-site data is necessary.

In order to obtain faster and more convenient BOD-like information, microbial BOD biosensors have been developed. They allow the determination of the denominated "short term BOD" (BOD_{st}), which can be to some extent correlated with the conventional BOD₅. The first BOD_{st} biosensor developed was composed of a thin layer of microorganisms attached by a filtration membrane over an oxygen amperometric electrode.

Up to know the oxygen electrode remain as the most popular one.

To overcome the problems related to the operation of an oxygen electrode as transducer, we assay the utilization of a microbial mediated fuel cell (also called first generation fuel cell) as microbial metabolism detector, and several critical parameters (as microbial composition, electrode material, mediator, incubation time) described.

Our microbial fuel cells are based on carbon electrodes and Nafion® as proton transporter membrane. Different microbial strains, *S. cerevisiae*, *E. coli* and a BODSeed commercial inoculate were assayed in their capacity to reduce two redox mediators; these soluble redox mediators (methylene blue and neutral red, at 0.1 mM level) are capable to take electrons from cellular oxidative metabolism and transfer it to the surface of an electrode. The microbial hemicell was at anaerobic conditions (N₂ bubbling), whereas the ferricyanide cathode (8 g/L in buffer saline) was aerobic.

The best current response was using *E. coli* and neutral red as mediator; we obtain open circuit voltages up to 500 mV, current at power was measured at different external resistance loads, from 47 kΩ to 250 Ω. Measured currents were in the microampere range when the cell was discharged using a 10 kΩ resistor. The utilization of this transducer as BOD sensor was studied with the more commonly used BOD standards, a glucose-glutamic acid solution (GGA) and OECD solution (a rather more complex solution).

P70: MACERACIÓN DE ALBEDO DE LIMÓN CON PROTOPECTINASA-SE DE *Geotrichum klebahnii*

Arley David Zapata Zapata^{1,2}, Romina B. Sainz², Sebastián F. Cavalitto² y Roque A. Hours²

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Calle 59A Número 63 – 20. Medellín, Colombia.

² CINDEFI (CONICET – UNLP). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 47 y 115. (1900) La Plata, Argentina. E. mail: adzapata@unal.edu.co

La maceración enzimática es el proceso por el cual se logra la desintegración de tejidos vegetales para conseguir células independientes de forma intacta, logrando de esta forma que las propiedades nutritivas de los tejidos no se vean afectadas. Protopectinasa-SE (PPasa-SE) es una endo-poligalacturonasa producida por el hongo levaduriforme *Geotrichum klebahnii* ATCC 42397, la cual hidroliza o disuelve la protopectina, sustancia péctica insoluble presente en la lámina media de los tejidos vegetales, liberando de esta forma pectina soluble, con la resultante separación de las células.

El Microorganismo, los medios, las condiciones de cultivo y la producción de enzima fueron descritos

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 previamente por Cavalitto *et al.* (2000), para el cultivo *G. klebahnii*.

Los ensayos se hicieron con cilindros de albedo de limón, en contacto con una solución de PPasa-SE la cual fue preparada en un buffer definido por las condiciones de trabajo. Se estudió el efecto de la velocidad de agitación, trabajando a 100 y a 200 golpes/min, encontrándose que a mayor velocidad existe un importante aumento en el rendimiento de la maceración. Con respecto a la concentración de enzima, se observó que existe un valor entre 10 y 25 U/ml por encima del cual no se evidencia un aumento en el rendimiento del proceso. Se comparó el efecto que se presenta al usar buffer citrato y buffer acetato de fuerza iónica equivalente, trabajando bajo las mismas condiciones de agitación, temperatura y concentración de enzima, observándose que con el uso de buffer citrato se logra un aumento del 65% en el rendimiento de la maceración. Posteriormente, se evaluó el efecto del pH, temperatura y concentración de buffer citrato, por medio de un diseño Doehlert, con superficie de respuesta, para lo cual se usó una velocidad de agitación de 200 golpes/min y una concentración de enzima de 25 U/ml. La evaluación se hizo en un rango de pH entre 3.0 y 6.0, concentración de citrato entre 5 y 45 mM y temperaturas de 30°C, 37°C y 44°C. Los resultados de este diseño mostraron que a 30°C, pH: 5 y concentración de buffer citrato entre 15 y 30 mM, se logran resultados óptimos.

No se observó un incremento en la maceración luego de 3 h de proceso, siendo el máximo encontrado del orden de 40% de peso seco de tejido macerado, con respecto al tejido original.

Por medio de microscopía se evidenció un alto porcentaje de células intactas en el tejido macerado. Además, se determinó que el sobrenadante del proceso está compuesto principalmente por glucosa, fructosa, sacarosa y pectina.

SECCIÓN 6: FISIOLOGÍA Y METABOLISMO

P71: UN AMBIENTE REDUCTOR REVIERTE LA SENSIBILIDAD AL FRÍO DE UNA MUTANTE DE POLIHIDROXIBUTIRATO DERIVADA DE LA BACTERIA ANTÁRTICA *PSEUDOMONAS* SP. 14-3

Paula M. Tribelli, Nicolás D. Ayub y Nancy I. López
Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Intendente Güiraldes 2160. 1428- Bs As. E-Mail: nan@qb.fcen.uba.ar.

Pseudomonas sp. 14-3 es una cepa productora de polihidroxibutirato (PHB) aislada a partir de una charca temporaria de la Antártida. En esta bacteria el *cluster* de genes involucrados en la síntesis de PHB (*phaRBAC*) está localizado en una isla genómica flanqueado por una bomba Na⁺/glutamato y un sistema de secreción de Tipo I que posee una proteína periplasmática anticongelamiento. El PHB constituye una importante reserva de carbono y poder reductor. Recientemente, hemos obtenido una mutante *phaC* incapaz de sintetizar el polímero. Esta mutante mostró una alta sensibilidad al estrés por H₂O₂, calor y congelamiento. Además, esta cepa fue incapaz de crecer y sobrevivir en frío.

Dado que el PHB es importante en el balance redox celular y que la exposición al frío incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, nuestra hipótesis de trabajo es que la imposibilidad de crecimiento en frío de la cepa mutante sería consecuencia del daño causado por el estrés oxidativo. Para probar esta hipótesis analizamos el crecimiento y la supervivencia de la cepa mutante en ambientes reductores: microaerobiosis y aerobiosis con el agregado de sustancias antioxidantes.

En contraste con lo observado en aerobiosis a bajas temperaturas, en distintas condiciones de microaerobiosis en frío la cepa mutante fue capaz de crecer y sobrevivir, alcanzando valores levemente menores a los de la cepa salvaje en la cual no se detectó acumulación de PHB. Por lo tanto, ambientes microaeróbicos pueden proteger parcialmente a *Pseudomonas* sp. 14-3 contra el frío en forma independiente de la producción de PHB. La cepa mutante también fue capaz de crecer aeróbicamente en frío con el agregado de sustancias antioxidantes como glutatión, cistina y glutamato. La incorporación de glutamato como agente antioxidante podría estar favorecida por la acción de la bomba Na⁺/glutamato. No se observó reversión de la sensibilidad al frío de la cepa mutante al suplementar el medio de cultivo con

glucosa, alanina, metionina, arginina o fenilalanina, que no poseen propiedades antioxidantes. Por otra parte, la inducción de la resistencia al estrés oxidativo por un pretratamiento con bajas concentraciones de H₂O₂ permitió la supervivencia de la mutante en condiciones aeróbicas en frío.

Los resultados obtenidos demuestran que la capacidad de acumulación de PHB permite contrarrestar el estrés oxidativo causado por el crecimiento aeróbico en frío. Además, en este trabajo se proponen posibles estrategias alternativas a la producción del polímero para la resistencia al frío, tales como el crecimiento en condiciones microaeróbicas y la utilización de sustancias antioxidantes.

P72: LA POLIHIDROXIALCANOATO SINTASA CODIFICADA EN UNA ISLA GENOMICA DE LA BACTERIA ANTARTICA *PSEUDOMONAS* SP. 14-3 INCREMENTA LA RESISTENCIA A ESTRÉS Y ES ESENCIAL PARA LA ADAPTACION AL FRIO

Nicolás D. Ayub y Nancy I. López
Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160. 1428- Buenos Aires. E-mail: nicoayub@qb.fcen.uba.ar

Entre las diversas condiciones ambientales que impactan la vida microbiana, la baja temperatura es uno de los factores más relevantes. El frío disminuye la síntesis de proteínas, la fluidez de las membranas y la tasa de difusión a través de las mismas, produce desnaturalización de proteínas, formación de cristales de hielo, e incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno. La bacteria antártica *Pseudomonas* sp. 14-3 es capaz de acumular polihidroxibutirato (PHB), el más estudiado de los polihidroxicanoatos (PHA). Los PHAs son reservorios de carbono y poder reductor, generalmente acumulados durante condiciones de crecimiento no balanceadas. Sin embargo, esta cepa es capaz de acumular el polímero desde fase de crecimiento exponencial. En asociación con este fenotipo, *Pseudomonas* sp. 14-3 muestra alta resistencia al calor y al estrés oxidativo comparada con otras especies de *Pseudomonas*. Por otra parte, el gen de la PHA sintasa (*phaC*) fue encontrado en una isla genómica que contiene genes que codifican funciones relevantes en ambientes fríos tales como proteínas anticongelantes.

En este trabajo, se muestra que la pérdida del gen *phaC* provoca un cambio abrupto en la resistencia a estrés y en la adaptación al frío de *Pseudomonas* sp. 14-3. La mutación afectó la tolerancia al H₂O₂, al calor y al congelamiento en experimentos realizados en fase de crecimiento exponencial a temperaturas moderadas (28°C). Además, la cepa mutante fue incapaz de crecer y sobrevivir a bajas temperaturas (10 °C). Por otra parte, una corta exposición al frío indujo una alta resistencia a estrés oxidativo en la cepa salvaje, mientras que este fenómeno no se observó en la cepa mutante. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos que mostraron una asociación entre el daño provocado por frío y el estrés oxidativo. Además, el gen *phaC* de *Pseudomonas* sp. 14-3 fue capaz de complementar el fenotipo de sensibilidad al estrés oxidativo y al frío de una mutante PHA derivada de *P. putida* KT2440, confirmando que el PHA tiene un efecto protector frente al estrés provocado por las bajas temperaturas y que este papel puede ser extendido a otras especies de *Pseudomonas*.

P73: PLASMA-MEDIATED BIOFILM INACTIVATION: A NEW SOLUTION TO AN OLD PROBLEM?

Joaquin, J.C.⁽¹⁾, Kwan, C.⁽¹⁾, Vandervoort, K.⁽²⁾, Abramzon, N.⁽²⁾, and Brelles-Mariño, G.⁽¹⁾. ⁽¹⁾Biological Sciences Department, ⁽²⁾Physics Department. California State Polytechnic University. 3801 W Temple Ave. Pomona, CA 91768. email: gbrlles@csupomona.edu

Biofilms are bacterial communities embedded in a matrix mostly composed of exopolysaccharides. These ubiquitous, hard-to-destroy communities pose problems in industrial and health-related settings; and conventional disinfection methods are often ineffective with biofilms. The use of gas discharge plasmas is a novel alternative since plasmas contain a mixture of charged particles, chemically reactive species, and UV radiation which decontamination potential for free microorganisms is well established. We have previously reported the use of plasma to destroy bacterial biofilms.

4 day-old *Chromobacterium violaceum* biofilms were produced in 96-wells polystyrene microplates. An atmospheric pressure plasma jet was generated with an Atomflo™ 250 reactor (Surfx Technologies, CA) using a mixture of He and N₂ gases. After removing planktonic bacteria, biofilms were exposed to plasma for various exposure times, then disaggregated by sonication, and processed to determine the CFU/ml after incubation. For microscopy experiments, biofilms were subjected to the same procedure and after sonication, cells were centrifuged and pellets smeared onto glass slides. Cell viability was studied measuring ATP production with the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Test (Promega) and by using the LIVE/DEAD Bac Light Bacterial Viability Test (Molecular Probes, OR) and microscopic visualization with an Olympus

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
BX61 fluorescence microscope. Atomic force microscopy (AFM) images were collected in air in intermittent contact mode using a Quesant microscope. An atmospheric pressure plasma jet was generated with Gas with an Atomflo™ 250 reactor (Surfx Technologies, CA) by using a mixture of He and N₂ gases. Optical emission spectroscopy was used to study plasma composition.

Our data show that after a 10-minute plasma treatment, almost 100% of the viable cells are removed. The results show a rapid initial decline in CFU/mL followed by a much slower subsequent decline with D-values that are longer than for the inactivation of planktonic organisms, suggesting a more complex inactivation mechanism for biofilms. DNA and ATP determinations together with atomic force microscopy and fluorescence microscopy show that non-culturable cells are still alive at short plasma exposure times. These results indicate the potential of plasma as an alternative way for biofilm inactivation and suggest that cells go through a sequential set of physiological and morphological changes before being inactivated by plasma.

P74: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES TEMPERATURA SENSIBLES DE MYCOBACTERIUM SMEGMATIS DEFICIENTES EN LA SINTESIS DE ACIDOS MICOLICOS.

Belardinelli, JM; Carignano, H; Morbidoni, HR
Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas UNR, Santa Fe 3100 Rosario CP:2000
hugocarignano@arnet.com.ar

Los ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga de hasta 90 átomos de carbono, son componentes esenciales de la envoltura celular micobacteriana, involucrados en virulencia y responsables de la baja permeabilidad mostrada por estos microorganismos. Basados en esto, realizamos una búsqueda de mutantes que presentaran al mismo tiempo un fenotipo temperatura sensible (demostrando esencialidad) y una mayor permeabilidad a drogas lipofílicas (sugiriendo alteración de la envoltura celular) en un cultivo mutagenizado químicamente de la micobacteria saprófita *M. smegmatis*. De 18 mutantes termo-sensibles aisladas (sobre un total de 10,000 chequeadas), 5 mostraron alteraciones morfológicas, una susceptibilidad incrementada a las drogas lipofílicas Rifampicina, Cristal Violeta y Novobiocina, además de una drástica reducción del crecimiento en medio líquido a 42°C.

La cepa parental mc2 155 de *M. smegmatis* utilizada en este trabajo sintetiza 3 familias de ácidos micólicos: α-, α'-(ácidos micólicos no oxigenados) y epoxi-(ácidos micólicos oxigenados). El análisis de la biosíntesis de ácidos micólicos de las mutantes a 42°C mostró los siguientes fenotipos: 1) la pérdida de los ácidos epoxi-micólicos solos o acompañados de la pérdida de la síntesis de ácido oleico; 2) pérdida de la

síntesis de ácidos α - y epoxi- micólicos; 3) la pérdida de los ácidos no oxigenados α' . La sensibilidad a drogas aumentó muy ligeramente al perderse los ácidos epoxi-micólicos (fracción minoritaria del total) pero fue significativamente mayor al perderse la síntesis de los ácidos α - micólicos.

Estos resultados sugieren que los ácidos micólicos tienen un rol fundamental sobre la arquitectura de la envoltura celular micobacteriana, incrementando la susceptibilidad a drogas aún cuando solo una de las familias es alterada. La identificación de los genes afectados en estas mutantes permitirá dilucidar nuevas etapas en la biosíntesis de las distintas familias de ácidos micólicos, mientras que sus productos aportarían nuevos blancos para el desarrollo de drogas antimicobacterianas.

P75: DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA SELECTIVIDAD DE METAL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE *Rhodobacter capsulatus*.

Di Capua, Cecilia; Tabares, Leandro; Cortez, Néstor. Instituto de Biol. Molec. de Rosario (IBR – CONICET). Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR. Suipacha 531, S2002LRK Rosario. <dicapua@ibr.gov.ar> <cortez@ibr.gov.ar>

Las superóxido dismutasas (SODs) son metaloproteínas que catalizan la detoxificación del radical superóxido, un subproducto inevitable de la respiración aeróbica. Estas enzimas se clasifican en función del cofactor metálico, siendo las SODs de Fe o Mn la forma evolutivamente más antigua. Estas se encuentran en bacterias y en organelas de eucariotes y muestran alta homología de secuencia, plegamientos similares e idéntica geometría del sitio activo. Funcionalmente, pueden diferenciarse en tres clases: las FeSODs, sólo activas con Fe; las MnSODs, sólo activas con Mn; y las Fe/MnSODs cambialísticas, que presentan actividad tanto con Fe como con Mn.

La SOD de *R. capsulatus* (RcSOD) una preferentemente Mn y es más activa con este metal. Cuando la bacteria es crecida en condiciones aeróbicas, el porcentaje de MnSOD es del 90%, aunque en condiciones fotosintéticas disminuye a 60%. Con objeto de identificar determinantes estructurales de la selectividad de metal, se analizaron apilamientos de secuencias de enzimas de la familia Fe/MnSOD con diferente preferencia de metal, identificándose posiciones conservadas para cada tipo (Fe, Mn o cambialística) construyéndose las mutantes puntuales C63S, F73R, S77A, A160P, G163T así como la delección $\Delta(61-67)$. Tanto la enzima salvaje RcSOD como las mutantes fueron clonadas en el vector pES3228 para su expresión como proteínas recombinantes en *E.coli*. Se ensayaron protocolos de cultivo para optimizar la expresión soluble de la proteína recombinante, alcanzándose unos 6mg de proteína soluble por litro de cultivo. Las mutantes F73R

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 y Del61-67 no mostraron expresión soluble detectable en ninguna de las condiciones ensayadas. Para investigar el efecto de las mutaciones en la captura de metal *in vivo*, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes en medio mínimo en presencia de FeSO₄ o de MnSO₄. Se realizaron geles de actividad SOD a pH 6 y 8, considerando que la forma FeSOD presenta una variación de actividad vs pH mucho mayor que la forma MnSOD. Si bien las inducciones en presencia de MnSO₄ no generaron diferencias entre proteína salvaje y mutantes, los ensayos en presencia de Fe mostraron que sólo las mutantes A160P y G163T exhibieron diferencias respecto de la proteína salvaje sugiriendo que habrían unido una proporción menor de Fe. Estos resultados sugieren una influencia de residuos específicos en la selectividad de metal, la cual no estaría determinada exclusivamente por la disponibilidad de metal en el medio celular.

P76: CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE ACIL-COA CARBOXILASAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: UN NUEVO BLANCO PARA EL DESARROLLO DE DROGAS

Daniel Kurth, Gabriela Gago, y Hugo Gramajo. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-Area Microbiología CONICET, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, (S2002LRK) Rosario, Argentina. E-mail: kurth@ibr.gov.ar

La pared celular de *M. tuberculosis* posee numerosos lípidos de estructura compleja que no sólo son necesarios para la viabilidad y patogenicidad del microorganismo, sino que son capaces de modular la respuesta inmune del huésped. Entre éstos, unos de los más característicos son los ácidos micólicos. Algunas de las drogas antituberculosas más usadas afectan justamente estas vías biosintéticas. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de las vías involucradas en la biosíntesis de los precursores de estos lípidos complejos. Nuestra hipótesis de trabajo es que los α -carboxi acil-CoAs utilizados para la biosíntesis de los ácidos grasos de membrana y de la pared celular son producidos por los complejos acil-CoA carboxilasas (ACCasas) presentes en *M. tuberculosis*. Estas enzimas, cuya estructura es diferente a la de la acetil-CoA carboxilasa de humanos, son un blanco atractivo para el diseño de nuevos agentes anti-micobacterianos específicos. En nuestro laboratorio se han caracterizado dos complejos ACCasa a nivel bioquímico y estructural. La obtención de las estructuras cristalográficas de las subunidades carboxiltransferasas de estos complejos permitió la búsqueda *in silico* de inhibidores, resultando en la identificación varios compuestos capaces de inhibir la actividad enzimática *in vitro*. Uno de estos compuestos también fue capaz de inhibir, a concentraciones

micromolares, el crecimiento de diferentes especies de micobacterias, incluyendo cepas mutirresistentes de *M. tuberculosis*. Nuestros resultados sugieren que su acción antimicobacteriana se debe a la inhibición de una ACCasa específica. Por un lado se observó que en presencia del inhibidor disminuye la incorporación de 1-[¹⁴C-acetato], y también la biosíntesis de ácidos grasos y micólicos. Además la actividad acetyl-CoA carboxilasa es menor en extractos de cultivos tratados con el inhibidor, mientras que la actividad ácido graso sintasa no se encuentra afectada. En conjunto, estos datos confirman que los complejos ACCasa podrían proveer una herramienta para el diseño de nuevos compuestos antimicobacterianos específicos.

P77: IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA LIGASA INVOLUCRADA EN LA VÍA ENDÓGENA DE LIPOILACIÓN PROTEICA EN *BACILLUS SUBTILIS*

Natalia Martin, Diego de Mendoza y María Cecilia Mansilla

IBR-CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR, Suipacha 531, 2000 - Rosario, Argentina.

E-mail: nmartin@ibr.gov.ar

El ácido lipoico (ácido 6,8-tioctico), es un cofactor esencial para el funcionamiento de enzimas clave del metabolismo oxidativo de la mayoría de los organismos, tanto eucariotas como procariotas. Entre las enzimas lipoiladas se encuentran los complejos piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, deshidrogenasa de cetoácidos ramificados y el sistema de clivado de la glicina. El modelo actual de la biosíntesis y utilización de ácido lipoico es el de *Escherichia coli*, que involucra dos vías, una exógena en la cual el lipoato ingresa a la célula y es transferido a las apoproteínas en un proceso dependiente de ATP, catalizado por la Lipoato ligasa A (LpIA) y una vía de síntesis endógena. Esta segunda vía requiere del producto del gen *lipB*, la proteína lipoil (octanoil)-[ACP]-proteína-*N*-lipoiltransferasa, la cual transfiere el ácido octanoico endógeno a las proteínas lipoilables. Estos dominios octanoilados son posteriormente modificados, mediante la inserción de dos átomos de azufre, por la enzima lipoil sintasa (LipA), generándose los derivados lipoilados.

El análisis bioinformático del genoma de *Bacillus subtilis* reveló la existencia de dos marcos abiertos de lectura que codifican productos con homología a LpIA (*yhfJ* e *yqhM*), sin embargo no se encontró ninguno con similitud significativa a la proteína LipB. Recientemente demostramos que *B. subtilis* es capaz de sintetizar ácido lipoico y ligarlo a las apoenzimas, lo que sugiere la presencia de al menos una enzima responsable de la lipoilación endógena. Un candidato es el gen *ywfL*, localizado corriente abajo de un gen relacionado con la asimilación de azufre, este gen codifica un producto de función desconocida y presenta moderada similitud con YhfJ. Se llevó a cabo

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007

la construcción de la mutante nula en *ywfL*, NM51. Esta cepa es incapaz de crecer en medio mínimo, pero su crecimiento se restaura al adicionar acetato más los precursores de los ácidos grasos ramificados o ácido lipoico. Por otra parte, NM51 presenta baja frecuencia de esporulación en medio SM. Este fenotipo se revierte parcialmente al suplementar el medio con ácido lipoico. Además, en esta cepa existe una fuerte inducción de la transcripción del gen de la desaturasa, confirmando que es incapaz de sintetizar los precursores de los ácidos grasos ramificados, y por lo tanto la fluidez de su membrana sólo puede aumentarse con la síntesis de ácidos grasos insaturados. Estos resultados sugieren que la presencia de YwfL funcional es indispensable para la incorporación de ácido lipoico endógeno a los complejos enzimáticos piruvato deshidrogenasa y deshidrogenasa de cetoácidos ramificados de *B. subtilis*, por lo que renombramos a YwfL como LipL.

P78: EXPRESIÓN HETEROLOGA Y PURIFICACIÓN DE UN PÉPTIDO CON ESTRUCTURA TIPO-UBIQUITINA DE *NATRIALBA MAGADII*

Ordóñez, María Victoria; Necessian, Debora; De Castro, Rosana; Conde, Ruben Danilo

Instituto de Investigaciones Biológicas, CONICET-UNMdP. Funes 3250 4to nivel, CC: 1245, CP:7600, Mar del Plata, Argentina.

mvordone@mdp.edu.ar

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada en todos los organismos eucariotas, pero son escasas las evidencias de su presencia en procariotas. Se han descrito proteínas tipo ubiquitina (Ubls), que presentan principalmente una baja homología de secuencia primaria, pero una alta homología a nivel de estructura secundaria y funcional con ubiquitina. Las Ubls se encuentran tanto en eucariotas como en procariotas. En nuestro laboratorio se estudia la presencia de este tipo de proteínas en arqueas haloalcalófilas y haloneutrofilas. Mediante técnicas de PCR se ha aislado una secuencia de ADN del genoma del arquea haloalcalófila *Natrialba magadii* denominado p400. La secuencia de aminoácidos deducida de p400 presenta, al ser modelada, homología estructural con ubiquitina. Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos durante el modelado del fragmento p400 con herramientas bioinformáticas se decidió expresar dicho péptido en un sistema heterólogo. En el presente trabajo se describe la expresión de dicha secuencia en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*. El fragmento p400 fue subclonado en el vector pet24b que presenta una cola de histidina en su región C-terminal. Luego de la inducción con IPTG, el péptido expresado en este sistema se encontró en cuerpos de inclusión. Con el objetivo de estudiar su posible homología con ubiquitina se realizó la purificación del péptido

mediante el uso de una cromatografía de afinidad en columna de Níquel. La purificación se realizó bajo condiciones desnaturalizantes en presencia de cloruro de guanidinio y urea. Las proteínas eluidas de la columna de níquel fueron resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida 12% en condiciones semidesnaturalizantes. La proteína purificada fue cortada del gel y sus fragmentos trípticos se secuenciaron mediante HPLC-MS/MS. A partir del alineamiento de las secuencias obtenidas se pudo corroborar que la secuencia del péptido expresado se corresponde con la secuencia de aminoácidos deducida con anterioridad. Para comprobar que el péptido expresado también tuviera reactividad con el anticuerpo anti-ubiquitina, se llevaron a cabo ensayos de inmunoreactividad. La proteína solo mostró reactividad con dicho anticuerpo luego de ser incubada en buffer conteniendo 3M NaCl. Estos resultados son esperados ya que se sabe que las proteínas de arqueas halófilas requieren de una alta concentración de sal para obtener un correcto plegamiento. Financiado por CONICET y UNMdP.

P79: PBP 4*: UNA HIDROLASA DE PEPTIDOGLICANO IMPLICADA EN EL REMODELAMIENTO DE LA PARED CELULAR DURANTE LA OSMORESPUESTA EN *Bacillus subtilis*

María Mercedes Palomino, Carmen Sánchez Rivas y Sandra M. Ruzal

Departamento de Química Biológica. Facultad Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria Pabellón II. 4° piso. (1428) Buenos Aires. Argentina.

E-mail: mpalomino@qb.fcen.uba.ar

La adaptación de *Bacillus subtilis* al estrés osmótico involucra importantes modificaciones a nivel de estructura y composición de la envoltura celular.

En el presente trabajo se ha puesto central atención al estudio de *pbpE*, el gen de la endopeptidasa PBP 4*, cuya expresión comparte reguladores con la respuesta osmótica (Sigma W, SpoOA). Las proteínas PBP (penicillin binding proteins) tienen un rol fundamental en la polimerización y el crosslinking del peptidoglicano.

Estudios anteriores del laboratorio han demostrado que *pbpE* se induce en fase estacionaria de crecimiento estando sobre expresado bajo estrés osmótico y siendo su mutante más sensible a sal.

En este trabajo intentamos entender qué función cumple la PBP 4* en las modificaciones que sufre la pared durante la respuesta al estrés osmótico.

Se han realizado ensayos de sensibilidad a antibióticos con blanco de acción en la síntesis de pared y el crosslinking (Vancomicina, Penicilina G y Bacitracina), comparando la cepa salvaje y la mutante *pbpE* en ambas condiciones: C (control) y N

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007 (agregado de NaCl). Se observó una mayor sensibilidad a estos antibióticos en la condición N, resultando la cepa mutante más sensible que la salvaje.

Estudios de microscopía electrónica de cultivos en ambas condiciones mostraron una disminución del grosor de la pared en N siendo más severa la disminución en la mutante.

Las características estructurales del peptidoglicano se estudiaron con paredes purificadas determinando la cinética y los productos de lisis por mutanolizina. Paredes provenientes de la condición N resultaron más sensibles a la lisis, mostrándose la cepa mutante más sensible que la salvaje. Los productos de hidrólisis analizados por la técnica FACE (electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia) muestran que el número de oligómeros fue menor en la condición N respecto de la condición C, lo que se correlaciona con un menor grado de crosslinking de las paredes de esa condición.

En geles de SDS-PAGE donde la proteína PBP4* se revela por Western Blot, se detecta en esa posición y mediante zimografía, una actividad muramidasa. Ambas detecciones solo se observan en la cepa salvaje en N.

Estos resultados sugieren que durante la osmoadaptación de *B. subtilis*, las modificaciones de la pared requieren la actividad hidrolasa de PBP 4* para aumentar el turn-over de la misma con la finalidad de remodelarla hacia una estructura compatible con la adaptación osmótica. Estas modificaciones permitirían también aumentar la permeabilidad a solutos osmocompatibles y la provisión de péptidos.

P80: LA UTILIZACIÓN DEL POLÍMERO POLIHIDROXIALCANOATO (PHA) INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA Y LA RESISTENCIA A ESTRÉS OXIDATIVO EN FASE ESTACIONARIA DE UNA MUTANTE *rpoS* DE *Pseudomonas putida*.

Laura Raiger-lustman, Peter Döhmer Pisani, Beatriz Méndez y Jimena Ruiz.

Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Ciudad Universitaria. Pabellón II. Piso 4to. Capital Federal. Argentina.

e-mail: jimena@qb.fcen.uba.ar

En bacterias Gram negativas existen diversos mecanismos de control activos que les permiten hacer frente a condiciones adversas. Uno de ellos es la Respuesta General a Estrés, que se induce en condiciones tales como la escasez en nutrientes, el estrés osmótico y el estrés oxidativo. Los genes involucrados en la resistencia al estrés se encuentran bajo el control de una subunidad sigma alternativa de la RNA polimerasa denominada σ^S , codificada por el gen *rpoS*. El nivel intracelular de σ^S aumenta

marcadamente durante la fase estacionaria de crecimiento. Se ha demostrado que las mutantes *rpoS* presentan una menor supervivencia en fase estacionaria y menor resistencia al estrés.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros de reserva bacterianos cuya acumulación y degradación favorece la supervivencia de los microorganismos en el ambiente. Diversos trabajos demostraron que la utilización de PHA incrementa la resistencia al estrés de distintas especies bacterianas, tanto en ambientes naturales como en cultivos de laboratorio.

Teniendo en cuenta estos aspectos, el objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de la utilización de PHA en la supervivencia y la resistencia al estrés oxidativo durante la fase estacionaria de una mutante *rpoS* de *Pseudomonas putida*. Para esto se realizaron cultivos de *P. putida* KT2440 (cepa salvaje) y de su correspondiente mutante *rpoS* en medio mínimo suplementado con una fuente de carbono que puede ser utilizada para la síntesis de PHA y otra que no puede ser utilizada.

Los resultados obtenidos mostraron que la mutante *rpoS* cultivada en condiciones de acumulación de PHA, presentaba un marcado incremento en la supervivencia y en la resistencia al estrés oxidativo en fase estacionaria, en comparación con los cultivos crecidos en condiciones de no acumulación. En cambio, la cepa salvaje no mostró diferencias en la supervivencia en fase estacionaria en las dos condiciones de cultivo y apenas se observó una leve diferencia en la resistencia al estrés oxidativo. Asimismo, la cinética de degradación de PHA en condiciones de acumulación del polímero resultó diferente para las dos cepas. Mientras que la cepa KT2440 degradaba el 34% del PHA acumulado luego de 24 hs de incubación, la cepa mutante *rpoS* degradó el 72% del PHA luego de ese período. Estos resultados estarían indicando que en la mutante *rpoS* la degradación de PHA se induce tempranamente y que la utilización del polímero suprime el fenotipo de menor supervivencia y resistencia al estrés de la mutante *rpoS*.

P81: PHENOTYPIC EXPRESSION IN BORDETELLA PERTUSSIS BIOFILMS: A PROTEOMIC APPROACH.

Diego Serra¹, Genia Lücking², Siegfried Scherer², Osvaldo Yantorno¹ and Monika Ehling-Schulz²

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. 50 y 115 (B1900AJL) La Plata, Buenos Aires, Argentina. ² Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abteilung Mikrobiologie, Technische Universität München (TUM), Weihenstephaner Berg 3, D-85350 Freising, Germany
E-mail: yantorno@quimica.unlp.edu.ar

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
Bordetella pertussis, the causative agent of whooping cough, is an obligate human pathogen. Although vaccination has proven successful in controlling the acute *B. pertussis* infection, this pathogen continues to be a common cause of persistent cough in all age groups (1). While little is known concerning the mechanisms by which *B. pertussis* can cause these persistent infections, recent reports support the hypothesis that this pathogen may adopt a sessile biofilm lifestyle as a strategy to survive within the host (2). An important aspect of the biofilm mode of growth is that microorganisms undergo physiological changes during their transition from a planktonic life to a sessile existence, which may account for its resistance to stressful environments (3). In the case of *B. pertussis*, only a few works have been reported on the field, and therefore little is known about the nature of the physiological changes and the critical regulatory processes occurring in biofilm. Here we present the first proteomic study in *B. pertussis* to address the question about the physiological response taking place in biofilm. Here we focused on comparatively interpreting physiological changes between biofilm and planktonic populations detected primarily at the protein level by two-dimensional (2D) gel electrophoresis, and in the macromolecular cell composition by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. FT-IR studies demonstrated that *B. pertussis* exhibits differential phenotypic features in biofilm, suggesting the production of a polysaccharide-containing matrix as a distinctive phenotypic trait resulting from the biofilm lifestyle. A 2D gel-based approach revealed 5.5 and 10.9 percentage of change of the analyzed cytosolic and membrane-associated subproteomes respectively, between biofilm and planktonic populations. Those proteins overexpressed and expressed *de novo* in the cytosolic subproteome of sessile cells were found predominant. Proteins that were positively identified within this group encompass mainly those involved in central and intermediary metabolism, adaptation and stress response, as well as regulatory processes, whereas those from the membrane group are represented by proteins involved in adhesion and transport activities. In agreement with results found by FT-IR spectroscopy analysis, a protein found up-regulated in biofilm was described involved in carbohydrate metabolism. Coincidentally, these proteins are distributed in functional categories of proteins that were reported to be affected during biofilm development for other bacteria (4). These results suggest that phenotypic traits associated to the biofilm lifestyle might be useful to the pathogen to persist in the host.

- 1- Cherry, J.D. (2005). *Pediatrics* 115:1422-1427.
- 2- Serra, D. O. (2007) *Anal Bioanal Chem.* 387:1759-67.
- 3- Costerton, J.W et al (1999) *Science* 284:1318-1322.
- 4- Jouenne, T et al. (2004). *Current Proteomics.* 113-129.

**P82: BÚSQUEDA PROTEÓMICA Y
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
MARCADORES DIFERENCIALES DE ESTRÉS
ÁCIDO EN *Sinorhizobium meliloti* SIMBIOTE DE
ALFALFA.**

Draghi, Walter O.; Del Papa, M. F.; Pistorio, M.;
Lozano, M.; Giusti, M.A.; Torres Tejerizo, G.; y
Lagares. A.

IBBM - Instituto de Biotecnología y Biología Molecular.
Facultad de Ciencias Exactas, Univ. Nac. de La Plata,
calles 47 y 115, 1900-La Plata. E-mail:
lagares@biol.unlp.edu.ar

El estrés ácido presente en los suelos cultivables es uno de los principales factores que afectan el normal establecimiento y desarrollo de la simbiosis entre alfalfa y *Sinorhizobium meliloti* actuando en detrimento de una correcta nutrición nitrogenada de la planta. Superar dicho factor para la obtención de una simbiosis exitosa requiere del conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la tolerancia a la acidez, especialmente en el rizobio, el cual es severamente afectado por dicho estrés.

Con el objeto de buscar marcadores asociados al estrés ácido se caracterizaron los proteomas de rizobios crecidos en condiciones neutras y ácidas utilizando electroforesis bidimensional y MALDI-TOF-PMF para la identificación de las especies diferenciales. Del total de proteínas analizadas, 7,8% se sobre-expresaron diferencialmente en la condición

IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007
ácida, mientras que la expresión fue reprimida en 5,2% del proteoma. Mientras en la condición neutra se observó la sobre-expresión de proteínas mayoritariamente asociadas al metabolismo de aminoácidos, en la condición ácida se sobre-expresaron marcadores asociados particularmente a la generación de energía, metabolismo de glúcidos, y el aparato de traducción. Hemos identificado en total más de 30 marcadores diferenciales entre ambas condiciones, varios de ellos con función aun desconocida. La expresión de dichos marcadores tuvo una muy alta correlación con resultados del transcriptoma que también hemos analizado. Para investigar la posible participación de los marcadores diferenciales en la tolerancia al estrés ácido, mutantes por transposición en varios de los marcadores fueron evaluados en su capacidad de crecer en condiciones ácidas y neutras. En fase logarítmica temprana se observaron dos tipos de comportamiento: mutantes con crecimiento comparable al de la cepa salvaje, y mutantes cuya tasa de crecimiento fue menor. Resultó particularmente interesante que los mutantes alterados correspondieron mayoritariamente a los alterados en marcadores sobre-expresados en acidez. El estudio que hemos realizado demuestra que, para la condición de estrés que hemos analizado, la aplicación de una aproximación proteómica provee no sólo un conjunto de marcadores de expresión diferencial, sino la posibilidad de identificar entre ellos varios marcadores cuya alteración conduce a una clara disfunción fenotípica asociada al estrés en estudio.

INDICE DE AUTORES

Abate C. M.	P14	Pág. 35	Consolo V. F.	P21	Pág. 39
Abramzon N.	P73	Pág. 67	Cordo C. A.	P21	Pág. 39
Abril A.	P10	Pág. 33	Correa O. S.	C8	Pág. 16
Aguilar O. M.	P15	Pág. 35	Cortez N.	P75	Pág. 68
Alippi A. M.	P34	Pág. 45	Cortón E.	P4	Pág. 29
Allievi M. C.	C15	Pág. 20		P9	Pág. 32
Alvarenga A. E.	P14	Pág. 35		P69	Pág. 64
Alvarez H. M.	C4	Pág. 13	Cristóbal H. A.	P14	Pág. 35
Argaraña C. E.	C19	Pág. 22	Cumino A. C.	P47	Pág. 52
	P40	Pág. 49	Curutchet G.	P20	Pág. 38
	P42	Pág. 50	D'Alesandro C.	P39	Pág. 48
Augusto M.	P16	Pág. 36	Daniel M. A.	P22	Pág. 39
Ayub N. D.	P71	Pág. 66	de Almeida A.	C13	Pág. 19
	P72	Pág. 66		P38	Pág. 48
Azevedo V.	C23	Pág. 24		P53	Pág. 56
Barchiesi J.	P36	Pág. 46	De Antoni G. L.	P60	Pág. 60
Baroni V.	P54	Pág. 56	De Castro R. E.	C5	Pág. 14
Barra J. L.	P40	Pág. 49		P39	Pág. 48
Barrera V.	P18	Pág. 37		P45	Pág. 51
Barrionuevo M. R.	P19	Pág. 38		P48	Pág. 53
Basile L. A.	P2	Pág. 28		P78	Pág. 69
Belardinelli J. M.	P74	Pág. 67	de Mendoza D.	C17	Pág. 21
Blancato V. S.	P37	Pág. 47		C25	Pág. 25
Blanco Massani M.	P52	Pág. 55		P77	Pág. 69
Boccalandro H.	P3	Pág. 29	Del Panno M. T.	C7	Pág. 15
Bonetto M. C.	P9	Pág. 32	Del Papa M. F.	P82	Pág. 72
	P69	Pág. 64	Delfederico L.	C23	Pág. 24
Bosch A.	C7	Pág. 15	Delgado O.	P5	Pág. 30
Bottini R.	P3	Pág. 29		P7	Pág. 31
Breccia J. D.	P63	Pág. 61		P8	Pág. 32
	P64	Pág. 62	Delprato M. L.	P49	Pág. 53
Brelles-Mariño G.	P73	Pág. 67	Di Capua C.	P75	Pág. 68
Bucchieri V.	P41	Pág. 49	Di Gregorio D. E.	P20	Pág. 38
Burkart A. L.	P4	Pág. 29	Di Marzio W.	C2	Pág. 12
Bustos A. Y.	C21	Pág. 23	Díaz R.	P67	Pág. 63
Cardozo M. J.	C16	Pág. 20	Diez V.	C17	Pág. 21
Carignano H.	P74	Pág. 67	Dionisi H.	C2	Pág. 12
Carrera S.	P16	Pág. 36	Diorio L. A.	P6	Pág. 30
Castagnaro A. P.	C11	Pág. 18	Disalvo A.	P67	Pág. 63
	P35	Pág. 46	Döhmer Pisani P.	P80	Pág. 70
Castellano P.	P52	Pág. 55	Draghi W. O.	P82	Pág. 72
Castellanos de			Ehling-Schulz M.	P81	Pág. 71
Figuerola L. I.	P25	Pág. 41	Enrique R.	C11	Pág. 18
	P26	Pág. 41	Erijman L.	C1	Pág. 12
	P62	Pág. 61		P2	Pág. 28
Castelli M. E.	C18	Pág. 21	Espariz M.	C20	Pág. 22
	P36	Pág. 46	Fabani M. P.	P54	Pág. 56
Castro O.	P55	Pág. 57		P55	Pág. 57
Cavalitto S. F.	P20	Pág. 38	Farías M. E	C3	Pág. 13
	P70	Pág. 65	Fariña J.	P5	Pág. 30
Centrón D.	P43	Pág. 50	Fedrigo G. V.	C18	Pág. 21
Ceretti H.	P22	Pág. 39	Fernández D.	P17	Pág. 36
Checa S. K.	C20	Pág. 22	Fernández Niello J. O.	P20	Pág. 38
Cohen A. C.	P3	Pág. 29	Ferrero M.	C2	Pág. 12
Collavino M. M.	P15	Pág. 35		C3	Pág. 13
Conde R. D.	P78	Pág. 69		P1	Pág. 28

Ferrero M.	P23	Pág. 40	Juy M. I.	C24	Pág. 25
Filippone M. P.	C11	Pág. 18	Keitelman A. D.	P4	Pág. 29
	P35	Pág. 46	Kerber N. L.	C8	Pág. 16
Flores M.	P56	Pág. 57		P24	Pág. 40
Foieri A.	P30	Pág. 43	Kurth D.	P76	Pág. 68
Font de Valdez G.	C21	Pág. 23	Kwan C.	P73	Pág. 67
Fontenla S.	P11	Pág. 33	Lagares A.	P82	Pág. 72
Forchiassin F.	P6	Pág. 30	Lara J.	C3	Pág. 13
	P27	Pág. 42	León M.	C8	Pág. 16
Forte Giacobone A. F.	P4	Pág. 29		P24	Pág. 40
Friedrich J.	P59	Pág. 59	León Peláez A.	P60	Pág. 60
Froilán González J.	C26	Pág. 26	Levin L.	P27	Pág. 42
Gadanho M.	P29	Pág. 43	Lewkowicz, E. S.	C22	Pág. 24
Gago G.	P76	Pág. 68	Libkind D.	P11	Pág. 33
Galvagno M. A.	P66	Pág. 63		P29	Pág. 43
Gambino N.	P57	Pág. 58	Limansky A.	C14	Pág. 19
Garavaglia L.	P23	Pág. 40	Lisa A. T.	P41	Pág. 49
Garaycochea J. I.	C22	Pág. 24	Livny J.	P51	Pág. 55
García A. F.	P24	Pág. 40	López A. M.	C7	Pág. 15
	C8	Pág. 16	López Lastra C. C.	P31	Pág. 44
García Véscovi E.	C18	Pág. 21	López N. I.	P71	Pág. 66
	P36	Pág. 46		P72	Pág. 66
Gargarello R.	P20	Pág. 38	Lorda G.	P65	Pág. 62
Gasoni L.	P18	Pág. 37	Lovrich G.	P8	Pág. 32
Giannuzzi L.	P60	Pág. 60	Lozada M.	C2	Pág. 12
Giménez A. V.	P6	Pág. 30	Lozano M.	P82	Pág. 72
Giordano A. M.	P38	Pág. 48	Lucca M. E.	C24	Pág. 25
	P53	Pág. 56		P1	Pág. 28
Giorello N.	P61	Pág. 60		P56	Pág. 57
Giusti M. A.	P82	Pág. 72	Lücking G.	P81	Pág. 71
Godoy I.	P5	Pág. 30	Luján A. M.	C19	Pág. 22
Gómez C.	P61	Pág. 60		P42	Pág. 50
Gómez D.	P58	Pág. 59	Luna F.	P61	Pág. 60
Gómez F.	P7	Pág. 31	Madrid E.	P39	Pág. 48
	P8	Pág. 32	Magni C.	C25	Pág. 25
Gómez-Zavaglia A.	P57	Pág. 58		P37	Pág. 47
	P67	Pág. 63	Malamud F.	C11	Pág. 18
Gonzalez C.	C23	Pág. 24		P35	Pág. 46
Gramajo H.	P68	Pág. 64	Maldonado E.	C26	Pág. 26
	P76	Pág. 68	Mansilla M. C.	P77	Pág. 69
Grossi V.	C4	Pág. 13	Marano M. R.	C11	Pág. 18
Gudesblat G.	P35	Pág. 46		P35	Pág. 46
Guerrero L.	C1	Pág. 12	Marcozzi C.	P46	Pág. 52
Guibert L.	P37	Pág. 47	Marelli B.	C25	Pág. 25
Hariyo D. D.	C6	Pág. 15	Marino de Remes		
Herrera Seitz M. K.	C5	Pág. 14	Lenicov A. M.	P30	Pág. 43
Hollmann A.	C23	Pág. 24		P34	Pág. 45
Hours R. A.	P70	Pág. 65	Martín F. A.	C10	Pág. 17
Huck H.	P20	Pág. 38		P33	Pág. 45
Humber R. A.	P31	Pág. 44	Martin N.	P77	Pág. 69
Iglesias L. E.	P59	Pág. 59	Martina M. A.	P40	Pág. 49
Imanishi L.	P59	Pág. 59	Martínez M. C.	P18	Pág. 37
Iribarren A. M.	C22	Pág. 24	Massimelli M. J.	P41	Pág. 49
	P59	Pág. 59	Maturano Y. P.	P26	Pág. 41
Jacquelin D. K.	P40	Pág. 49		P62	Pág. 61
Joaquin J. C.	P73	Pág. 67	Maupin-Furlow J. A.	P45	Pág. 51

Mazzaferro L.	P63	Pág. 61	Pataro A.	P67	Pág. 63
	P64	Pág. 62	Pattacini S.	P65	Pág. 62
Médici R.	C22	Pág. 24	Peiru S.	P68	Pág. 64
Méndez B. S.	C13	Pág. 19	Penas F.	P7	Pág. 31
	P44	Pág. 51		P8	Pág. 32
	P53	Pág. 56	Perez Audero M.E.	C20	Pág. 22
	P66	Pág. 63	Perez Cenci M.	P47	Pág. 52
	P80	Pág. 70	Pesce V. M.	P25	Pág. 41
Minig M.	P63	Pág. 61		P26	Pág. 41
	P64	Pág. 62	Petrocelli S.	C9	Pág. 17
Miyoshi A.	C23	Pág. 24	Pettinari M. J.	C13	Pág. 19
Mohorčič M.	P59	Pág. 59		P38	Pág. 48
Molinari L.	P61	Pág. 60		P53	Pág. 56
Mónaco C. I.	P21	Pág. 39	Piccoli P. N.	P3	Pág. 29
Monasterio R.	P65	Pág. 62	Pistorio M.	P82	Pág. 72
Morbidoni H. R.	P74	Pág. 67	Pontel L.B.	C20	Pág. 22
Morelli I. S.	C6	Pág. 15	Pontin M.	P3	Pág. 29
Motok J.	C3	Pág. 13	Posadas, D. M.	C10	Pág. 17
Mouso N.	P27	Pág. 42		P33	Pág. 45
Moyano A. J.	C19	Pág. 22	Prado Acosta M.	P28	Pág. 42
	P42	Pág. 50	Pucheu N. L.	C8	Pág. 16
	P15	Pág. 35		P24	Pág. 40
Mroginski L. A.	C26	Pág. 26	Qüesta J.	C11	Pág. 18
Murialdo S. E.	C14	Pág. 19	Quiroga C.	P43	Pág. 50
Mussi M. A.	P25	Pág. 41	Raiger-Iustman L. J.	P44	Pág. 51
Nally M. C.	P26	Pág. 41		P80	Pág. 70
	C6	Pág. 15	Ramírez M. C.	P66	Pág. 63
Nardillo A.	P78	Pág. 69	Ramírez M. S.	P43	Pág. 50
Nercessian D.	C13	Pág. 19	Ramírez S.	P22	Pág. 39
Nikel P. I.	P53	Pág. 56	Raya R.	C21	Pág. 23
	P66	Pág. 63	Relling V.	C14	Pág. 19
Nisenbaum M.	C26	Pág. 26	Repizo G.	C25	Pág. 25
Noé L.	P10	Pág. 33		P37	Pág. 47
O'Callaghan, D.	C10	Pág. 17	Rigano L. A.	C11	Pág. 18
Olivera N.	C4	Pág. 13		P35	Pág. 46
	P43	Pág. 50	Riva Mercadal J.P.	C2	Pág. 12
Ordóñez M. V.	P78	Pág. 69	Riveros N.	P16	Pág. 36
Orejas J. A.	C24	Pág. 25	Rodriguez E.	P68	Pág. 64
	P56	Pág. 57	Romero A.	P18	Pág. 37
	P58	Pág. 59	Ruiz D. M.	C5	Pág. 14
Orellano E. G.	C9	Pág. 17		P45	Pág. 51
	P49	Pág. 53	Ruiz J.	P44	Pág. 51
Ottado J.	C9	Pág. 17		P80	Pág. 70
	P49	Pág. 53	Ruiz V.	P33	Pág. 45
Padola N. L.	P17	Pág. 36	Russo G.	P29	Pág. 43
Paggi R. A.	C5	Pág. 14	Ruzal S. M.	C15	Pág. 20
	P39	Pág. 48		P28	Pág. 42
Palomino M. M.	P79	Pág. 70		P79	Pág. 70
Papinutti L.	P6	Pág. 30	Sacco N.	P9	Pág. 32
	P27	Pág. 42		P69	Pág. 64
Pardo A.	P20	Pág. 38	Sainz R. B.	P70	Pág. 65
Parisi G.	P51	Pág. 55	Salerno G. L.	P21	Pág. 39
Parkinson J. S.	C16	Pág. 20	Salerno G. L.	P46	Pág. 52
Parma A. E.	P17	Pág. 36		P47	Pág. 52
Passoni L. I.	C26	Pág. 26		P50	Pág. 54
Pastor M. D.	P65	Pág. 62	Salomón M.	P10	Pág. 33

Sánchez Rivas C.	C15	Pág. 20	Torres P. S.	P35	Pág. 46
	P28	Pág. 42	Torres Tejerizo G.	P82	Pág. 72
	P79	Pág. 70	Tribelli P. M.	P71	Pág. 66
Sandonato N.	P67	Pág. 63	Tymczyszyn E.	P57	Pág. 58
Sansberro P. A.	P15	Pág. 35		P67	Pág. 63
Sanz M. E.	P17	Pág. 36	Ulloa J. R.	P11	Pág. 33
Sastre D. E.	C5	Pág. 14	Useglio M.	P68	Pág. 64
	P48	Pág. 53	Valdés La Hens D.	P32	Pág. 44
Saviello M.	C23	Pág. 24	Valverde C.	C12	Pág. 18
Scherer S.	P81	Pág. 71		P51	Pág. 55
Schujman_G.E.	C17	Pág. 21	van Broock M. R.	P11	Pág. 33
Semorile L.	C23	Pág. 24		P29	Pág. 43
Sendín L.	C11	Pág. 18	Vandervoort K.	P73	Pág. 67
	P35	Pág. 46	Varela P.	P16	Pág. 36
Serra D.	P81	Pág. 71	Vázquez F.	P10	Pág. 33
Siciliano F.	C11	Pág. 18		P12	Pág. 34
	P35	Pág. 46		P13	Pág. 34
Silva Paulo P.	P4	Pág. 29		P25	Pág. 41
Silva R. A.	C4	Pág. 13		P26	Pág. 41
Siñeriz F.	P1	Pág. 28		P54	Pág. 56
	P8	Pág. 32		P55	Pág. 57
	P58	Pág. 59		P62	Pág. 61
Smania A.M.	C19	Pág. 22	Vega Avila A. D.	P12	Pág. 34
	P42	Pág. 50		P13	Pág. 34
Sobrero P.	C12	Pág. 18	Vergara C.	P16	Pág. 36
Somacal H.	P20	Pág. 38	Viale A.	C14	Pág. 19
Soncini F. C.	C20	Pág. 22	Vignolo G.	P52	Pág. 55
	P36	Pág. 46	Viruel E.	P1	Pág. 28
Studdert C. A.	C5	Pág. 14	Vojnov A. A.	C11	Pág. 18
	C16	Pág. 20		P35	Pág. 46
Suárez C.	C25	Pág. 25	Vullo D. L.	P19	Pág. 38
Tabares L.	P75	Pág. 68		P22	Pág. 39
Taranto M. P.	C21	Pág. 23		P23	Pág. 40
Toledo A. V.	P30	Pág. 43	Wall L. G.	P32	Pág. 44
	P31	Pág. 44	Wunderlin D. A.	P54	Pág. 56
	P34	Pág. 45		P55	Pág. 57
Tondo M. L.	P49	Pág. 53	Yantorno O. M.	C7	Pág. 15
Toro M. E.	P10	Pág. 33		P81	Pág. 71
	P12	Pág. 34	Yaryura P. M.	C8	Pág. 16
	P13	Pág. 34		P24	Pág. 40
	P25	Pág. 41	Zalazar F.	P9	Pág. 32
	P26	Pág. 41		P69	Pág. 64
	P54	Pág. 56	Zalts A.	P22	Pág. 39
	P55	Pág. 57	Zapata Zapata A. D.	P70	Pág. 65
	P62	Pág. 61	Zinni M. A.	P59	Pág. 59
Torres L. L.	P50	Pág. 54	Zorreguieta, A.	C10	Pág. 17
Torres P. S.	C11	Pág. 18		P33	Pág. 45