

CMIBM 2006



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Sociedad Española de
Microbiología

GRUPO ESPECIALIZADO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

9 y 10 de noviembre de 2006
Paraninfo de la Universidad
A Coruña



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE
INNOVACIÓN E INDUSTRIA
Dirección Xeral de Investigación,
Desenvolvemento e Innovación

CMIBM2006

CONGRESO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

A Coruña, 9 y 10 de noviembre de 2006

Organizado por el Grupo Especializado Microbiología
Industrial y Biotecnología Microbiana de la Sociedad
Española de Microbiología (SEM) y
la Universidade da Coruña

Colaboran:

Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e
Innovación. Consellería de Industria e Innovación.

Xunta de Galicia.

Estrella Galicia. S.A.

Celta Ingenieros, S.L.

Boente, S.L.

Comité de Honor

Excmo. Sr. D. Emilio Pérez Touriño,
Presidente da Xunta de Galicia

Excmo. Sra. D^a Elena Salgado,
Ministra de Sanidad y Consumo

Excma. Sra. D^a Elena Espinosa,
Ministra de Agricultura, Pesca y Alimentación

Excma. Sra. D^a. Laura Sánchez,
Conselleira de Educación

Excmo. Sr. D. Fernando Blanco,
Conselleiro de Industria e Innovación

Excmo. Sr. D. Salvador Fernández,
Presidente de la Diputación de A Coruña

Excmo. Sr. D. Javier Losada
Alcalde de A Coruña

Excmo Sr. D. Salustiano Mato de la Iglesia,
Director Xeral de I+D+i

Excmo. Sr. D. Rogelio Conde-Pumpido Tourón,
Director Xeral de Promoción Científica e Técnica

Magfco. y Excmo. Sr. D. José M^a Barja,
Rector da Universidade da Coruña

Magfco. y Excmo. Sr. D. Senén Barro,
Rector da Universidade de Santiago

Excma. Sra D^a. Concepción Herrero,
Vicerrectora de Investigación da Universidade da Coruña

Comité Organizador

Presidente:

JULIO ABALDE ALONSO

Vicepresidente:

TOMÁS GONZÁLEZ VILLA

Secretario:

JORGE BARROS VELÁZQUEZ

Tesorero:

ENRIQUE ROCA BORDELLO

Vocales:

PILAR CALO MATA

ENRIQUETA ARIAS

FRANCISCO J. PASTOR

CONCEPCIÓN HERRERO LÓPEZ

ÁNGELES CID

ALBERTO CEPEDA SÁEZ

ENRIQUE TORRES

MARGARITA POZA

MARTA PRADO

TRINIDAD DE MIGUEL

Comité Científico

Presidente:

Julio R. Villanueva, Fundación R. Areces

Vocales:

Carlos Hardisson, SEM

Ricardo Guerrero, Presidente de la SEM

José M. Peinado, UCM

Juan F. Martín, UL

Fernando Laborda, UAH

Paloma Liras, UL

Ramón López, Estrella Galicia

Manuel J. Nieto, Genentech

José L. Barredo, Antibióticos S.A.

Manuel Esteban, Antas-Pharma

Jueves, 9 de noviembre

09.00 h. **Ceremonia de apertura**

Excmo. Sr. **José Ramon Leis Fidalgo**. Director Xeral de Calidade e Ordenación do SUG. Xunta de Galicia

Excmo. y Mgfco. Sr. D. **José M^a Barja Pérez**. Rector de la Universidad de A Coruña

Sr. Dr. **Julio Rodríguez Villanueva**. Presidente del Comité Científico

Dr. **Julio Abalde Alonso**. Presidente del Comité Organizador

09.15 h. **Conferencia inaugural**

¿Cómo adquirió *Saccharomyces* sus propiedades biotecnológicas?. **Amparo Querol**.

10.00 h. Mesa Redonda 1: **"Genómica y Biotecnología"**

Moderadora: **Enriqueta Arias**,

- Utilidad del género *Thermus* como factoría celular y como plataforma para la estabilización de enzimas. **José Berenguer**.
- Aplicación de la genómica microbiana al descubrimiento de nuevos antibióticos a partir de productos naturales. **Fernando Peláez**.
- Nuevas vacunas de subunidades frente a virus animales. **Francisco Sobrino**
- Evolución molecular de lipasas fúngicas en *P. pastoris*. **José L. Adrio**.

11.45 h. Pausa para café

12.15 h. Mesa Redonda 2: **"La Biotecnología en la Lucha y Regeneración Biológicas"**

Moderador: **Tomás G. Villa** y **Julio Abalde**.

- Cepas mejoradas de *Trichoderma* para el control de fitopatógenos. **Tahía Benítez**
- *Corynebacterium glutamicum* y su posible uso en la biorremediación de arsénico. **José Antonio Gil**.
- Eliminación microbiológica de naftaleno. **Trinidad de Miguel**.
- El catabolón del fenil-CoA como fuente de aplicaciones en Biotecnología. **José M^a Luengo**.
- Transcriptómica y proteómica de la respuesta al choque térmico en *Corinebacterias* de interés industrial. **Carlos Barreiro**

16.00 h. Mesa Redonda 3: **"Enzimología Microbiana Industrial"**

Moderador: **Francisco J. Pastor**

- Improving the thermal stability of cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Hypocrea jecorina*. **Frits Goedegebuur**.
- Inhibición de lipasas microbianas por saponinas, alcaloides y flavonoides. **Pilar Díaz**
- Ingeniería molecular de la glucoamilasa endógena de *Saccharomyces cerevisiae*. **Julio Polaina**
- Éxitos recientes en la captura de nuevas actividades enzimáticas en (meta)genomas. **Manuel Ferrer**.

17.45 h. Pausa para café.

Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. CMIBM2006

18.15 h. Mesa Redonda 4: "**Nuevos Desarrollos en Biotecnología Microbiana**"

Moderador: **Tomás G. Villa**

- Bacterias y aspirina. **Miguel Viñas.**
- Biopelículas e hidrofobinas fúngicas: papel en la virulencia e implicaciones biotecnológicas. **José P. Martínez.**
- Proteasas microbianas: ingeniería y aplicaciones industriales. **Margarita Poza.**
- Segregación del ADN en bacterias Gram positivas: análisis funcional de los distintos sistemas de segregación. **Juan C. Alonso**
- Mecanismo molecular del control por fosfato de la expresión génica y de la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces*. **Antonio Rodríguez García**

Viernes, 10 de noviembre

10.00 h. Mesa Redonda 5: "**Microbiología Industrial Alimentaria**"

Moderador: **Jorge Barros-Velázquez.**

- Genome-scale modeling of the metabolism of *Lactobacillus plantarum*. **Bas Teusink**
- Bacteriocinas lácticas de origen marino: bipartito contra el enemigo. **Pilar Calo.**
- Autólisis, autofagia y espuma de Champagne. **Ramón González.**
- Detección y control de microorganismos modificados genéticamente en la industria alimentaria. **Marta Prado.**

11.45 h. Pausa para café

12.15 Mesa Redonda 6: "**Biotecnología Ambiental**"

Moderador: **Enrique Roca.**

- Pentose-utilizing yeast in a biorefinery context. **Bärbel Hahn-Hagerdal.**
- Biorremediación. **Ana Segura.**
- Utilization of viticulture wastes for obtaining economic fermentative nutrients and food additives. **José Manuel Domínguez.**
- Contribución del proceso de oxidación anaerobia de amonio (Anammox) al ciclo del nitrógeno: aplicación al tratamiento de aguas residuales. **Anuska Mosquera.**

16.00 h. Mesa Redonda 7: "**Acreditación de la Calidad en los Laboratorios**"

Moderadores: **José M. Peinado y Alberto Cepeda**

- El convenio SEM-ENAC: realidad y perspectivas. **José M. Peinado**
- Experiencia en la acreditación en ISO17025 de un laboratorio de análisis microbiológicos. **Oliva Cadahía**
- Últimas tendencias en materia de gestión y control de la calidad en el campo de la microbiología. **Inmaculada Lorente.**
- Ventajas y dificultades de la acreditación de técnicas analíticas en los laboratorios de I+D+I. **Serafín Carballo.**

17.45 h. Pausa para café.

18.15 h. **Conferencia de Clausura**

Los Cambios de Paradigma en la Microbiología. **Ricardo Guerrero.**

19.00 h. Ceremonia de clausura

21:00 Cena de Clausura

Conferencias Plenarias y Mesas Redondas

C.I.-¿Cómo adquirió <i>Saccharomyces</i> sus propiedades biotecnológicas?. A. Querol, S.S. González, M. Combina, C.Belloch, A. Arias, L.Pérez-Través y E. Barrio.....	11
C.C.- Los cambios de paradigma en la microbiología. Ricardo Guerrero.....	12
MR1.1.-Utilidad del género <i>Thermus</i> como factoría celular y como plataforma para la estabilización de enzimas. José Berenguer.....	13
MR1.2.-Aplicación de la genómica microbiana al descubrimiento de nuevos antibióticos a partir de productos naturales . Fernando Peláez.....	14
MR1.3.-Nuevas vacunas de subunidades frente a virus animales. F. Sobrino, E. Blanco, L. Ganges, J.I. Núñez, F. Rodríguez y D. Andreu.....	15
MR1.4.-Modificación molecular de lipasas fúngicas en <i>Pichia pastoris</i>. Jose Luis Adrio.	16
MR2.1.-Cepas mejoradas de <i>Trichoderma</i> para el control de hongos fitopatógenos. Moreno-Mateos, M.A. Rincón, M.A. Codón, A.C. y Benítez, T.....	17
MR2.2.<i>Corynebacterium glutamicum</i> y su posible uso en la biorremediación de arsénico. José A. Gil, Efrén Ordóñez, Michal Letek, María Fiuza, Astrid Ramos, Almudena F. Villadangos y Luis M. Mateos.....	18
MR2.3.Eliminación microbiológica de naftaleno. Trinidad de Miguel, Lucía Feijoo-Siota, Fernando Rosa dos Santos y Tomás G. Villa.....	19
MR2.4.El catabolón del fenilacetil-CoA como fuente de aplicaciones biotecnológicas. José María Luengo.....	20
MR2.5.-Transcriptómica y proteómica de la respuesta al choque térmico en Corinebacterias de interés industrial. Barreiro, C., González-Lavado, E., Kalinowski, J., Tauch, A. y Martín, J.F.....	21
MR3.1.- Improving the thermal stability of cellobiohydrolases I (Cel7A) from <i>Hypocrea jecorina</i> by site directed evolution. Frits Goedegebuur.....	23
MR3.2.-Inhibición de lipasas microbianas por saponinas, alcaloides y flavonoides. Diaz, P., Ruiz, C., Falcocchio, S., Pastor, F.I.J., Saso, L.....	24
MR3.3.-Ingeniería molecular de la glucoamilasa endógena de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. J Polaina, L. Latorre-García y A. C. Adam.....	25
MR3.4.- Éxitos recientes en la captura de nuevas actividades enzimáticas en “(meta) genomas”. Ferrer, M., Belouqui, A., Polaina, J., Golyshina, O.V., López-Cortés, N., Reyes-Duarte, D., Ballesteros, A., Timmis, K.N., Golyshin, P.N.....	26
MR4.1.-Bacterias y Aspirina. Miguel Viñas, José Sancho, Marta Puig, Teresa Vinuesa y Mercedes Berlanga.....	27
MR4.2.-Fungal biofilms and hydrophobins: role in virulence and biotechnological implications. Martínez, J.P., Pérez, A., Murgui, A., and Casanova M.....	28
MR4.3.-Microbial proteases: industrial applications and engineering. Margarita Poza.....	29
MR4.4.-Plasmid segregation in firmicutes: plasmid pSM19035 use three different avenues to assure stable plasmid inheritance. Florencia Pratto, Virginia S. Liroy and Juan C. Alonso..	30
MR4.5.-Mecanismo molecular del control por fosfato de la expresión génica y de la biosíntesis de antibióticos en <i>Streptomyces</i> A. Rodríguez García, F. Santos, C. Barreiro, A. Sola-Landa, K. Apel, E. Franco, J. F. Martín.....	31
MR5.1.-A genome-scale model of <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1: useful for omics data integration and exploring metabolic capacities. Bas Teusink, Anne Wiersma, Douwe Molenaar, Christof Francke, Willem M. de Vos, Roland J. Siezen and Eddy J. Smid.....	33
MR5.2.- Potential applications of bacteriocins from aquatic food products Pilar Calo-Mata, Marta Prado, Ananias Pascoal, Tomás G. Villa and Jorge Barros-Velázquez.....	34

MR5.3.- Autólisis, autofagia y espuma de champagne. Ramón González, Eduardo Cebollero, Laura Tabera, Yolanda Núñez, Alfonso V. Carrascosa, Rosario Muñoz, Adolfo Martínez-Rodríguez.....	35
MR5.4.- Detección de microorganismos genéticamente modificados en alimentos. M. Prado, P. Calo, A. Pascoal, A. Cepeda y J. Barros Velázquez.....	36
MR6.1.- Pentose-utilizing <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in a bio-refinery context. Bärbel Hahn-Hägerdal.....	37
MR6.2.- Biorremediación. Ana Segura, Juan-José Rodríguez-Hervá, Vanina García, Beatriz Rivera, Ana Hurtado y Juan Luis Ramos.....	38
MR6.3.- Utilization of viticulture wastes for obtaining economic fermentative nutrients and food additives. José Manuel Domínguez González.....	39
MR6.4.- Contribution of the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process to the nitrogen cycle: Application to the wastewater treatment. A. Mosquera-Corral, J. L. Campos and R. Méndez.....	40
MR7.1.- El convenio SEM-ENAC: Realidad y Perspectivas. José Martínez Peinado.....	41
MR7.2.- Experiencia sobre la acreditación de un laboratorio de análisis microbiológico según ISO 17025. Oliva Cadahía Mariz.....	42
MR7.3.- Últimas tendencias en materia de gestión y control de calidad en el campo de la microbiología. Inmaculada Lorente.....	43
MR7.4.- Ventajas y dificultades de la acreditación de técnicas analíticas en los laboratorios de I+D+i. Serafín Carballo Cuervo.....	44

Comunicaciones Libres en Paneles

P.01.- Clonación del gen de la quimosina de <i>Bubalis arnee bubalis</i> en el vector de expresión pET12a de <i>E. coli</i>. Vallejo, J.A.; Ageitos, J.M.; Veiga-Crespo; Poza M y Villa T.G.....	45
P.02.- Caracterización de la GGPPasa de <i>Gordonia jacobaea</i> mediante transposición y Tail-PCR. Veiga-Crespo, Patricia, Calo, Pilar, Poza, Margarita y Villa, Tomás G.....	46
P.03.- Regulación de la biosíntesis de arginina en <i>Streptomyces coelicolor</i> y su relación con otras rutas metabólicas. R. Pérez-Redondo, A. Rodríguez-García, S. Baños, MT. López-García, I. Santamarta, LM. Lorenzana Vega y P. Liras.....	47
P.04.- La bacteria halófila <i>Chromohalobacter salexigens</i> como fuente de “extremolitos”. C. Vargas, M. Argandoña, M. Reina-Bueno, R. García-Esteva y J.J. Nieto.....	48
P.05.- Obtención y expresión del permutante lineal AS-48L23,24 de la Enterocina cíclica AS-. M. Montalbán-López, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia y M. Maqueda.....	49
P.06.- Método analítico para la medida de la actividad k-caseinólítica de enzimas. Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Poza, M., Barros-Velázquez, J. y Villa, T.G.....	50
P.07.- Caracterización de una nueva lacasa producida por <i>Streptomyces ipomoea</i> CECT 3341 y evaluación de su potencial utilidad para su aplicación en las industrias papelera y textil. Molina, J. M.; Hernández, M.; Moya, R.; Troyano, N.; Rodríguez, J. y Arias, M.E.	51
P.08.- Análisis de la cepa lipolítica <i>Pseudomonas</i> sp. CR-611 y clonación de una lipasa secretada de la familia I.3, independiente de la acción de un chaperón. Syfantou, N., Prim, N., Pastor, F.I.J., Díaz, P.....	52
P.09.- Actividades enzimáticas glicosídicas de <i>Oenococcus oeni</i> en relación con la mejora organoléptica en vinos. Albert Bordons, Fabiana Saguir, Cristina Reguant, Isabel Araque y M. Cristina Manca de Nadra.....	53
P.10.- Caracterización molecular de la lipasa LipM producida por <i>Marinobacter lipolyticus</i>. E. Mellado, S. Martín, Fernández-Lafuente, R, Guisán, J.M. y A. Ventosa.....	54

P.11.- Mutagénesis aleatoria de la xilanasa B de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> . Óscar Gallardo, F.I.J. Pastor, Julio Polaina, Pablo Isorna, Julia Sanz-Aparicio, Pilar Diaz.....	55
P.12.- Ingeniería proteica de la celulasa Cel9B de <i>Paenibacillus barcinonensis</i> Chiriac, A.I., Pastor, F.I.J.....	56
P.13.- Molecular cloning, purification and characterization of a family 12 glycosyl hidrolase from <i>Stachybotrys atra</i> in <i>Escherichia coli</i> . Picart, P.* and Pastor, F.I.J.....	57
P.14.- Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of <i>Enterococcus faecium</i> strains with potential application in biopreservation in the food industry. Samuel Arlindo, Pilar Calo, Carlos Franco, Marta Prado, Alberto Cepeda, Tomás G. Villa and Jorge Barros-Velázquez.....	58
P.15.- Characterization of bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from farmed turbot and with potential application to the seafood industry. Pilar Calo-Mata, Carmen A. Campos, Óscar Rodríguez, Marta Prado, Jorge Barros-Velázquez.....	59
P.16.- Efecto de la agitación sobre la producción de bioetanol utilizando el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Pena R., Lu-Chau T.A., Sánchez J.L., Mielgo I y Lema J.M.....	60
P.17.- Reducción del nivel de ploidía en cepas vínicas silvestres de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante el empleo de benomilo. Blasco, L., Cachafeiro Pin, J., Feijoo-Siota, L., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G.....	61
P.18.- Adherencia de nisina a materiales de uso alimentario. N. P. Guerra, A. Torrado, P. Fajardo, I. Rodríguez, L. Pastrana.....	62
P.19.- Identificación y caracterización de levaduras de vinificación autóctonas de la zona de la Ribera del Duero.. E. H. de Laorden, M. Iglesias, G. Rodríguez-Tarduchy y C. Santos.....	63
P.20.- Presencia de actividad b-glucosidasa en <i>Oenococcus oeni</i> RS1. Alegre, M.T., Rodríguez, M.C., Mesas, J.M.....	64
P.21.- Obtención de mutantes negativos para la producción de polihidroxialcanoatos en la cepa <i>Pseudomonas</i> 47T2 para optimizar la producción de ramnolípidos. Torrego, N.; Manresa, A.; Díaz, P.....	65
P.22.- Capacidad autolítica como criterio de selección de levaduras enológicas. Valero, E.; Serrano, A.; Arroyo, T. y González, R.....	66
P.23.- Screening de hongos ligninolíticos para el tratamiento de vinazas procedentes del proceso de producción de bioetanol. Sánchez JL, Pena R, Lu-Chau TA, Lema JM y Mielgo I....	67
P.24.- Empleo de técnicas moleculares para la identificación, selección y control de la microbiota presente en la fermentación alcohólica y la crianza biológica en vinos finos y manzanilla. Cantoral, J.M., Espinazo-Romeu, M.L., Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Pérez, E.,.....	68
P.25.- Desarrollo y caracterización de un starter para la fabricación de queso artesanal. Castro, J.M., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Sacristán, N. y Sandoval, M.H.	69
P.26.- Producción de isómeros del ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico mediante <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 749. C. García, J. Ayo y F. Amárita.....	70
P.27.- Aislamiento y clonación del gen de la b-(1,3)-glucanasa de <i>Bacillus circulans</i> WL13 en <i>Escherichia coli</i> .. Cachafeiro Pin,J., Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Poza, M., Villa, T.G.....	71
P.28.- <i>Candida albicans</i> mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain, exhibit altered biofilm formation. Pérez, A. and Martínez, J.P...	72
P.29.- Evidence of carotenoid biosynthesis control in <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> by oxidative metabolism. Pilar Calo-Mata, Margarita Poza, Carlos Echavarri-Erasun, Tomás G. Villa, Jorge Barros-Velázquez and E.A. Johnson.....	73
P.30.- Oxidación avanzada de colorantes textiles por microorganismos ligninolíticos. Moya, R., García-Martín, A.B, Pérez-Leblic, M.I., Troyano, N, Arias, M.E y Guillén, F.	74

P.31.- Desarrollo de modelos mecanísticos de digestores anaerobios UASB pulsantes. A. Franco Uría, E. Roca Bordello, E. Fernández Carrasco, J.M. Lema Rodicio.....	75
P.32.- Modelización de un Filtro Anaerobio pulsante para el tratamiento de aguas residuales. A. Franco Uría, E. Roca Bordello, E. Fernández Carrasco, J.M. Lema Rodicio.....	76
P.33.- Aerobic granules for the integrated wastewater treatment. M. Figueroa, J.R.Vázquez-Padín, B. Arrojo, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral and R.Méndez.....	77
P.34.- Combination of partial nitrification and Anammox processes for the post-treatment of effluents from a fish cannery. I. Fernández, A. Dapena-Mora, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral and R. Méndez	78
P.35.- Eliminación de naftaleno en aguas marinas contaminadas por vertidos de petróleo mediante células inmovilizadas de <i>Pseudomonas stutzeri</i> . Feijoo-Siota, L.; Blasco, L.; Cachafeiro Pin, J.; de Miguel, T; Villa, T.G.	79
P.36.- Arseniato reductasas de <i>Corynebacterium glutamicum</i> : su papel en la resistencia a arsénico. Ordóñez E, Letek M, Fiuza M, Ramos A, Villadangos AF, Gil J A y Mateos L M. ...	80
P.37.- Simulación de procesos biológicos aerobios y anaerobios para el tratamiento de aguas mediante el simulador AQUASIM. E. Fernández Carrasco, C. García Diéguez, E. Roca Bordello, J.M. Lema Rodicio.....	81
P.38.- Selección de variables para la identificación de sobrecargas orgánicas en reactores anaerobios. Molina, F., Carneiro, D., García, C., Roca, E., Lema, J.M.....	82
P.39.- Tratamento biológico da água de produção de petróleo por haloarqueas. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá, Francine Piubeli & Lucia Regina Durrant.....	83
P.40.- Bioremediation of hydrocarbons by two microbial consortia in sand microcosms. Sara Cuadros Orellana; Lorna Falcão Félix; Murilo Porto Brandão; Otávio Augusto Santos; Suiane Andrade Lima; Álvaro Silva Lima.....	84
P.41.- Molecular analyses of <i>Pseudomonas stutzeri</i> identified in a MGP-contaminated soil enriched for a long period with complex PAHs. Í. S. Silva, L. R. Durrant, S. J. Pepper and M. L. Britz.....	85
P.42.- Efecto del ion sulfato sobre la toxicidad del cadmio en la microalga <i>C. moewusii</i> . Suárez, C.; Torres, E.; Pérez-Rama, M.; Abalde, J.; Herrero, C.	86
P.43.- Toxicidad y retirada de cadmio por la microalga marina <i>Dunaliella salina</i> . Folgar, S.; Torres, E.; Cid, A. y Abalde, J.....	87
P.44.- Análisis de señales de hiperglicosilación en una proteína heteróloga expresada en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Gutiérrez, F., de la Rosa, J.M., Ruiz T., Rodríguez, L.....	88
P.45.- The use of blood peptone (PEP®) obtained from enzymatic hydrolysis of porcine hemoglobine as ingredient in culture growth medium in some industrial fermentation models. J. Ródenas, A. Casablanco, G. González-Anadón, O. Fernández, R. Español, C. Rodríguez, N. Saborido and J. Polo.	89
P.46.- Aislamiento de <i>Thiobacillus ferroxidans</i> de una muestra de agua industrial. de la Fuente, A, Rodríguez, M,Guiu, N, Arosemena, L, Adelantado, C, Shiva, C, y Calvo, MA...90	90
P.47.- Estudio microbiológico elSanek®: un tejido antimicrobiano de utilización en clínica. César Escribano, Lidia Ruiz, Teresa Vinuesa, Miguel Viñas.....	91
P.48.- Producción simultánea de ácido láctico y xilitol a partir de podas de sarmiento. Sandra Rivas, Beatriz Rivas, Ana Torrado, Ana Belén Moldes, José Manuel Domínguez.....	92
P.49.- Método para evaluar la actividad antimicrobiana de muestras de pintura y revestimientos para paredes. Rodríguez, M., de la Fuente, A., Guiu, N., Arosemena, L., Adelantado, C., Shiva, C., y Calvo, MA.....	93

¿Cómo adquirió *Saccharomyces* sus propiedades biotecnológicas?

A. Querol¹, S.S. González^{1, 2}, M. Combina¹, C. Belloch¹, A. Arias², L. Pérez-Través^{1, 2} y E. Barrio²

¹Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), 46100 Burjassot, València. ²Genética Evolutiva, Institut “Cavanilles” de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, Edificio de Institutos, Campus de Paterna, 46071 Valencia. E-mail: aquerol@iata.csic.es

S. cerevisiae se ha descrito como la especie predominante en la fermentación alcohólica, sin embargo otras especies del antiguo complejo *Saccharomyces sensu stricto* (actualmente género *Saccharomyces*) también pueden tener un papel importante en procesos de fermentación. La fermentación alcohólica no es un medio óptimo para el crecimiento de *Saccharomyces*, las levaduras han sufrido, a lo largo de su evolución, diversos procesos de adaptación a las condiciones de fermentación, lo que se pueden considerar una ‘domesticación’ que ha generado levaduras ‘industriales’ que poseen propiedades fisiológicas y genéticas especiales. En el caso de *Saccharomyces sensu stricto*, uno de los mecanismos más interesantes implicados en la adaptación de las levaduras a procesos industriales se encuentra la formación de híbridos interespecíficos. Cepas híbridas del complejo *Saccharomyces sensu stricto* se han aislado de diferentes procesos de fermentación. Nuestro grupo de trabajo ha descrito por primera vez la presencia de cepas vínicas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y ha realizado una caracterización genética y enológica. Hemos realizado una caracterización mediante chips de DNA (comparative genome hybridization) y a partir del análisis de varias cepas híbridas, hemos observado la presencia de recombinaciones entre cromosomas “homeólogos” (cromosomas homólogos provenientes de diferente parental), y en conjunción con el análisis de presencia/ausencia de 37 regiones génicas localizadas en los extremos de los 16 cromosomas de *Saccharomyces*, hemos observado una disminución de la fracción de genes proveniente de uno de los parentales. La caracterización enológica de varias de estas cepas vínicas híbridas muestra que los híbridos *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* muestran ciertas ventajas, desde un punto de vista tecnológico, respecto a los parentales. Una es la menor producción de ácido acético, que merma la calidad del vino; otra la mayor producción de glicerol, de interés para la elaboración de vinos ya que les proporciona mayor densidad, más cuerpo. Pero la ventaja más interesante es su mejor adaptación a las fermentaciones a bajas temperaturas, ya que en la actualidad hay un interés creciente en las bodegas por fermentar a bajas temperaturas para obtener vinos más afrutados. Sin embargo, no todas las levaduras pueden fermentar bien a bajas temperaturas puesto que en estas condiciones disminuye su capacidad para crecer y desarrollarse, y se observan frecuentes paradas de fermentación. A partir de datos de expresión global de los dos híbridos vínicos comerciales, sabemos que algunos de los genes que intervienen en la síntesis de glicerol y en la adaptación a bajas temperaturas se sobreexpresan, lo que justifica sus propiedades enológicas.

Los cambios de paradigma en la microbiología

Ricardo Guerrero

Universidad de Barcelona

Presidente de la Sociedad Española de Microbiología

El desarrollo científico es una continua interacción entre hechos e ideas. Los avances en el conocimiento del mundo natural van precedidos de innovaciones tecnológicas que permiten medir y observar alguna cosa nueva, o bien realizar nuevos planteamientos experimentales, previamente imposibles. Pero las técnicas sólo son herramientas y es necesaria una preparación intelectual previa para alcanzar el conocimiento real. Nuestro conocimiento de los microbios ha tenido siempre una vertiente negativa (“de temor”). Sin embargo, empezamos a darnos cuenta de que somos completamente dependientes de los microbios. La vida celular no sólo comenzó con los procariotas, sino que la continuidad de la existencia de la vida sobre la Tierra recae inadvertidamente (e inexorablemente) sobre ellos. La simple observación de una bacteria al microscopio no es muy reveladora. La mayoría de ellas parecen bastoncitos o esferitas sin ningún rasgo distintivo. A pesar de esta aparente simplicidad morfológica, presentan una enorme diversidad metabólica que les permite ocupar nichos ecológicos muy diversos y ser la base de todas las redes tróficas de la biosfera. El último cambio de paradigma en la microbiología ha sido eliminar la idea de que una enfermedad humana (la úlcera gastroduodenal) era una afección “psicosomática”, incluso genética, que requería costosas extirpaciones quirúrgicas. La enfermedad, en realidad, era debida a una bacteria, y se podía curar con antibióticos. Fueron necesarios más de diez años, y posteriormente un premio Nobel, para que la comunidad médica volviera a “creer” en los microbios. Las bacterias indudablemente son muy pequeñas, pero cuánto nos queda aún por descubrir. En ciencia no hay saltos en el vacío que puedan permanecer irresueltos por mucho tiempo; como tampoco hay errores duraderos.

Utilidad del género *Thermus* como factoría celular y como plataforma para la estabilización enzimas

José Berenguer

Centro de Biología Molecular-CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid. 28049-Madrid jberenguer@cbm.uam.es

Las enzimas de los microorganismos termófilos presentan una gran estabilidad no sólo frente al calor, sino también frente a los efectos desnaturalizantes de solventes orgánicos y detergentes, por lo que existe un fuerte interés en su estudio y aplicación en procesos industriales con el fin de prolongar la vida media de los catalizadores y limitar la necesidad de recambio. Debido a la dificultad técnica para conseguir un crecimiento activo y eficiente de muchos de estos microorganismos, habitualmente se trata de producir estas enzimas en sistemas modelo mesófilos manipulables genéticamente y de gran rendimiento (*E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*). Esto solo es posible en un porcentaje de los casos, debido a problemas específicos de modificación (cofactores, procesamientos), o a la incapacidad de alcanzar un plegamiento correcto a bajas temperaturas. La alternativa es el desarrollo de sistemas modelo termófilos manipulables que se asemejen lo más posible al organismo origen de la enzima. En la actualidad, el termófilo que más se aproxima a los sistemas modelo mesófilos es *Thermus thermophilus* HB27, un organismo que crece entre los 55 y los 80 °C, que presenta de competencia natural, y para el que han sido desarrolladas herramientas que permiten su manipulación. Adicionalmente, pertenece a uno de los géneros más distribuidos y que mayor número de representantes tiene. En esta comunicación se mostrarán ejemplos de utilización de esta bacteria para la expresión de termozimas, así como para la selección de mutantes termoestables de enzimas mesófilas, en procesos tanto dependientes como independientes de su actividad enzimática.

Aplicación de la genómica microbiana al descubrimiento de nuevos antibióticos a partir de productos naturales

Fernando Peláez

Centro de Investigación Básica. Merck, Sharp & Dohme de España, S.A. Josefa Valcárcel 38. Madrid 28027.

El descubrimiento de antibióticos con nuevos modos de acción es una necesidad médica, a la vista de la emergencia de resistencias a todos los antibióticos en uso. Los productos naturales han sido la fuente principal de antibióticos, pero recientemente ha habido una pérdida de interés por la investigación tanto en productos naturales como en antibióticos. La genómica permite explorar nuevas dianas útiles para el descubrimiento de antibióticos. El uso de estas estrategias se ejemplifica en el descubrimiento de inhibidores naturales de la síntesis de ácidos grasos en bacterias, a través de una plataforma de *screening* utilizando tecnología de RNA antisentido. La síntesis de ácidos grasos en bacterias representa una fuente potencial de dianas atractivas para la búsqueda de nuevos antibióticos. En concreto, el enzima condensante FabF/B es un enzima esencial y conservado en especies de patógenos Gram positivos y Gram negativos. A partir de una colección de extractos derivados de cultivos de microorganismos se han descubierto varios inhibidores específicos de FabF, el más interesante de los cuales es la platensimicina. Este es un antibiótico con una estructura sin precedentes en la naturaleza o en la química de síntesis, producido por el actinomiceto *Streptomyces platensis*. La platensimicina es un potente antibiótico de amplio espectro frente a bacterias Gram positivo *in vitro*, y con actividad *in vivo* en un modelo de ratón. Debido a su modo de acción, la platensimicina no muestra resistencia cruzada con otros antibióticos, representando un atractivo punto de partida para el desarrollo de nuevos antibióticos clínicamente útiles.

Nuevas vacunas de subunidades frente a virus animales

F. Sobrino^{1,2}, E. Blanco², L.Ganges³, J.I Núñez³, F. Rodríguez³ y D. Andreu⁴

¹ CBMSO (CSIC-UAM), Cantoblanco. 28049 Madrid. ² CISA-INIA. Valdeolmos. 28130 Madrid. ³ CreSA, UAB, Bellaterra, 08193 Barcelona ⁴ U.Pompeu Fabra. 08003 Barcelona. (fsobrino@cbm.uam.es)

El diseño de vacunas de subunidades un área de gran interés para el desarrollo de vacunas marcadoras seguras, alternativas a las ya existentes, así como sistemas de inmunización para patógenos frente a los cuales no se dispone de vacunas clásicas eficaces. No obstante, la inducción de respuestas inmunes protectoras basadas en la expresión de proteínas o regiones de las mismas de patógenos, y en particular de virus de relevancia en sanidad animal está resultando ser un problema complejo. Esto es debido a las diferencias existentes en la estructura y biología de diferentes virus, así como al limitado conocimiento de los mecanismos que regulan la respuesta inmune inducida por los diferentes hospedadores naturales de éstos virus y sus consecuencias en la especificidad antigénica de las respuestas inducidas. En esta comunicación se comentarán los principales problema encontrados así como algunas de las estrategias que se están desarrollando para superarlos, utilizando como modelo el virus de la fiebre aftosa, responsable de una de las enfermedades animales de mayor importancia. Para ello, se comentarán los resultados obtenidos empleando distintos sistemas de expresión de proteínas inmunogénicas del virus de la fiebre aftosa, así como con péptidos sintéticos que mimetizan distintos sitios antigénicos reconocidos por linfocitos B y T en éste virus.

Modificación molecular de lipasas fúngicas en *Pichia pastoris*

Jose Luis Adrio.

Unidad de Biotecnología Industrial. NeuronBioPharma, S.A., Avd. de la Innovación, 1, BIC-PTCS, 18100-Armilla (Granada).

Estudios clínicos han demostrado que la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) como el ácido eicosopentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y el ácido docosohexaenoico (C22:6, n-3, DHA), abundantes en el aceite de pescado, tiene importantes efectos beneficiosos sobre diferentes enfermedades cardiovasculares, depresión, artritis, e incluso en la prevención del cáncer de colon.

Los aceites de pescado, obtenidos como subproductos del procesamiento del mismo, contienen hasta un 30% (p/p) de estos PUFAS. La obtención de aceites con concentraciones más altas requiere la utilización de procesos físico-químicos o enzimáticos. Sin embargo, éstos últimos se ven dificultados por la actividad de las lipasas microbianas utilizadas sobre los triglicéridos conteniendo EPA y/o DHA.

La construcción de una genoteca de expresión en *P. pastoris*, mediante una estrategia de clonación-recombinación, y su posterior screening permitieron obtener dos variantes de la lipasa I de *Galactomyces geotrichum* BT107 con muy baja actividad frente al triglicérido puro del ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3). La substitución de un único aminoácido, diferente en cada variante, fue suficiente para reducir la actividad hidrolítica un 43% y un 50%, respectivamente, en comparación con la enzima original. La elevada actividad sobre triglicéridos conteniendo ácido oleico se mantuvo casi invariable. La utilización de un aceite marino comercial como substrato confirmó la baja actividad hidrolítica de una de las variantes seleccionadas frente a triglicéridos conteniendo EPA, lo que permitió enriquecer la concentración de PUFAS en el aceite final.

Cepas mejoradas de *Trichoderma* para el control de hongos fitopatógenos

Moreno-Mateos, M.A. Rincón, M.A, Codón, A.C. y Benítez, T..

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Apartado 1095, E-41080, Sevilla (correo electrónico. tahia@us.es)

Diferentes cepas de hongos filamentosos pertenecientes al género *Trichoderma* se han venido utilizando comercialmente como agentes de control biológico, fundamentalmente contra hongos patógenos de plantas. Su empleo se basa en la capacidad de dichas cepas para competir por el espacio y por los nutrientes, y para micoparasitar a los fitopatógenos. Las cepas de *Trichoderma* producen antibióticos y enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos a los que atacan, como quitinasas, glucanasas y proteasas, que acaban matando al hospedador. Se han aislado y caracterizado muchos de los genes que codifican estas hidrolasas, y se han obtenido nuevas cepas que cuando sobreexpresan específicamente algunos de estos genes, en su forma nativa o modificada, aumentan sensiblemente su capacidad antagonista contra hongos patógenos. Entre ellos, genes que codifican proteasas ácidas y alcalinas, β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, α -1,3-glucanasas y quitinasas nativas o con la adición de un dominio de unión a sustrato que incrementa su eficacia. También se han aislado los promotores de los genes que codifican hidrolasas y se han identificado y analizado funcionalmente sus secuencias reguladoras. La expresión de la mayoría de los genes está modulada tanto por elementos comunes a otros hongos filamentosos, como son la escasez de fuentes de carbono o nitrógeno, las condiciones de estrés o los valores de pH, como por elementos específicos, entre otros los derivados de las interacciones que llevan a situaciones de antagonismo, y/o micoparasitismo, como la quitina y las paredes celulares de los hongos, aunque los conocimientos precisos sobre las características de estos elementos son todavía escasos. Recientemente, se han identificado por una parte algunos de los componentes que integran las cascadas de transducción de señales implicadas en la inducción de elementos característicos del micoparasitismo, por ejemplo, las que intervienen en el reconocimiento del patógeno o la formación de hifas helicoidales que se enroscan alrededor del mismo, antes de que se induzcan las enzimas que lisan la pared del hospedador. Por otra parte, se está dando cada vez más importancia al papel estimulador de los sistemas de defensa de las plantas por aquellas cepas de *Trichoderma* capaces de colonizar y establecerse en las raíces, confiriendo protección frente a patógenos de distinta naturaleza. La manipulación de estos componentes abre nuevas vías para la obtención de cepas mejoradas de *Trichoderma* utilizables como agentes de biocontrol.

***Corynebacterium glutamicum* y su posible uso en la biorremediación de arsénico.**

José A. Gil*, Efrén Ordóñez, Michal Letek, María Fiuza, Astrid Ramos, Almudena F. Villadangos y Luis M. Mateos.

Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León. 24071 León, España.

El arsénico es un metaloide extremadamente tóxico para los seres vivos. La contaminación por arsénico es un problema ambiental en aumento en todo el mundo, ya que a diferencia de los contaminantes orgánicos que se descomponen en compuestos químicos inofensivos, el arsénico no se destruye, pero puede ser inmovilizado o transformado en formas menos tóxicas.

Corynebacterium glutamicum, una corinebacteria no patógena usada para la producción de aminoácidos y nucleótidos, es uno de los microorganismos más resistentes a arsénico. Esta resistencia natural es debida a la presencia de dos operones cromosomales *ars* (*arsI* y *ars2*) que muestran la estructura típica de tres genes *arsRBC*, con un gen extra *arsC1'* situado en el extremo 3' de *arsC1*, y dos genes huérfanos, *arsB3* y *arsC4*.

El arsenito (AsIII) es incorporado inespecíficamente por *C. glutamicum* y expulsado rápidamente por la arsenito permeasa (ArsB). El arseniato (AsV) es incorporado por los transportadores de fosfato, reducido a AsIII por la arseniato reductasa (ArsC) y expulsado por ArsB. ArsR es el regulador que favorece la inducción en presencia de AsIII.

En la presente comunicación describimos la caracterización molecular de los genes *ars* y la construcción de mutantes de *C. glutamicum* que pueden ser usadas en la biorremediación de arsénico: (i) cepas que evitan la salida de AsIII por interrupción de los genes *arsB*; (ii) cepas usadas en la especiación de arsénico por interrupción de los genes *arsC*; (iii) cepas para la acumulación intra-/extracelular de AsIII por amplificación génica de *arsR* o de proteínas de unión a metales (MBP); (iv) cepas para la volatilización de As.

Eliminación microbiológica de naftaleno

Trinidad de Miguel, Lucía Feijoo-Siota, Fernando Rosa dos Santos y Tomás G. Villa

Dpto. Microbiología e Parasitología. Univ. Santiago de Compostela.

La biorremediación de aguas marinas contaminadas es una técnica en auge, ya que ofrece grandes ventajas sobre las técnicas de limpieza mecánicas y físico-químicas. La ventaja fundamental es que con la utilización de los microorganismos se consigue la destrucción total de las sustancias contaminantes que de otra manera sólo se cambiarían de localización.

El fuel vertido a la costa debido a accidentes marítimos contiene sustancias muy tóxicas, que pueden acumularse en los tejidos grasos de los animales marinos y pasar al hombre a través de la cadena trófica. Entre estas sustancias se encuentra el naftaleno, catalogado por la US EPA (agencia de protección medioambiental de los EEUU) como un tóxico prioritario de elevada toxicidad y carcinogénesis.

Se han descrito numerosos microorganismos degradadores de los hidrocarburos del fuel y en concreto del naftaleno. *Pseudomonas* es un género caracterizado por una gran versatilidad metabólica y su capacidad para utilizar como fuente de carbono una amplia variedad de productos tóxicos, entre los cuales se encuentran los hidrocarburos aromáticos y en concreto el naftaleno.

En este trabajo se analiza la capacidad de degradación del naftaleno en agua de mar mediante células libres e inmovilizadas por atrapamiento en esferas de alginato de una cepa de *Pseudomonas stutzeri* bajo diferentes condiciones de cultivo. El objetivo al cual están encaminados estos estudios es la creación de un biofiltro con células inmovilizadas destinado a eliminar este contaminante del agua marina utilizada por empresas de acuicultura.

R.M. Atlas. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45 (1): 180-209

S. Manohar and T.B. Karegoudar. 1998. Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 785-792

El catabolón del fenilacetil-CoA como fuente de aplicaciones biotecnológicas.

José María Luengo.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de León. 24007 León. España. Tfno. 987-291228. Fax. 987-291226. E mail: dbbjlr@unileon.es

El término catabolón ha sido utilizado para describir una unidad funcional compleja integrada por varias rutas catabólicas, originalmente independientes, que en el devenir evolutivo han convergido en una ruta central encargada de transformar un intermediario común en metabolitos generales. A las rutas confluyentes se las denominan rutas periféricas y a la ruta central, ruta de convergencia. El intermediario común de todas ellas da nombre al catabolón. El primer catabolón descrito fue el del fenilacetil-CoA que está constituido por un conjunto de rutas encargadas de la degradación de diferentes compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con el ácido fenilacético tales como el fenilacetaldehído, el 2-feniletanol, la 2-feniletilamina, el estireno, el etilbenceno, el ácido trópico, ciertos ésteres del fenilacético, el ácido *trans*-estirilacético y aquellos fenilalcanoatos que contienen un número par de átomos de carbono. Todas estas rutas, a pesar de haber surgido como rutas independientes, se expresan coordinadamente, lo que supone la existencia de un mecanismo de yuxtaposición regulatoria aún no bien caracterizado. El intermediario común de todas esas rutas es el fenilacetil-CoA que da nombre al catabolón. El análisis de las diferentes enzimas implicadas en la degradación tanto del metabolito central como de sus precursores ha revelado sus interesantes aplicaciones biotecnológicas. Así, mediante la utilización de algunas de estas proteínas han podido sintetizarse *in vitro* más de 60 penicilinas diferentes, se han obtenido nuevas moléculas capaces de actuar como herbicidas y se han sintetizado nuevos plásticos biodegradables y biocompatibles con numerosas aplicaciones en farmacia (vehículos para fármacos) y muy útiles en biomedicina (reparación de tejidos, fabricación de prótesis, etc.).

Transcriptómica y proteómica de la respuesta al choque térmico en *Corinebacterias* de interés industrial

Barreiro C ^{1*}, González-Lavado E ¹, Kalinowski J ², Tauch A ², Martín JF ^{1, 3}

1) INBIOTEC. Parque Científico de León. Avda. Real, 1. 24006 León. España. 2) Institut für Genomforschung. Universität Bielefeld. 33615 Bielefeld. Alemania. 3) Área de Microbiología, Facultad CC Biológicas y Ambientales, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n. 24071 León. España. *degcbm@unileon.es

Los aminoácidos juegan un papel importante en la nutrición tanto de humanos como de animales. Esto ha hecho que desde hace casi 50 años se hayan venido utilizando procesos biotecnológicos para la producción de L-aminoácidos, mayoritariamente por el uso de *Corynebacterium glutamicum* y *Escherichia coli*. Los L-aminoácidos se utilizan principalmente en la alimentación animal, como suplemento de piensos, y en la alimentación humana como potenciadores del sabor (Leuchtenberger *et al.*, 2005).

El interés por las *Corinebacterias*, especialmente *C. glutamicum*, se ha visto incrementado a lo largo de los últimos 20 años. Prueba de ello son los seis genomas de *Corinebacterias* secuenciados que existen actualmente, tanto de especies de interés industrial como patógenas. Dichos genomas han facilitando el análisis proteómico y transcriptómico de diferentes rutas de regulación en varias especies del género *Corynebacterium*.

La respuesta al choque térmico es un fenómeno universalmente distribuido, en el cual, como respuesta a un incremento de temperatura las células expresan varias proteínas de choque térmico para compensar los daños internos producidos por el calor. Este sistema de regulación es uno de los más interesantes, de los presentes en *Corinebacterias*, por sus posibles aplicaciones biotecnológicas al poder facilitar el control a voluntad de la expresión de genes de interés industrial.

C. glutamicum presenta dos sistemas de regulación por estrés térmico (HAIR/HspR y CIRCE/HrcA) que controlan la mayoría de las proteínas implicadas en la respuesta a dicho estrés. El uso de mutantes delecionados en los principales reguladores de la respuesta al choque térmico (*hspR* y *hrcA*) y el análisis de diferentes condiciones de estrés mediante micromatrices (*microarrays*), han permitido obtener una visión global de la respuesta al choque térmico en *C. glutamicum*. Análisis previos del proteoma de *C. glutamicum* han servido para verificar los resultados obtenidos en el análisis transcripcional (Barreiro *et al.*, 2005).

El estudio de la transcripción, mediante *Northern*, de los principales genes implicados en el estrés térmico ha permitido conocer los tiempos de respuesta al estrés, así como los tiempos de recuperación tras dicho estímulo (Barreiro *et al.*, 2004). Así mismo, el análisis de transcritos, mediante RT-PCR a tiempo real, ha mostrado como la respuesta al choque térmico en *C. glutamicum* se produce de forma diferencial en función del sistema regulador analizado y de la intensidad del estrés.

Barreiro C, González-Lavado E, Brand S, Tauch A, Martín JF. 2005. *J. Bacteriol.* 187(3):884-889.

Barreiro C, González-Lavado E, Pátek M, Martín JF. 2004. *J. Bacteriol.* 186:4813-4817.

Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. 2005. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69(1):1-8.

Improving the thermal stability of cellobiohydrolases I (Cel7A) from *Hypocrea jecorina* by site directed evolution.

Frits Goedegebuur

Genencor, a Danisco Division. Archimedesweg 30. 2333CN Leiden. The Netherlands

The *Hypocrea jecorina* cellulase mixture is able to efficiently degrade cellulosic biomass to fermentable sugars at large, commercially relevant scale. These sugars can then be fermented to ethanol, polylactic acid and other products. The high cost of cellulases is one of several factors that make the process too expensive for commercialization. Increasing the process temperature would have an effect on the cost of enzymes by allowing the process to take advantage of the Arrhenius relationship, where the catalytic activity increases with temperature. The *H. jecorina* Cel7A, cellobiohydrolase I, from the glycosyl hydrolase family 7, plays an important role in the biomass degradation process. The thermal stability of this enzyme limits its use in this process to temperatures no higher than 50 °C. Hence, the thermal stability of this enzyme needs to be improved to make it useful in industrial applications.

Inhibición de lipasas microbianas por saponinas, alcaloides y flavonoides

Díaz, P.¹, Ruiz, C.^{1,2}, Falcocchio, S.^{1,2}, Pastor, F.I.J.¹, Saso, L.²

¹Departament de Microbiologia. Universitat de Barcelona. Av Diagonal 645, 08028-Barcelona. Spain. E-mail: pdiaz@ub.edu

²Department of Human Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", University of Rome "La Sapienza". P.le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy.

El estudio de los inhibidores de lipasas ha constituido una de las herramientas más útiles para llevar a cabo la caracterización de la estructura, propiedades catalíticas y grado de selectividad de estas enzimas. En este sentido, los estudios de inhibición de lipasas contribuyen a un mejor conocimiento de su mecanismo de acción, permitiendo el diseño de enzimas con nuevas especificidades regio- o enantioselectivas para mejorar sus aplicaciones biotecnológicas [1]. Por otra parte, los inhibidores de lipasas presentan un elevado interés farmacológico en tanto que podrían resultar de utilidad para la terapia de enfermedades en las que las lipasas juegan un importante papel como en el caso de la obesidad, el acné o las úlceras producidas por *H. pylori* [2, 3]. De hecho, se ha demostrado que numerosos compuestos utilizados en la terapia de estas enfermedades presentan actividad antilipasa: i) la lipasa de *P. acnes* resulta inhibida por tetraciclina y otras sustancias anti-acné [4]; ii) la actividad lipasa de *H. pylori* resulta inhibida por sucralfato y otros productos anti-úlceras [5]; iii) el compuesto Orlistat® (Xenical®), un tetrahidroderivado de la lipostatina está siendo utilizado en la actualidad para el tratamiento de la obesidad más severa debido a su potente capacidad para inhibir la lipasa pancreática humana, enzima clave en la digestión de las grasas intestinales [6].

En consecuencia, existe un gran interés en la búsqueda de nuevos inhibidores de lipasas, especialmente si son de origen natural como las saponinas, los flavonoides, y los alcaloides, tres grupos de moléculas relacionados con la inhibición de lipasas y con el tratamiento de enfermedades asociadas a estas enzimas [2, 3, 4, 7]. En esta sesión se presentarán los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de diversas sustancias naturales sobre la lipasa modelo de *Candida rugosa* (CRL), lipasas de diversas cepas de (*Paeni*)*Bacillus* y las lipasas de *P. acnes* y *H. pylori*.

Bibliografía

- [1] Simons, J.W., Cox, R.C., Egmond, M.R. and Verheij H.M. (1999) *Biochemistry* 38: 6346–6351.
- [2] Grippa, E., Valla, R., Battinelli, L., Mazzanti, G., Saso, L. and Silvestrini, B. (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1557–1562.
- [3] Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763–781.
- [4] Higaki, S. (2003) Lipase inhibitors for the treatment of acne. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 22: 377–384.
- [5] Slomiany, B.L., Murty, V.L., Piotrowski, J. and Slomiany, A. (1994) Gastroprotective agents in mucosal defense against *Helicobacter pylori*. *Gen. Pharmacol.* 25: 833–841.
- [6] Eisenreich, W., Kupfer, E., Stohler, P., Weber, W. and Bacher, A. (2003) Biosynthetic origin of a branched chain analogue of the lipase inhibitor, lipstatin. *J. Med. Chem.* 46: 4209–4212.
- [7] Gatto, M.T., Falcocchio, S., Grippa, E., Mazzanti, G., Battinelli, L., Nicolosi, G., Lambusta, D. and Saso, L. (2002) *Bioorg. Med. Chem.* 10: 269–272.

Ingeniería molecular de la glucoamilasa endógena de *Saccharomyces cerevisiae*.

J Polaina, L. Latorre-García y A. C. Adam.

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Paterna, Valencia.

E-mail: jpolaina@iata.csic.es

La glucoamilasa es un enzima que actúa hidrolizando sucesivamente los enlaces α -1,4 existentes entre los restos de glucosa que vertebran la molécula de almidón. En menor medida también manifiesta cierta actividad frente a los enlaces α -1,6 existentes en los puntos de ramificación. El empleo de glucoamilasa es esencial para las industrias de procesamiento de almidón y de producción de etanol. Para la producción de etanol a partir de almidón es necesario el uso de amilasas comerciales (fundamentalmente glucoamilasa de *Aspergillus niger*) que liberen glucosa, ya que las estirpes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que llevan a cabo la fermentación no tienen la capacidad de digerir el almidón. La disponibilidad de estirpes fermentativas capaces de hidrolizar almidón significa un ahorro significativo en los costes de producción de etanol porque evitaría, o al menos reduciría, la necesidad de emplear enzimas comerciales. La aproximación experimental más utilizada para obtener variedades amilolíticas de *S. cerevisiae* consiste en expresar en la levadura genes heterólogos que codifican amilasas. Esta aproximación plantea ciertos problemas relacionados con la estabilidad de los genes heterólogos y con la carga genética que supone para la estirpe huésped el mantenimiento de estos genes. Nosotros proponemos una vía alternativa, consistente en mejorar, mediante técnicas de ingeniería de proteínas, la glucoamilasa codificada por los genes *STA* presentes en determinadas estirpes de *S. cerevisiae* (var. *diastaticus*). Esta enzima es muy poco eficaz para degradar almidón y por tanto no es apta para uso industrial. Las razones de su escasa eficacia son la carencia de un dominio de unión a almidón y su casi nula actividad frente a los enlaces α -1,6, necesaria para procesar las ramificaciones del almidón. Partiendo de un modelo de la estructura tridimensional de la glucoamilasa codificada por el gen *STA1*, hemos diseñado distintas estrategias para mejorar sus propiedades: Por una parte hemos añadido al enzima un dominio de unión a almidón obtenido de la glucoamilasa de *A. niger*. Por otra parte, utilizamos técnicas de modelado comparativo, mutagenesis aleatoria mediante recombinación de DNA *in vitro*, y mutagénesis dirigida, para intentar mejorar la actividad desramificante.

Éxitos recientes en la captura de nuevas actividades enzimáticas en “(meta)genomas”

Ferrer, M.^a, Beloqui, A.^a, Polaina, J.^b, Golyshina, O.V.^{c,d}, López-Cortés, N.^a, Reyes-Duarte, D.^a, Ballesteros, A.^a, Timmis, K.N.^c, Golyshin, P.N.^{c,d}

^aInstituto de Catálisis, CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid; ^bInstituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Paterna, 46980 Valencia; ^cDivision of Microbiology, HZI – Helmholtz Centre for Infection Research, 38124 Braunschweig, Germany; ^dInstitute of Microbiology, Technical University of Braunschweig, Biozentrum, 38106 Braunschweig, Germany. E-mail: mferrer@icp.csic.es

El desarrollo de métodos moleculares aplicados a la ecología microbiana ha permitido estimar que la diversidad existente en la naturaleza se encuentra entre 10^5 - 10^7 especies (1 g de materia contiene aprox. 10^8 bacterias); sin embargo, se estima que sólo el 1% de los microorganismos han sido cultivados y caracterizados¹. El desconocimiento de esta enorme diversidad (con sus biocatalizadores correspondientes) es una de las carencias más importantes que ha tenido no sólo el estudio de la Microbiología y de la Biología, sino el desarrollo de la Biotecnología. Se puede decir que los métodos tradicionales para el cultivo de los microorganismos han limitado nuestro análisis a los que son capaces de crecer en condiciones de laboratorio, es por ello que el futuro de la biotecnología está limitado al descubrimiento de nuevas enzimas de organismos no cultivables. Éstas representan una pieza clave no sólo para el desarrollo de nuevos productos y procesos, sino también para nuevos estudios estructura-función de proteínas. Voces autorizadas han señalado que la diversidad de microorganismos desconocida es enorme y que ésta puede ser una fuente inagotable para nuevos procesos biotecnológicos. De especial relevancia en las últimas décadas han sido las investigaciones basadas en la exploración de la diversidad biológica y funcional, especialmente aquella que existe en lugares de la biosfera sometidos a condiciones extremas. Estos estudios están sentando las bases para (i) el descubrimiento de actividades metabólicas y fisiológicas desconocidas, (ii) el descubrimiento de nuevas estructuras celulares y moleculares, y (iii) la identificación de nuevas formas de vida.

En nuestro grupo hemos aplicado las modernas técnicas (meta)genómicas para explorar las actividades enzimáticas presentes en tres ambientes extremos: (i) las fosas marinas hipersalinas y anóxicas del Mar Mediterráneo [2]; (ii) el rumen de vaca [3-5] y (iii) los ambientes ácidos surgidos, por ejemplo, de actividades geoquímicas [6,7]. Las fosas marinas (en particular URANIA) del Mar Mediterráneo se crearon hace 5-6 millones de años, están situada a más de 3500 m de profundidad y presentan alta salinidad (de hasta 800 g/L), alta presión (hasta 400 atm) y ausencia de luz y O₂. Estas condiciones han asegurado que esta fosa se encuentre aislada de otros hábitats del Planeta, evitando la dispersión de los organismos (y/o funciones enzimáticas) que contienen. El rumen constituye otro ejemplo de ambiente (semi)extremo anaeróbico sometido a fluctuaciones de pH y altas concentraciones de sustrato. El último de los ejemplos estudiados lo constituyen los ambientes ácidos, y en particular de una arquea *Ferroplasma acidiphilum* Y^T, aislada de unos sedimentos de pirita y que tiene un pH óptimo de crecimiento de 1.7 (rango pH: 0-2).

La caracterización de 28 nuevas enzimas de estos ambientes extremos (tanto a partir del organismos no cultivables (metagenoma) como cultivables, p.e. *F. acidiphilum*), ha sido de especial relevancia para: (i) la identificación de nuevas actividades enzimáticas, incluyendo metaloenzimas; (ii) la asignación de funciones enzimáticas a proteínas anotadas como hipotéticas en las bases de datos; (iii) la determinación de nuevas estructuras proteicas y centros catalíticos; (iv) la modificación de la especificidad de sustrato de esterasas hacia sustratos insolubles, sin modificar la forma, el tamaño o la hidrofobicidad del centro activo o los sitios de unión de sustrato; y (v) ampliar el rango de enzimas aplicables en procesos biotecnológicos.

(1)Ferrer, M., et al. (2005). *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 588-593.

(2)Ferrer, M., et al. (2005). *Chem. Biol.* 12: 895-904.

(3)Ferrer, M., et al. (2005). *Environ. Microbiol.* 7: 1996-2010.

(4)Reyes-Duarte, D., et al. (2005). *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 7553-7557.

(5)Belóqui, A., et al., (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 22933-22942.

(6)Ferrer, M., et al. (2005) *Biochem. J.* 391: 269-276.

(7) Golyshina, O.V., et al. (2006) *Environ. Microbiol.* 8: 416-425.

Bacterias y Aspirina

Miguel Viñas, José Sancho, Marta Puig, Teresa Vinuesa y Mercedes Berlanga

Unidad de Microbiología. Departamento de Patología y Terapéutica Experimental. Universidad de Barcelona. 08907. Hospitalet (Barcelona).

La aspirina (o comprimidos de ácido acetil-salicílico) es utilizada ampliamente como medicamento para tratar cefaleas, dolores en general, como preventivo del infarto agudo de miocardio e incluso últimamente se ha sugerido su capacidad de reducir el riesgo de cáncer de colon. Sin embargo más allá de sus aplicaciones terapéuticas la aspirina modifica el comportamiento de las bacterias de modo aparente. En algunos casos esto tiene consecuencias en la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos o en la interacción entre microorganismos. Ello puede afectar tanto al éxito terapéutico como a procesos de producción biotecnológicos. Se revisan algunos de estos fenómenos y se sugieren posibles campos en los que la aspirina puede ser útil o perjudicial. Así se ha demostrado que la aspirina modifica de modo claro la penetración de algunos antibióticos y otras moléculas nocivas al interior de la bacteria. El salicilato induce ciertas resistencias a los antibióticos en *Escherichia coli*, mientras que en *Serratia marcescens* el comportamiento es más variable, en algunos casos induce decrementos de la susceptibilidad pero en otros aumentos. Se ha demostrado que las quinolonas con coeficientes de hidrofobicidad relativamente bajos pasan perfectamente a través de los canales hidrofílicos de las porinas, el perfil proteico de las membranas externas de bacterias que han crecido en presencia del salicilato no sufren ninguna modificación. Ello sugiere que la capacidad de paso no se modifica en absoluto en presencia de concentraciones terapéuticas de ácido acetil salicílico. Se determinaron los coeficientes de permeabilidad por el método de Zimmermann y Rosset para bacterias cultivadas en presencia o ausencia de salicilato observándose una reducción notable de dichos coeficientes en presencia de salicilato o acetilsalicilato. La posible explicación radicaría en que la aspirina y/o sus derivados no afectarían tanto a la entrada de antibióticos como a la salida de los mismos a través de las bombas de expulsión activas. Las medidas de actividad expulsora no parecen poner de manifiesto grandes diferencias, aunque si algunos incrementos en la actividad de extrusión. Esta propiedad podría tener interés en los procesos biotecnológicos con bacterias Gramnegativas en los que la dificultad para la exportación de ciertas moléculas a través de las envolturas celulares de la bacteria constituye posiblemente una de las mayores limitaciones.

Fungal biofilms and hydrophobins: role in virulence and biotechnological implications.

¹Martínez, J.P., ¹Pérez, A., ²Murgui, A., and ¹Casanova M.

¹Dpto. Microbiología y Ecología, y ²Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UVEG). Avda. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100-Burjasot, Valencia, España (Spain). jose.pedro.martinez@uv.es.

Biofilms are complex structured and interdependent communities of surface-associated microorganisms (mainly bacteria). The organisms are enclosed in an exopolysaccharide matrix occurring on any surface, particularly aquatic and industrial water systems as well as on a variety of medical devices, resulting in biofilm-associated infections. Hence, biofilms are highly relevant for public health. Nevertheless, biofilm systems are especially suitable for the treatment of recalcitrant compounds because of their high microbial biomass and ability to immobilize compounds. Consequently, beneficial applications of biofilm-mediated processes in bioremediation have also been proposed. Most microorganisms grow in structured biofilms rather than individually in suspensions and while in this environment may display altered phenotypes. Biofilms can be composed of a population that developed from a single species or a community derived from multiple microbial species. Although bacterial biofilms have been characterized in great detail, the study of medically relevant fungal biofilms has only recently come to the forefront. *Candida* species, particularly *C. albicans*, the most important causative agent of candidiasis, now the fourth most frequent nosocomial infection worldwide, readily form biofilms that, similarly to bacterial biofilms, are consortia of cells that form an organized community with a complex three-dimensional architecture enveloped within an exopolysaccharide matrix, attached to a solid substratum. The majority of manifestations of candidiasis at both mucosal and systemic sites are associated in one way or another with the formation of biofilms on inert or biological surfaces. In addition, biofilms have gained notoriety from their ability to resist the most commonly used antifungal agents.

Hydrophobins are among the most surface active biomolecules known and self-assemble at any hydrophilic-hydrophobic interface into an amphipathic film. Hydrophobins appear to be of ubiquitous occurrence among other filamentous fungi belonging to the ascomycetes and the basidiomycetes. The existence of hydrophobins in *C. albicans* has been not yet characterized. These small secreted proteins of about 100 amino acids, with eight cysteine residues located in conserved positions of their aminoacidic sequence, can be used to make hydrophilic surfaces hydrophobic and hydrophobic surfaces hydrophilic and fulfill a broad spectrum of functions in fungal growth and development. Besides, the properties of hydrophobins make them interesting candidates for use in a wide range of medical and technical applications. Two different families of hydrophobins, class I and class II, have been described.

Considering the biological features of hydrophobins, a possible role of these molecules in biofilm formation could be expected. Our group has found evidences for the presence in *C. albicans* of a polypeptide species belonging to a subset of fungal proteins also containing an eight-cysteine domain referred as CFEM (Common in several Fungal Extracellular Membrane proteins), with characteristics reminiscent of a class II-type hydrophobin. The gene (*PGA10/RBT51/HPB1*) encoding this molecule was isolated. The biofilm-forming ability of several *C. albicans* mutants with single, double and triple deletions of genes encoding this and other protein species also containing the CFEM domain (*RBT5* and *WAPI/CSA1*) was determined. Results suggest that fungal proteins containing the CFEM domain may play a key role in the formation, development and/or maintenance of the biofilm structure in *C. albicans*.

Microbial proteases: industrial applications and engineering

Margarita Poza Domínguez,

Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, 15782, Spain.

e-mail: mpmipoza@usc.es

ABSTRACT

Proteases are essential in many biological processes such as cell growth, differentiation or nutrition, and are essential biocatalysts in all forms of life on earth. Proteases have been extensively used for a large variety of applications, mainly in the detergent and food industries, but also in the pharmaceutical industry as new tools for medicine. Microorganisms account for a two-thirds share of commercial protease production throughout the world. They can be cultured in large quantities in a short time by established methods of fermentation, thus producing an abundant supply of the desired products. Genes coding for microbial proteases have been cloned and expressed in a broad range of microorganisms in order to modify their properties or their expression levels. Recombinant microorganisms represent an excellent source for the production of heterologous proteases due to their fast ratio of growth, their marketability and a profound knowledge of their genetics.

Plasmid segregation in firmicutes: plasmid pSM19035 use three different avenues to assure stable plasmid inheritance

Florencia Pratto, Virginia S. Lioy and Juan C. Alonso.

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Darwin 3, 28049 Madrid, Spain

Plasmid pSM19035 has evolved different genetic strategies to respond to copy number fluctuations and to increase its stability in *Bacillus subtilis* cell (SegA and SegB regions). The SegA region encodes two transcriptional units, which maps within the minimal replicon, whose products enhance plasmid stability and proper plasmid replication. The first unit transcribes the α and β genes and the second transcribes the γ gene. Dimeric protein β_2 is required for the conversion of oligomeric forms into monomers, that maximizes the number of plasmid units to be segregated between the daughter cells. Protein γ has a topoisomere III activity, and is required for wild-type plasmid replication, whereas the activity of protein α is unknown. The SegB region encodes two transcriptional units, which maps outside the minimal replicon, whose products assure better-than-random pSM19035 distribution. The first unit transcribes the δ (or *parA*) gene and the second transcribes the ω (*parB*), ϵ (antitoxin) and ζ (toxin) genes. Dimeric protein δ_2 is a *bona fide* ParA partition function. Proteins δ_2 and ω_2 and the *cis*-acting *parS* site are required for accurate plasmid partition at daughter cells. Protein δ_2 binds to DNA and has a poor ATPase activity. At low ω_2 : δ_2 ratios, δ_2 nucleoprotein filaments formation, plasmid pairing and ATP hydrolysis were enhanced in presence of *parS* and ATP. These activities were abolished when protein ω_2 was substituted by $\omega_2\Delta N19$ (lacking the unstructured Ntermini) or ω_2T29A (blocked in *parS* binding), or higher at ω_2 : δ_2 ratios. We proposed that in the presence of *parS* and ATP, ω_2 modulates δ_2 activities, and trigger the switch to timely separation of plasmid molecules. Dimeric protein ω_2 is also a global regulator of replication and partition functions, and proteins ζ and ϵ form a toxinantitoxin complex ($\epsilon\zeta_2$) that controls plasmid maintenance by post-segregational growth inhibition (PSGI). Accumulation of ζ toxin free of ϵ antitoxin induced loss of cell proliferation in both *B. subtilis* and *Escherichia coli* cells. Induction of a ζ variant ($\zeta Y83C$) triggers stasis, in which *B. subtilis* cells are viable but unable to proliferate, without selectively affecting protein translation. In *E. coli* cells, accumulation of free ζ toxin induced stasis, but this was fully reversed by expression of the ϵ antitoxin within a defined time window. The time window for reversion of ζ toxicity by expression of ϵ antitoxin was dependent on the initial cellular level of protein ζ .

Mecanismo molecular del control por fosfato de la expresión génica y de la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces*

A. Rodríguez García^{1,3}, F. Santos¹, C. Barreiro¹, A. Sola-Landa¹, K. Apel¹, E. Franco¹, J. F. Martín^{1,2}

¹INBIOTEC, Instituto de Biotecnología de León, Parque Científico, Avda. Real, 24006 León; y ²Área de Microbiología, Facultad de Biología y Ciencias Medioambientales, Universidad de León, 240071 León. ³degaro@unileon.es

Es bien conocido que las vías biosintéticas de metabolitos secundarios en diferentes especies del género *Streptomyces* están reguladas negativamente por concentraciones en exceso de fosfato. Cuando se agota el fosfato en el medio de cultivo se desencadena la activación de los genes biosintéticos. La limitación de fosfato en *Streptomyces* y otras bacterias desencadena asimismo cambios de expresión en un gran número de genes de metabolismo primario, conocidos como el regulón PHO. Este control por fosfato está mediado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. Se ha obtenido un mutante *ΔphoP* en la especie modelo *S. coelicolor* por reemplazamiento génico. Para el estudio de esta respuesta reguladora se ha realizado un análisis transcriptómico, proteómico y bioinformático comparando las respuestas de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *ΔphoP*. El análisis estadístico de los resultados ha permitido clasificar la respuesta de 529 genes que responden a la limitación de fosfato en 12 tipos de perfiles. Diez de estos tipos de perfiles corresponden a genes cuya respuesta depende de PhoP, mientras que la respuesta del resto de genes no depende de PhoP, lo que indica la existencia de otros circuitos de regulación. La respuesta primaria a la limitación de fosfato comprende el incremento en la síntesis de enzimas necesarias para obtener fosfato de compuestos orgánicos fosforilados, y la sobreexpresión del operon *pstSCAB* que codifica el transportador de fosfato de mayor afinidad. Asimismo, se han encontrado interacciones entre el metabolismo de fosfato y la expresión de genes regulados por nitrógeno, y también con genes de respiración de nitrato. La represión dependiente de PhoP de la agrupación de biosíntesis de prodigioninas y de genes de diferenciación morfológica se correlaciona con el fenotipo del mutante *ΔphoP*. Este fenotipo en cultivos líquidos y sólidos se caracteriza por una mayor producción de antibióticos y por un adelanto en la esporulación. El análisis bioinformático de los genes controlados por PhoP ha revelado la existencia de potenciales sitios de unión (cajas PHO). Mediante ensayos de retraso de la movilidad electroforética se han validado experimentalmente varios de estos sitios de unión.

A genome-scale model of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: useful for omics data integration and exploring metabolic capacities

Bas Teusink^{1,2,3}, Anne Wiersma^{1,2}, Douwe Molenaar^{1,2}, Christof Francke^{1,3}, Willem M. de Vos¹, Roland J. Siezen^{1,2,3} and Eddy J. Smid^{1,2}

¹Wageningen Centre for Food Sciences, Wageningen, ²NIZO food research, Ede, and

³Centre for Molecular and Biomolecular Informatics, Radboud University Nijmegen, The Netherlands Bas.Teusink@nizo.nl

Systems biology took off because of the omics revolution, confronting biologists with the need of models for data integration, analysis, and - ultimately - understanding of the complexity of biological systems. Hence, if we want to make optimal use of functional genomics data, we need models of genome scale. We have built a genome-scale metabolic model of *Lactobacillus plantarum* WCFS1, an important industrial lactic acid bacterium, both for food and health applications. The complete model currently consists of 546 unblocked internal reactions and 434 corresponding metabolites, 97 exchange reactions, and 721 genes (23.5% of the genome). The model is based on bioinformatics, comparison with other genome-scale models, literature, and in-house generated experimental evidence for the presence of pathways. Interactive metabolic maps have been generated, enabling data projection onto these maps. These maps are now an important tool in the laboratory for interpretation of DNA-microarray experiments.

Anaerobic chemostat experiments were run to generate physiological data for model construction and validation. Fluxes and biomass composition were measured. Since *L. plantarum* only grows in relatively complex media containing many amino acids and vitamins, maintenance and growth-associated ATP consumption rates are relatively difficult to estimate. ATP production rates based only on lactate and acetate production rates were compared to those based on maximisation of ATP production by the complete model, taking all measured fluxes into account. Both methods actually gave similar results. However, the model could be used to identify all medium compounds that potentially contributed to ATP generation. These included branched-chain and aromatic amino acids that were known to be important for flavor formation, but that were not previously implied in free-energy generation.

Optimization of an objective function –referred to as flux balance analysis (FBA)- has been often used to predict flux distributions in metabolic networks. When biomass formation was used as an objective function, FBA failed to predict metabolic behaviour of *L. plantarum*. The likely reason for failure of FBA in the case of *L. plantarum* is that the strategy of efficiency, implied by FBA, is not optimal in the nutrient-rich environments to which this bacterium has adapted. Rapid sugar consumption and concomitant acidification of the ecological niche appears a better strategy. Thus, rather than accurately predicting flux distributions, FBA appears more useful for exploring potential contributions to metabolic objectives, such as ATP generation.

Potential applications of bacteriocins from aquatic food products

Pilar Calo-Mata, Marta Prado, Ananias Pascoal, Tomás G. Villa and Jorge Barros-Velázquez

Food Technology. Department of Analytical Chemistry and Bromatology, Veterinary School, Campus Lugo, University of Santiago de Compostela, E-27002, Lugo (Spain, EU)

Food safety and quality is an issue of greatest concern of the food industry. Fish and fishery products are among the most internationally traded food commodities. World fish production, including wild fish captures and aquaculture production, has increased steadily the last years. Aquaculture of finfish, crustaceans, mollusks, and algal plants is one of the fastest-growing food-producing sectors. Fish and shellfish account for the most of the food-borne disease cases, due to the presence of pathogenic bacteria such as *Vibrio* spp., *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium botulinum*. One approach to control de fish and food-borne disease is the use of probiotics. Probiotics are added to fermented foods, several factors must be considered that may influence the ability of the probiotics to survive in the product and become active when entering the consumer's gastrointestinal tract. Probiotics produce antimicrobial compounds, bacteriocins, that can be used to inhibit the growth or kill themselves and sensitive competitors. Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) are receiving increased attention as potential food preservatives. The use of bacteriocins in packaging materials has received a great attention in the last years.

Autólisis, autofagia y espuma de champagne

Ramón González, Eduardo Cebollero, Laura Tabera, Yolanda Núñez, Alfonso V. Carrascosa, Rosario Muñoz, Adolfo Martínez-Rodríguez
Instituto de Fermentaciones Industriales. CSIC. C. Juan de la Cierva 3, 28006 MADRID

La autofagia es un proceso catabólico conservado en todas las células eucariotas mediante el cual el material citoplasmático es degradado en la vacuola/lisosoma (Baba et al., 1997). En *Saccharomyces cerevisiae* la autofagia se induce bajo condiciones de ayuno y permite a la célula reutilizar sus propios componentes para mantener funciones metabólicas esenciales. El transporte del material citoplasmático hasta la vacuola se produce a través de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas.

La autofagia constituye una fase previa a la autólisis, un proceso que contribuye a la calidad de diversos tipos de vinos, fundamentalmente los vinos espumosos elaborados por el método tradicional (Cava y Champagne), y los vinos criados sobre lías. Los productos de autólisis influyen positivamente en el sabor, aroma y características de la espuma de estos vinos. Esto se debe fundamentalmente a los compuestos que pasan de las células de levadura al vino. Sin embargo las interpretaciones disponibles hasta recientemente sobre los mecanismos de la autólisis de *S. cerevisiae* en condiciones enológicas entraban en conflicto con la descripción habitual del proceso autofágico.

Recientemente, en nuestro grupo hemos demostrado que el proceso autofágico también tiene lugar en condiciones de elaboración de vinos espumosos (Cebollero *et al.*, 2005). Esta información ha servido para la obtención de cepas de levadura industrial, mejoradas mediante mutagénesis al azar o ingeniería genética, para la elaboración de vinos espumosos o de otros vinos criados sobre lías.

Referencias

- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J., Ohsumi, Y. 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell. Biol.* 139: 1687-1695.
- Cebollero, E., Carrascosa, A. V., Gonzalez, R. 2005. Evidence for yeast autophagy during simulation of sparkling wine aging: A reappraisal of the mechanism of yeast autolysis in wine. *Biotechnol. Prog.* 21: 614-616.

Detección de microorganismos genéticamente modificados en alimentos.

M. Prado, P. Calo, A. Pascoal, A. Cepeda y J. Barros Velázquez

Tecnología de los Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.

En los últimos años la opinión pública, y particularmente los consumidores europeos, han venido observando con recelo el uso de los organismos modificados genéticamente (OGM) en la producción de alimentos. Esto ha llevado a la UE a la adopción de una legislación más restrictiva en cuanto a la autorización y etiquetado de OGMs. Lo que implica, a su vez, un gran esfuerzo en el desarrollo de métodos fiables para la identificación de los mismos. En el caso particular de los microorganismos modificados genéticamente, su detección puede verse dificultada debido a sus especiales características.

De entre los métodos utilizados para la detección de la presencia de OGMs, son las técnicas basadas en el análisis de ADN, tales como la hibridación o la PCR, las que presentan una mayor fiabilidad. Para el diseño de métodos basados en el análisis de ADN y su aplicación a matrices de tipo alimentario, existen una serie de factores críticos como la purificación de ADN, o la elección de la secuencia a determinar. En el caso de la purificación de ADN su importancia radica en que estas matrices son frecuentemente de una gran heterogeneidad y a menudo han sufrido procesos intensos por lo que el ADN puede encontrarse fuertemente degradado y en pequeña proporción lo que hace imprescindible una buena homogeneización de la muestra para que esta sea representativa del producto a analizar, por otra parte en los productos alimentarios es frecuente la presencia de sustancias que pueden influir negativamente en la detección de ADN y que por tanto será necesario eliminar. En cuanto a la elección de secuencias a investigar, es importante que sirvan para identificar inequívocamente una modificación genética. En el caso de los microorganismos, y particularmente en el de las bacterias, son frecuentes las transferencias de genes entre individuos de manera natural, lo que puede llevar a equívoco a la hora de detectar microorganismos modificados genéticamente. La detección de la secuencia diana puede ir acompañada de la identificación del microorganismo receptor, de este modo se asegura que el ADN recombinante detectado está contenido en la cepa huésped utilizada para la construcción del OGM.

Este enfoque es de gran utilidad para la detección de posibles eventos autorizados, ya que la información está disponible en la literatura científica, sin embargo para asegurar que los alimentos están exentos de eventos no autorizados, es necesario recurrir a la utilización de distintas secuencias normalmente empleadas para su construcción.

Pentose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* in a bio-refinery context

Bärbel Hahn-Hägerdal

Applied Microbiology, LTH/Lund University, P O Box 124, SE-221 00 LUND, Sweden. barbel.hahn-hagerdal@tmb.lth.se

The prospects of global warming and the potential future shortage of fossil chemical feed-stocks have turned the interest towards utilization of renewable raw materials derived from agriculture and forest products. Such raw materials – lignocellulosics – are composed of lignin, cellulose and hemicellulose. In a bio-refinery concept the raw material may be pre-treated at elevated temperatures with small amounts of dilute acid or SO₂ to make cellulose and hemicellulose accessible to subsequent acid or enzymatic hydrolysis. During pre-treatment and acid hydrolysis fermentation inhibitors – phenol and furan derivatives and low molecular weight fatty acids - are released. Cellulose and hemicellulose are hydrolyzed to fermentable monomer sugars (glucose, mannose, galactose, xylose and arabinose), while lignin is recovered as a solid fuel.

Hydrolyzed lignocellulosic raw materials thus comprise a mixed-sugar substrate in an inhibiting matrix. Because of its high inhibitor tolerance, its wide biological activity and its proven record as industrial fermentation micro-organism, Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the prime choice of micro-organism for a bio-refinery. The presentation will address how the advent of modern DNA-technology including metabolic engineering and evolutionary engineering as well as the concept of systems biology permits the development of recombinant *S. cerevisiae* with novel and artificial activities to be exploited in the energy, chemicals and materials industries.

Biorremediación

Ana Segura, Juan-José Rodríguez-Hervá, Vanina García, Beatriz Rivera, Ana Hurtado y Juan Luis Ramos

Estación Experimental del Zaidín, Profesor Albareda, 1 18008-Granada,
e-mail:ansegura@eez.csic.es

La utilización de microorganismos para la eliminación de contaminantes es una alternativa atractiva frente a la utilización métodos físico-químicos, más costosos y agresivos con el medio ambiente. Pese a que los microorganismos son capaces de degradar gran cantidad de contaminantes, su eficacia en labores *in situ* está todavía lejos de ser óptima. En la eliminación de contaminantes por microorganismos, podemos hablar de atenuación natural, bioestimulación ó bioaumentación.

Uno de los problemas a la hora de utilizar cualquiera de estas estrategias, sobre todo en áreas fuertemente contaminadas es la toxicidad de estos compuestos que puede poner en peligro ó retrasar enormemente la biodegradación de los contaminantes.

En los últimos años hemos estado trabajando en la identificación de los mecanismos moleculares de la tolerancia a disolventes orgánicos de una bacteria altamente tolerante (*Pseudomonas putida* DOT-T1E). El principal mecanismo de resistencia es la extrusión del compuesto tóxico hacia el exterior mediante bombas de eflujo. A raíz del desastre del Prestige, iniciamos un nuevo proyecto encaminado a la identificación de bacterias marinas tolerantes a disolventes orgánicos, haciendo especial énfasis en aquellas que además de ser tolerantes fueran capaces de degradar otros compuestos presentes en los derrames de petróleo, como pueden ser los hidrocarburos aromáticos policíclicos Aunque los disolventes orgánicos son volátiles y su concentración disminuye considerablemente a los pocos días del derrame, su toxicidad puede provocar la muerte de las bacterias marinas de la zona, que posteriormente tendrán que recolonizar el área para llevar a cabo la biorremediación, retrasando todo el proceso.

Utilization of viticulture wastes for obtaining economic fermentative nutrients and food additives

José Manuel Domínguez González

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo (Campus Ourense),

As Lagoas s/n, 32004 Ourense, ESPAÑA

Phone: 34-988-387047; Fax: 34-988-387001; E-mail: jmanuel@uvigo.es

Every phenomenon that changes the balance of an ecosystem represents a pollutant system. This is the case of the organic wastes from the agro-alimentary activities, and thus the effluents of the viticulture, as the vinification lees. Although, they are natural and do not show a big toxicity, these effluents can give place to the destruction of the fauna and flora when they are spilt in great quantity in a river, a reservoir or a lake. The wine activity is considered to be today an industry capable of producing environmental damages, and consequently these residues must be treated, particularly if we take into account that the production of waste water in this sector in Spain is $18 \cdot 10^6 \text{ m}^3/\text{año}$, 6 fold the amount generated in France or Italy.

Vinification lees are produced in wineries, during wine elaboration. In occasions they are distilled to recover alcohols and aromatic substances, staying therefore some impoverished lees in these compounds. The composition changes depending on if they have been distilled or not and of the decanting from which they come.

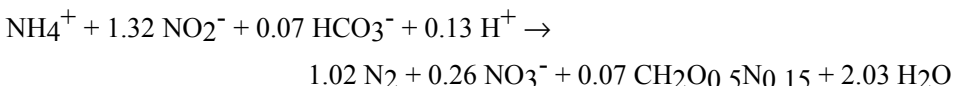
Nutrients traditionally employed in fermentative media turn out to be very expensive to carry out the process in an industrial scale, thus searching for alternative nutrients, more economic, is very interesting. Because of lees are basically death yeasts, this fraction is a potential source of nutrients. In this way, we try to develop a suitable technology to use lees as an economic nutrient.

Contribution of the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process to the nitrogen cycle: Application to the wastewater treatment

A. Mosquera-Corral, J. L. Campos and R. Méndez

Department of Chemical Engineering. School of Engineering. Rua Lope Gómez de Marzoa s/n. University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail address: eganusmc@usc.es

The Anammox (ANaerobic AMMonium OXidation) is a recently discovered process involved in the nitrogen cycle and carried out by autotrophic bacteria, which oxidize ammonia to nitrogen gas, under strictly anoxic conditions, using nitrite as electron acceptor. In this reaction carbon dioxide is fixed and converted into inorganic carbon. The stoichiometry of this process has been proposed by Strous [1], based on mass balances, as:



The bacteria involved in this process belong to the order Planctomycetales and have been identified in samples collected from different sources: wastewater treatment plants, marine environments, aquaculture systems, etc. From these works it has been estimated that Anammox process is responsible of around 19 to 35 % of all the formed N_2 in the water column [2]. Further identification of this organisms indicated that they belong to three different genera: Brocadia, Kuenenia and Scalindua.

The use of enriched cultures of these bacteria for the wastewater treatment is being object of research due to their costs savings, compared to the conventional activated sludge systems, associated to the less oxygen requirements for ammonia oxidation via nitrification and the unnecessary external addition of organic matter for denitrification.

The application of the Anammox process to the wastewater treatment at full scale is limited by the very low growth rate of the Anammox bacteria ($\mu_{\text{max}} = 0.003 \text{ h}^{-1}$), which involves very large start-up times. The reduction of the start-up period is possible by using systems, like "Sequencing Batch Reactors" (SBR), that prevent biomass washout and to allow the enrichment of these bacteria. Further research is needed to establish the optimum operational conditions for the utilization of a technology based on the Anammox process for wastewater treatment.

Keywords.- Anammox, nitrogen, wastewater treatment.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Government (Biogramem project CTQ2005-04935/PPQ) and Xunta de Galicia (Grafan project PGIDIT04TAM265008PR).

References

- [1] Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G. and Jetten M. (1998). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**, 589-596.
- [2] Arrigo K.R. (2005). *Nature*. **437**, 349-355.

El convenio SEM-ENAC: Realidad y Perspectivas

José Martínez Peinado

Presidente de la Comisión de Normalización y Validación de la SEM

Las relaciones institucionales entre la Sociedad Española de Microbiología, SEM y la Entidad Nacional de Acreditación, ENAC, comenzaron oficialmente en el año 2003, cuando se iniciaron las reuniones entre Ignacio Pina, director técnico de ENAC y José Martínez Peinado, vicepresidente de SEM y presidente de su Comisión de Normalización y Validación (CNV). Estos contactos previos permitieron la redacción de un Convenio Marco que fue firmado el 5 de julio de 2004 por Carlos Hardisson Romeo, presidente de SEM y Antonio Muñoz Muñoz, presidente de ENAC.

En el convenio se reconoce explícitamente que un objetivo común de ambas instituciones es “el trabajar para elevar el nivel técnico y el reconocimiento de los laboratorios de análisis microbiológico tanto nacional como internacionalmente” y se identifica a la acreditación de la competencia técnica como una herramienta eficaz para conseguir ese objetivo. Ambas instituciones reconocen la capacidad para “desarrollar procedimientos apropiados de acreditación de laboratorios de ensayos microbiológicos... de acuerdo con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025, que tiene ENAC, y los conocimientos científicos y la experiencia profesional que pueden aportar los socios de SEM.

Tras dos años de aplicación del convenio ya hay resultados en esa colaboración, como la aportación de listas de expertos y la preparación de dos informes sobre validación de técnicas moleculares y uso de cepas de referencia que podrán servir como guía a los auditores y laboratorios en el proceso de acreditación. Esperamos seguir ese camino siguiendo el lema de ENAC en su vigésimo aniversario: “Generando confianza”.

Experiencia sobre la acreditación de un laboratorio de análisis microbiológico según ISO 17025

Oliva Cadahía Mariz

Jefa del Laboratorio de Salud Pública, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Lugo

- La Acreditación supuso una estrategia para la mejora y aseguramiento de la calidad
- Mayor seguridad ante situaciones legales y de ámbito judicial.
- Un cambio técnico y organizativo que supuso un aumento de la receptividad y capacidad para el cambio. La organización se hizo más flexible ante nuevos retos técnicos.
- Descubrimiento de una serie de capacidades como grupo de trabajo y se aprendió a trabajar en equipo.
- Mayor gasto en formación e información, con las consiguientes mejoras como la motivación y estímulo.
- Duplicidad de gasto y trabajo.
- Poco operativa en caso de tener acreditadas varias líneas de trabajo. Se puede mejorar.
- Exagerado nivel de exigencia en temas como Validación y Calibración.
- Desproporción en las exigencias de controles de calidad internos.

Últimas tendencias en materia de gestión y control de calidad en el campo de la microbiología

Inmaculada Lorente

Directora de Operaciones, ENAC, Madrid

El desarrollo y realización de análisis de control microbiológico es una herramienta que tiene una gran repercusión en la salud pública, dado que permite garantizar la seguridad de los productos que van a ser distribuidos. Dicha herramienta no sólo permite asegurar que el producto reúne unos requisitos determinados, sino que también es utilizada para verificar el correcto funcionamiento de los sistemas de aseguramiento de la calidad (por ej. HACCP), realizar estudios epidemiológicos, e incluso condicionar el comercio internacional de los productos.

Es por ello que tanto los métodos analíticos, como los laboratorios que realizan los análisis deben asegurar la fiabilidad de los resultados, lo cual implica que además de reunir los criterios científicos que aseguren su validez, deben poder ser reproducibles y realizados con una serie de garantías que permitan obtener resultados comparables con independencia del laboratorio que los ejecute.

La coordinación, armonización y difusión de las tareas llevadas a cabo por los organismos científicos y de normalización con las entidades de acreditación y los propios laboratorios de análisis suponen pues un mecanismo que, además de garantizar los objetivos anteriormente fijados, tiene el valor añadido de optimizar los esfuerzos dirigiéndolos en una misma dirección de forma que se incremente la calidad y capacidad de los laboratorios de control.

La implantación de sistemas de calidad basados en la Norma ISO 17025, así como la acreditación de los laboratorios, a cargo de ENAC en España, suponen el reconocimiento de la competencia técnica de los laboratorios para lo cual es necesario además de verificar el cumplimiento de la Norma en sus aspectos de gestión, evaluar la capacidad técnica del laboratorio para emitir resultados fiables, lo cual incluye de forma especialmente importante tanto la adecuación de los métodos análisis empleados como de todos los factores que pueden influir en la ejecución de los mismos.

La experiencia adquirida durante los últimos años en la aplicación de los requisitos de la norma UNE EN ISO 17025 y la guía de microbiología G-ENAC-04, con la información aportada por los laboratorios y los expertos técnicos que participan en las evaluaciones y, la reciente publicación de diversa normativa relacionada con esta actividad, han hecho necesario que se replanteen las estrategias de evaluación de los laboratorios estableciendo unas directrices claras que permitan a los laboratorios demostrar su capacidad para emitir resultados fiables. Por ello, ENAC está trabajando en un proyecto cuyo objetivo final es publicar un documento con las particularidades de los ensayos microbiológicos y las directrices de ENAC para la evaluación de los laboratorios de ensayo que solicitan la acreditación según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 para ensayos microbiológicos.

Ventajas y dificultades de la acreditación de técnicas analíticas en los laboratorios de I+D+i

Dr. Serafín Carballo Cuervo

Director de Prysma Calidad y Medioambiente, S.A. y Profesor Asociado del Departamento de Microbiología III de la UCM

La investigación, el desarrollo y la innovación en los entornos biológicos (en su sentido más amplio: microbiología industrial, producción y control de alimentos, desarrollo de nuevos medicamentos, etc.) ha estado, como tantas otras cosas en la vida universitaria y científica de España, de espaldas a la evolución que el mundo empresarial llevaba adelante, en los aspectos relacionados con la calidad de los procesos y los productos así como en la verificación de la competencia técnica.

Investigar debe de ser sinónimo de frontera, de límite. No hay planos ni mapas del futuro. Investigar o innovar necesita el apoyo de criterios técnicos previos, de herramientas previas, que den confianza en el resultado y hagan de éste además de eficiente, eficaz. Esta confianza requiere de elementos objetivos que la sustente y como mínimo hay dos: confianza en los resultados de los equipos de medición y ensayo utilizados (calibración) y confianza en los resultados de los ensayos aplicados (validación) Esta confianza global es definida por ENAC como *competencia técnica*, que garantiza la fiabilidad de unos resultados.

Siendo realistas, se debería solicitar esta acreditación en aquellos casos en que las técnicas se usan durante la investigación con una cierta profusión, es decir, cuando estamos ante una técnica repetitiva. Es verdad que determinados proyectos son tan novedosos que requieren un esfuerzo en línea (por ejemplo desarrollar a un tiempo técnicas de producción y técnicas de control) en donde es difícil encontrar referentes que mediante comparación permitan obtener garantías mínimas. En estos casos la acreditación es más difícil desarrollo.

Un problema añadido es la baja oferta de formación (pública o privada) que hay en el mercado al respecto. ENAC tampoco oferta esta formación en un, a nuestro entender, exceso de finura en cómo se contempla la independencia del organismo.

Ventajas

- Garantía de los resultados y refuerzo de la confianza en los proyectos de I+D+i
- Aumento de la conciencia y sensibilización de técnicos y científicos hacia la necesidad de aplicar medidas de aseguramiento de la calidad de los resultados
- Estandarización de técnicas repetitivas
- Estabilidad en los procesos técnicos, ante cambios de la plantilla profesional
- Posibilidades de aumentar la financiación de los centros
- Formar parte de una red de mejora continua

Inconvenientes

- El proceso es complejo y largo en casi todos los casos
- Los criterios de interpretación son, en ocasiones difíciles de alcanzar,
- Existe técnicas para las que no hay posibilidades reales de encontrar patrones o métodos de validación y que son, por tanto, de muy difícil acreditación.
- La inversión necesaria puede ser eleva en ocasiones.
- No todos los centros disponen de personal adecuadamente formado
- La falta de una oferta suficiente de formación.

Clonación del gen de la quimosina de *Bubalis arnee bubalis* en el vector de expresión pET12a de *E. coli*.

Vallejo, J.A.; Ageitos, J.M.; Veiga-Crespo; Poza M y Villa T.G.

Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago de Compostela C.P. 15706 Santiago de Compostela jvallejo@usc.es.

En la actualidad existen cuatro fuentes de producción de cuajo destinadas a la elaboración de masas queseras (Rao *et al.*, 1998): las reninas animales (quimosinas), extraídas a partir del prensado directo de cuajares de terneros lechales; las proteasas aspárticas microbianas, obtenidas a partir del cultivo de microorganismos tales como *Rhizomucor miehei* o *Endothia*; las proteasas vegetales, como la cardosina obtenida a partir de infusiones e flores de *Cynara cardunculus* y las recombinantes, construidas mediante ingeniería genética. La introducción en el mercado de una cepa de *E. coli* que contenía el gen de la quimosina bovina representó el primer eslabón de una cadena que pretende reemplazar paulatinamente el cuajo animal por el microbiano o por el obtenido mediante ingeniería genética (Entage *et al.*, 1983). El búfalo (*Bubalus arnee bubalis*) lechal produce una quimosina similar a la quimosina bovina (Mohanty *et al.*, 2003;), que es capaz de originar masas queseras de gran calidad cuando se emplea como sustrato leche de vaca o de búfala. Además, el gen que codifica esta quimosina guarda un alto grado de similitud con el gen de la quimosina bovina, proteasa aspártica elegida en la industria quesera como la mejor para la fabricación de queso. Teniendo en cuenta que las granjas de búfalas están prosperando en la actualidad, se planteó en este trabajo la clonación en *E. coli* del gen de la quimosina de *Bubalus arnee bubalis* empleando el vector de expresión pET12a. Se extrajo el cDNA del gen de la quimosina de búfalo mediante RT-PCR empleando como molde mRNA extraído a partir de tejido de cuajar de un búfalo lechal. El cDNA obtenido se insertó en el vector pCR Blunt-II-TOPO (Invitrogen) empleando el kit *Zero Blunt TOPO PCR Cloning* (Invitrogen). A partir de la construcción del vector pCR-Blunt II-TOPO con el cDNA de la quimosina, se generaron extremos *Sal* I mediante PCR. De este modo se insertó este fragmento en el respetando la pauta de lectura, obteniendo así, una proteína de fusión con una señal de secreción al espacio periplásmico.

Se midió la actividad de este enzima en el medio extracelular, en el periplasma y en el interior celular utilizando un ensayo de coagulación sobre leche y el método de FITC k-caseína (Ageitos *et al.*, 2006).

- Mala Rao, B., Aparna Tanksale, M., Mohini Ghatge, S. y Vasanti Deshpande, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62; 597-635.
- Entage, J. S., Angal, S., Doel, M. T., Harris, T. J. R., Jenkins, B., Lilley, G. y Lowe, P. A. 1983. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *E. coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 80, 3671-3675.
- Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Kaushik JK, Grover S, Batish VK., 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Dairy Research* 70; 37-43.
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Poza, M., Villa, T. G. Fluorescein Thiocarbamoyl-Kappa-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases *J. Dairy Sci.* 2006 89: 3770-3777

Caracterización de la GGPPasa de *Gordonia jacobaea* mediante transposición y Tail-PCR.

Veiga-Crespo, Patricia, Calo, Pilar, Poza, Margarita y Villa, Tomás G.

Dpto. Microbiología y Parasitología. Fac. Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. veicres@usc.es

Los enzimas implicados en ruta de la ceto-carotenogenesis microbiana están poco caracterizados. Esta ruta, que se inicia con pasos comunes en todos los organismos, presenta estadios intermedios típicos de cada organismo así como diferencias en la acumulación de producto final. Los genes microbianos (*crt*) implicados en la ruta de la ceto-carotenogenesis presentan una organización típica en cluster. Estos genes microbianos han sufrido procesos de convergencia adaptativa. Es decir, presentan una función común pero un origen evolutivo distinto. El escaso conocimiento enzimático así como el fenómeno de convergencia adaptativa dificultan enormemente el diseño de estrategias para la caracterización de los genes de nuevos organismos. *Gordonia jacobaea*, aislado en nuestro laboratorio durante un muestreo rutinario de organismos productores de carotenoides acumula cantidades importantes de cantaxantina. El género *Gordonia* se caracteriza por presentar una pared rica en ácidos micólicos y pese a su interés sus mecanismos moleculares están escasamente caracterizados. Debido al enorme interés de los carotenoides en diferentes áreas de la industria como son la industria alimentaria o farmacéutica, así como, el potencial del género *Gordonia* este trabajo se centra en el desarrollo de métodos de transformación de *G. jacobaea* así como de estrategias que permitan caracterizar el cluster de la ceto-carotenogenesis de dicho microorganismo.

Fue posible llevar a cabo la transposición de *G. jacobaea* con el transposón EZ::TN Kan-2 (Epicentre) empleando el método de transformación por electroporación desarrollado en este laboratorio (Veiga-Crespo *et al.*, 2006). Así, se obtuvo el clon *G. jacobaea* MV26-T45. Este clon mostró un patrón de producción de carotenoides diferente al de *G. jacobaea*. Mediante el diseño de oligonucleótidos específicos, a partir de la secuencia conocida del transposón, y oligonucleótidos degenerados, obtenidos a partir de la secuencia del motivo 1 conservado de la geranil-geranil-pirosintasa (GGPPasa) fue posible emplear la técnica de la Tail-PCR para el aislamiento y caracterización del fragmento inicial del gen *crtE* que codifica para el enzima GGPPasa de *G. jacobaea*. El análisis del fragmento del gen *crtE* de *G. jacobaea* reveló que éste presentaba el motivo conservado 1 típico de las GGPPasas. Así mismo, dentro de este motivo de unión del sustrato se observaba la zona característica rica en residuos de aspártico. La estructura tridimensional permitió comprobar que dicho motivo adquiría la configuración funcional adecuada. También se observó que en *G. jacobaea* se observan fenómenos de convergencia adaptativa típicos de los genes implicados en esta ruta.

El análisis filogenético mostró que el gen *crtE* de *G. jacobaea* se engloba dentro de la rama perteneciente a los organismos Gram + con un alto contenido en (G+C) junto con las secuencias de organismos de los géneros *Streptomyces* o *Corynebacterium*.

Conclusiones: Los resultados obtenidos permiten concluir que la estrategia diseñada es adecuada para la caracterización de genes de especies de las que existe un escaso conocimiento molecular, especialmente si se trata de genes que han sufrido procesos de convergencia adaptativa.

Veiga-Crespo, P., Feijoo-Siota, L., de Miguel, T., Poza, M. and Villa, T. G. J. App. Microbiol. 100: 608-614, 2006.

Regulación de la biosíntesis de arginina en *Streptomyces coelicolor* y su relación con otras rutas metabólicas

R. Pérez-Redondo¹, **A. Rodríguez-García**², **S. Baños**¹, **MT. López-García**¹, **I. Santamarta**², **LM. Lorenzana Vega**², **P. Liras**^{1,2}.

(1) Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071 León, España. (2) Instituto de Biotecnología INBIOTEC. Avda. Real 1, 24006 León, España. E-mail: degmpr@unileon.es

Streptomyces coelicolor es el organismo modelo de este género de actinobacterias productoras de antibióticos. Dos de estos antibióticos son fácilmente detectables gracias a su coloración. La actinorrodina se excreta al medio y es azulada, mientras que las prodigiosinas —moléculas con estructura y origen comunes— se acumulan intracelularmente y proporcionan una pigmentación rojiza al micelio. Desde la secuenciación del genoma en 2002, se están desarrollando estudios para caracterizar la función génica y, especialmente, la regulación a escala genómica gracias al empleo de herramientas de transcriptómica y de proteómica.

El objetivo de este trabajo es estudiar el regulón de arginina en *S. coelicolor* con el objetivo de establecer las relaciones entre este aminoácido y otras vías de los metabolismos primario y secundario. Mediante la tecnología Redirect se ha obtenido el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ donde el gen *argR*, que codifica el represor transcripcional de los genes de formación de arginina, ha sido eliminado y sustituido por el gen de resistencia a apramicina. La producción de antibióticos está afectada en este mutante: no se detecta actinorrodina y los niveles de prodigiosinas son inferiores a los de la cepa control. Para estudiar las implicaciones reguladoras de la delección del gen *argR*, se llevaron a cabo hibridaciones de micromatrices de oligonucleótidos de DNA comparando las poblaciones de RNA de las cepas control y mutante cultivadas en medio definido con y sin arginina.

El análisis estadístico de los datos normalizados reveló que, de los 640 genes diferencialmente expresados, tan sólo 20, en la cepa control, y 24, en la cepa mutante, modifican su expresión cuando se adiciona arginina al medio de cultivo. Por tanto, el mayor número de cambios en el patrón de expresión se observa al comparar la cepa mutante con la control. Como se esperaba, y de acuerdo a la naturaleza represora de *argR*, los genes de biosíntesis de arginina están desreprimidos en la cepa mutante. Entre los genes con transcripción inferior en la cepa mutante respecto de la silvestre están *glnA* y *glnII*, que codifican glutamina sintetasas responsables del control del metabolismo del nitrógeno. El gen *afsR2*, que codifica un regulador pleiotrópico, reduce su expresión en la cepa mutante respecto de la silvestre. Este dato añade una nueva línea en la compleja red de interacciones que gobierna la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos secundarios en *Streptomyces*.

La bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* como fuente de “extremolitos”: solutos compatibles con aplicaciones industriales

C. Vargas, M. Argandoña, M. Reina-Bueno, R. García-Esteba y J.J. Nieto

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/Profesor García Gonzalez 2, 41012. Sevilla. cvargas@us.es

Los microorganismos extremófilos adoptan una variedad de estrategias que les permiten sobrevivir en condiciones drásticas de temperatura, presión o salinidad. Una nueva área de aplicación de algunos extremófilos es el uso de los “extremolitos”, solutos compatibles orgánicos que acumulan, para la protección de moléculas biológicas y células frente a diferentes tipos de estrés ambiental. En particular, la ectoína, que hasta la fecha sólo se puede producir biotecnológicamente, se utiliza en dermofarmacia, como componente de vacunas y kits para PCR, teniendo además aplicaciones potenciales como protector de enzimas y anticuerpos, como inhibidor de la formación de placas de amiloide típicas de enfermedades neurodegenerativas y como agente estabilizador de ácidos nucleicos, células procariotas y eucariotas, por citar algunos ejemplos. El derivado hidroxilado de la ectoína, la hidroxiectoína, presenta un mayor poder protector frente a la temperatura y a la desecación que la primera. Sin embargo, hasta la fecha, las cepas industriales que se utilizan para la producción de ectoína sintetizan una mezcla de ectoína e hidroxiectoína, acumulándose este último como un compuesto minoritario.

Nuestro Grupo de Investigación está interesado en la manipulación genética de la bacteria halófila *Chromohalobacter salexigens* con objeto de generar estirpes superproductoras de hidroxiectoína y estirpes capaces de sintetizar únicamente este soluto compatible. Mientras *C. salexigens* acumula tanto ectoína como hidroxiectoína mayoritariamente en fase estacionaria de crecimiento, la ectoína se acumula fundamentalmente en respuesta al estrés salino, y la hidroxiectoína lo hace frente a una temperatura elevada (1). Por otro lado, hemos aislado y caracterizado los genes responsables de las dos rutas principales de síntesis de ectoína (*ectABC*, 2,3) e hidroxiectoína (*ectD*,1,4), y estudiado la regulación de la primera de ellas (5). Los mutantes en el gen *ectD*, que codifica la hidroxilación de ectoína en hidroxiectoína, son termosensibles, lo que confirma que el principal papel de la hidroxiectoína en *C. salexigens* es la termoprotección (1). En este estudio, presentamos nuevos datos relativos a la regulación del gen *ectD*, y su ortólogo *ectE*, localizado a una distancia de aproximadamente 954 kb en el genoma de *C. salexigens*. Nuestros resultados sugieren que la expresión de *ectD* estaría sometida a una doble regulación: por temperatura (mediada por un factor equivalente a sigma-32) y por la proteína activadora EctR, cuyo gen está localizado delante de *ectD*. Por otro lado, la expresión de *ectE* es residual, a juzgar por los experimentos de PCR cuantitativa, y no parece contribuir significativamente a la actividad ectoína hidroxilasa.

(1) García-Esteba, R. *et al.* J. Bacteriol. 188: 3774-3784. 2006

(2) Cánovas, D. *et al.* J. Biol. Chem. 272:25794-25801. 1997

(3) Cánovas, D. *et al.* System. Appl. Environ. Microbiol. 21:487-497. 1998

(4) Cánovas, D. *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 65:3774-3779.1999

(5) Calderón, M.I. *et al.* Microbiology 150: 3051-3063. 2004

Obtención y expresión del permutante lineal AS-48L^{23,24} de la Enterocina cíclica AS-48

M. Montalbán-López, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia y M. Maqueda

Dpto de Microbiología, Facultad de Ciencias, C/ Fuentenueva s/n, 18071-Granada.

manuelml@ugr.es

AS-48 es una bacteriocina cíclica de síntesis ribosómica, producida por diferentes especies de *Enterococcus*, que muestra actividad frente a una gran variedad de microorganismos Gram-positivos e incluso algunos Gram-negativos, en particular cuando se ensaya con tratamientos combinados. Los estudios termodinámicos realizados con la molécula AS-48 nativa sugieren que las restricciones introducidas por la organización cíclica de la cadena polipeptídica contribuyen al incremento de la entropía, determinando que los valores de energía libre de Gibbs sean muy altos. Todo ello confiere a la molécula una gran estabilidad frente a numerosos factores físico-químicos (amplios intervalos de pH y temperatura, resistencia a agentes desnaturalizantes y exopeptidasas).

El objetivo de este trabajo era conseguir la expresión de la molécula lineal AS-48L^{23,24} con el fin de investigar la influencia de la ciclación y profundizar en el estudio de la estructura/función de esta bacteriocina.

Se ha logrado la expresión de la variante lineal AS-48L^{23,24} construida mediante permutación cíclica en el gen estructural *as-48A* por sucesivas PCRs. La clonación del gen permutado en el vector pBAT-4m bajo un promotor inducible (construcción pBAT-L^{23,24}) y su transferencia a la cepa BL21 de *E. coli* ha demostrado la imposibilidad de producir la variante lineal a pesar de haberse comprobado su expresión mediante Northern y RT-PCR. Dicha molécula ha sido, entonces, expresada como proteína de fusión con el dominio de unión para la colina de *Streptococcus pneumoniae* C-LYTAG (N-acetil-muramoyl-N-ala-amidasa LytA), empleando para ello el plásmido pALEXa (Biomedal). En la nueva construcción pALEXL²³⁻²⁴ el producto del gen cíclicamente permutado ha sido abierto entre los residuos 23 y 24 y clonado en fase con dicha proteína. Esta construcción ha sido empleada para transformar la cepa REG-1 de *E. coli* y expresar la proteína recombinante (aprox. 32 KDa), tras inducir con diferentes concentraciones de salicilato a distintas temperaturas, con el fin de optimizar las condiciones para su expresión.

Los resultados indican que la proteína de fusión es reconocida por anticuerpos específicos anti C-LYTAG y anti AS-48 y se encuentra en los extractos celulares entre las 3 y 5 horas de inducción a 28°C, mayoritariamente en estado soluble aunque también ha sido detectada formando cuerpos de inclusión, fracciones de las que ha sido purificada mediante cromatografía de afinidad. El retraso en el crecimiento del cultivo frente al control sin el gen *as-48L* clonado tras la inducción de ambos, indica un cierto grado de toxicidad de la proteína recombinante para la célula.

Método analítico para la medida de la actividad *k*-caseinolítica de enzimas

Ageitos JM, Vallejo JA, Poza M, Barros-Velázquez J y Villa TG.

Departamento de Microbiología, Universidad de Santiago de Compostela C.P. 15706 Santiago de Compostela. mpjmam@usc.es

Uno de los campos con mayor actividad en la tecnología de la alimentación es el concerniente a la industria quesera. En las últimas décadas la cinética de la coagulación de la leche ha sido ampliamente estudiada. El sistema clásico para medir la capacidad coagulante de un enzima consiste en la determinación del tiempo que pasa hasta que se produce hasta la aparición de coágulos en la leche. Debido a que la leche es sensible a cambios de pH y temperatura que pueden causar la coagulación de la misma, se han desarrollado otros métodos alternativos, tales como la determinación de diámetro de halo en agar-leche, la medición colorimétrica, o la determinación del grado de degradación de caseína previamente marcada bien con un isótopo radioactivo o bien con compuestos fluorocrómicos. Todos estos métodos utilizan caseína como sustrato para cuantificar la capacidad proteolítica o la actividad coagulante. Otros métodos posibles se basan en la medición de la viscosidad de la leche durante el proceso.

Las caseínas constituyen una familia de fosfoproteínas (α_1 , α_2 , β , k) que forman casi el 80 % de las proteínas de la leche. Estas proteínas se encuentran en la leche formando micelas solubles. La solubilidad de estas micelas se debe a las moléculas de *k*-caseína, que recubren y estabilizan la estructura. Las proteasas que coagulan la leche rompen esta fracción de las caseínas produciendo la precipitación de las micelas.

Basándose en el principio de la selectividad de estas proteasas, se llevó a cabo una modificación de un método anteriormente descrito (Twining, 1994), cambiando el sustrato (FTC-caseína) por un sustrato preferencial para estas proteasas (FTC-*k*-caseína).

El principal objetivo de este trabajo fue validar un nuevo método propuesto (Ageitos *et al.*, 2006) para la medición de la actividad *k*-caseinolítica, y por tanto, coagulante. Para ello, esta validación se llevó a cabo usando una batería de enzimas coagulantes de leche de diferente origen (animal, vegetal, fúngico, microbiano o recombinante) usadas rutinariamente en nuestro laboratorio y en la industria quesera.

Los resultados obtenidos permiten asegurar que el nuevo método descrito en este trabajo se muestra sensible y estable, permitiendo la medición de la capacidad *k*-caseinolítica de las muestras ensayadas. A su vez, este método permite la definición de unidades enzimáticas, siendo más específico y sensible que el propuesto por Twining (1984).

Ageitos, J.M., J.A. Vallejo, M. Poza y T.G. Villa. 2006. Fluorescein Thiocarbamoyl-*Kappa*-Casein Assay for the Specific Testing of Milk-Clotting Proteases. *J. Dairy Sci.* 89:3770-3777.
Twining, S.S. 1984. Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Casein Assay for Proteolytic Enzymes. *Anal. Biochem.* 143:30-34.

Caracterización de una nueva lacasa producida por *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 y evaluación de su potencial utilidad para su aplicación en las industrias papelera y textil.

Molina, J. M.; Hernández, M.; Moya, R.; Troyano, N.; Rodríguez, J. y Arias, M.E.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares, Madrid. E-mail: josem.molina@uah.es

Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, con la reducción paralela del O₂ a H₂O. Tradicionalmente han sido estudiadas en hongos y plantas, aunque recientemente se han hallado también en insectos y bacterias. El papel biológico que desempeñan las lacasas bacterianas no está muy definido aunque se han relacionado con procesos de pigmentación, resistencia al Cu y morfogénesis. La versatilidad catalítica de las lacasas, incrementada gracias a la acción de mediadores redox, las ha convertido en foco de interés para numerosas aplicaciones biotecnológicas incluyendo decoloración de colorantes textiles, blanqueo de pasta de papel, degradación de xenobióticos, síntesis química, células de biocombustible, etc.

El conocimiento de que se dispone acerca de las lacasas bacterianas es escaso y su utilidad biotecnológica apenas ha sido establecida. En este sentido, este trabajo presenta la caracterización de una nueva lacasa producida por *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 y pone de manifiesto su versatilidad para el bioblanqueo de una pasta Kraft de eucalipto y para la decoloración y destoxificación de un colorante textil tipo azo.

En primer lugar se establecieron las condiciones óptimas de producción en cultivo sumergido, seleccionando un medio basal salino suplementado con galactomanano, asparagina y sulfato de cobre. El máximo de actividad enzimática se alcanzó el cuarto día de cultivo. La enzima purificada mostró una masa molecular de 77 kDa, un punto isoelectrico de 6,23 y una temperatura óptima de reacción de 60 °C. La especificidad de sustrato de la lacasa varía en función del pH (por ej. el pH óptimo estimado para el ABTS y los compuestos fenólicos es de 4,5 y 8, respectivamente). Tras desnaturalizar la enzima con β -mercaptoetanol, se detectó una única banda de 33 kDa, lo que sugiere el carácter dimerico de esta lacasa, como sucede con otras lacasas bacterianas.

El ensayo de bioblanqueo de la pasta Kraft de eucalipto se llevó a cabo con la lacasa en presencia de ABTS como mediador, en tampón acetato pH 4,5 y con una consistencia de la pasta del 10 % (p/v). El tratamiento enzimático se mantuvo a 60 °C durante 1 hora, seguido de una etapa de blanqueo con H₂O₂ al 2 %. Los resultados obtenidos mostraron una reducción del 10 % en el número Kappa, un incremento del 3,5 % en la blancura ISO y un ahorro destacable en el peróxido consumido.

Por otro lado, la aplicación de sistemas lacasa-mediador para la decoloración de colorantes textiles requiere mediadores no cromogénicos. Hasta la fecha los resultados más interesantes se han obtenido con compuestos fenólicos relacionados con la lignina. En este trabajo se ensayaron varios de estos compuestos para la decoloración de un colorante tipo azo (Reactive Green), obteniendo los mejores resultados con la acetosiringona, ya que con este sistema lacasa-mediador se alcanzó un 90 % de decoloración. Además, el análisis de la toxicidad del colorante después del tratamiento (Sistema Microtox[®]) mostró un alto grado de detoxificación (incremento de más del 50 % en el EC).

Análisis de la cepa lipolítica *Pseudomonas* sp. CR-611 y clonación de una lipasa secretada de la familia I.3, independiente de la acción de un chaperón

Syfantou, N., Prim, N., Pastor, F.I.J., Diaz, P.

Dept. de Microbiologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 645, 08028-Barcelona, España. E-mail:nisifantou@yahoo.com

Los microorganismos y sus enzimas se usan en un amplio rango de procesos biotecnológicos como la hidrólisis de polímeros, la síntesis de elementos de valor añadido y la detoxificación del suelo. Sus aplicaciones universales aumentan el interés industrial por el descubrimiento de nuevas cepas que ofrecerán enzimas nuevas. Entre estas enzimas, las lipasas, las celulasas, xilanasas y pectinasas son de gran interés.

A partir de muestras de suelo de un bosque subtropical de Iguazú (Argentina) fueron aisladas cepas autóctonas bacterianas y fúngicas, algunas de las cuales mostraban actividad lipolítica (1). Entre otras, la cepa CR-611 crecida a 30 °C y pH 6.8, presenta una elevada actividad lipolítica sobre tributirina y aceite de oliva. La capacidad hidrolítica sobre acilglicéridos de cadena larga indica la existencia de por lo menos una lipasa auténtica (2). Por lo tanto, la cepa CR-611 fue elegida para la identificación y caracterización de su sistema lipolítico.

Mediante ensayos morfológicos, fisiológicos y filogenéticos, la cepa lipolítica CR-611 fue identificada como *Pseudomonas* sp. CR-611, considerada muy próxima a *P. fluorescens*. SDS-PAGE y análisis mediante zimograma (3) de extractos celulares y sobrenadantes de la cepa indicaron la existencia de un sistema lipolítico complejo, constituido por lo menos por tres enzimas lipolíticas. El alineamiento y la comparación de secuencias de lipasas y esterases de *Pseudomonas* previamente descritas, permitió el diseño de primers para el aislamiento de genes codificantes de nuevas lipasas o esterases. A partir de esta cepa, usando primers específicos para las lipasas de *P. fluorescens* pertenecientes a la subfamilia I.3, se amplificó un fragmento de DNA de aproximadamente 2000pb. Después de la ligación de este fragmento con el vector pGEMT y la transformación en *E.coli* DH5 α se obtuvo el clon recombinante *E.coli* DH5 α /pGEMT lip I.3. Análisis de actividad sobre papel [3] utilizando sustratos derivados de la metilumbeliferona mostraron que el clon presenta actividad lipolítica sobre MUF-butirato y sobre MUF-laurato, cuya cuantificación y caracterización bioquímica está en proceso actualment. La lipasa I.3A clonada parece no necesitar la unión de moléculas chaperonas para su correcto plegamiento y secreción, al contrario de lo que ocurre con otras lipasas de la familia I pertenecientes al género *Pseudomonas*.

(1) Ruiz, C., Pastor, F.I.J., Diaz, P. (2005) Lett. Appl. Microbiol. **40**:218-227.

(2) Arpigny, J.L. y Jaeger, K.E. (1999) *Biochem J.* **343**:177-183.

(3) Diaz, P., Prim, N., y Pastor, F.I.J. (1999) *Bio Techniques* **27**:696-700.

Actividades enzimáticas glicosídicas de *Oenococcus oeni* en relación con la mejora organoléptica en vinos

Albert Bordon¹, Fabiana Saguir², Cristina Reguant¹, Isabel Araque¹ y M. Cristina Manca de Nadra²

¹Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona. E-mail: albert.bordons@urv.cat

²Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, 4000 Tucumán, Argentina

El papel beneficioso más conocido de las bacterias lácticas (BL) como *Oenococcus oeni* en los vinos es la fermentación maloláctica (FML), o sea, la descarboxilación de L-málico a L-láctico. Ello conlleva una ligera desacidificación del vino, con lo que éste adquiere un carácter más suave y agradable. Además, durante la FML estas bacterias también contribuyen a otros cambios beneficiosos en el aroma y color del vino, pero que son en gran parte poco conocidos.

Las glicosidasas como la beta-glucosidasa son enzimas que tienen interés para potenciar el aroma del vino, ya que hidrolizan los precursores glicoconjugados procedentes del mosto, con lo que liberan los compuestos aromáticos como los terpenos. Algunas cepas de *O. oeni* bien adaptadas para llevar a cabo la FML podrían representar una fuente de beta-glucosidasas capaces de actuar en las condiciones fisicoquímicas del vino, con lo que influirían favorablemente en sus cualidades organolépticas, incrementando los aromas frutales. El uso de cepas de BL con actividades glicosídicas tendría ventajas respecto a las levaduras porque las BL son inoculadas directamente en el vino, que es un sistema más estable que el mosto. Pese a ello, estas actividades han sido muy poco estudiadas en las BL del vino.

Con ello, el objetivo de este trabajo es el estudio de las actividades glicosídicas en *O. oeni*, en función de la fase de crecimiento y de la cepa.

Para ello se han estudiado las actividades beta-glicosidasa, alfa-arabinofuranosidasa y alfa-ramnosidasa en cepas de *O. oeni*: dos aisladas de vinos argentinos, una de Tarragona y otra cepa de referencia. A partir de las células crecidas en medio MRS con L-málico a pH 5.0 a 27°C en anaerobiosis, se han determinado las actividades totales y específicas en suspensiones celulares y en sobrenadantes libres de células, a lo largo del crecimiento. Los ensayos se han efectuado añadiendo los sustratos p-nitro-fenil-beta-D-glucopiranosido, p-nitro-fenil-alfa-L-arabinofuranósido y p-nitro-fenil-alfa-L-ramnopiranosido y cuantificando espectrofotométricamente el p-nitro-fenol liberado.

Se han detectado las máximas actividades enzimáticas en las suspensiones celulares, al final de la fase exponencial, con máximos de 25 micromol/min por g (de peso seco de células) para beta-glucosidasa en la cepa de referencia. Las diferencias encontradas entre las cepas han sido notables y se han encontrado mayores actividades alfa-arabinofuranosidasa y alfa-ramnosidasa en las cepas aisladas de vinos que en la de referencia.

Cabe concluir que es preciso considerar la propiedad de actividades glicosídicas al seleccionar cepas de *O. oeni* como iniciadores de la FML, en relación a las características esperadas en el producto final.

Financiación: Agencia Española de Cooperación Internacional (A/2338/05) y CIUNT-CONICET (Argentina).

Caracterización molecular de la lipasa LipM producida por *Marinobacter lipolyticus*

E. Mellado, S. Martín, Fernández-Lafuente, R, Guisán, J.M. y A. Ventosa

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. emellado@us.es

Las bacterias halófilas moderadas constituyen un grupo muy heterogéneo de microorganismos adaptados a vivir en ambientes salinos, presentando una enorme versatilidad, al ser capaz de crecer en condiciones muy diversas, desde medios prácticamente no salinos (0,5-1% de sales) hasta medios con concentraciones salinas saturantes. Las enzimas producidas por ese grupo bacteriano poseen características que las hacen de gran utilidad en determinadas aplicaciones biotecnológicas, como el procesamiento de alimentos, la biorremediación ambiental y los procesos biosintéticos. La posibilidad de usar lipasas producidas por bacterias halófilas moderadas en estos procesos industriales aporta la ventaja de disponer de actividades enzimáticas óptimas a valores extremos de salinidad, así como en algunos casos de pH y temperatura.

Un screening previo realizado en distintos ambientes salinos del sur de España, encaminado al aislamiento de bacterias halófilas moderadas productoras de enzimas ha permitido caracterizar una nueva especie bacteriana a la que hemos denominado *Marinobacter lipolyticus*, la cual posee actividad lipolítica intracelular.

La construcción de una genoteca de *M. lipolyticus* cepa SM19 en *Escherichia coli* nos ha permitido aislar y caracterizar el gen *lipM*. Este gen es responsable de la síntesis de la proteína LipM, una lipasa de 271 aminoácidos y una masa molecular estimada de 30,5 kDa. La comparación de la secuencia de LipM con las de otras lipasas existentes en las bases de datos reveló homología con el grupo de las α/β hidrolasas. El análisis de la estructura primaria de LipM ha permitido la localización de los motivos característicos de las lipasas/esterasas pertenecientes a esta superfamilia: el oxianión, el pentapéptido conservado y la triada catalítica. Además, la predicción de la estructura secundaria de LipM muestra el modelo de plegamiento conservado de esta familia de proteínas.

La mutagénesis de *lipM* mediante la inserción del casete Ω junto con ensayos de inmovilización del extracto crudo de *M. lipolyticus* sobre diferentes soportes hidrofóbicos, ha puesto de manifiesto la existencia de diferentes enzimas lipolíticas capaces de resolver mezclas racémicas de compuestos como el ácido (R,S)-2-butirol-2-fenilacético, el (R,S)-mandelato de metilo o el dietil fenilmalonato, compuestos de gran importancia en la síntesis de antibióticos β -lactámicos.

Mutagénesis aleatoria de la xilanasa B de *Paenibacillus barcinonensis*.

Óscar Gallardo¹, F.I.J. Pastor¹, Julio Polaina², Pablo Isorna³, Julia Sanz-Aparicio³, Pilar Diaz¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona. Av. Diagonal 645, Barcelona 08028. E-mail: ogallardo@ub.edu. ²Laboratorio de Estructura y Función de Enzimas, Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia. ³Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural, Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC. Madrid

Las xilanasas son enzimas con numerosas aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo el blanqueo de la pasta de papel. Estas aplicaciones se deben a la capacidad de estas enzimas para hidrolizar y modificar el xilano, polisacárido muy abundante en los materiales vegetales. Presentan además gran diversidad en cuanto a sus características bioquímicas y estructurales, y se clasifican principalmente en las familias 9 y 10 de glicosil hidrolasas. La xilanasa B (XynB) de *Paenibacillus barcinonensis*, caracterizada previamente en el grupo de investigación, además de alta actividad hidrolítica sobre xilanos, presenta también elevada actividad sobre aril-xilósidos, hecho que la diferencia claramente de las xilanasas típicas. Asimismo, diferentes ensayos indican que, contrariamente al resto de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*, la xilanasa XynB no es secretada al medio de cultivo, sino que permanece asociada a células.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las características estructurales de XynB, aumentar su termorresistencia, y conseguir un enzima más adecuado para determinadas aplicaciones industriales, el gen codificante *xynB* fue sometido a un proceso de mutagénesis al azar, mediante PCR mutagénica y "gene shuffling", proceso consistente en fragmentar las diferentes copias mutagenizadas de forma variable y después volver a recomponerlas por PCR de manera aleatoria, obteniéndose de esta manera una gran variedad y combinación de copias mutagenizadas del gen. De entre los clones mutantes obtenidos se seleccionaron los que mostraban mayor termorresistencia o mayor producción de xilanasa que el tipo salvaje. A partir de los clones elegidos se hizo una segunda selección de aquellos más termoestables, y tras la secuenciación de los mismos, se seleccionaron sólo los que presentaban mutaciones no silenciosas en la región estructural del gen: mutante 30 (E137D y D323N), mutante 64 (S15L) y mutante 80 (M93V). Las mutaciones fueron aisladas, las xilanasas mutantes obtenidas fueron purificadas y se ensayó la termoestabilidad de las mismas. Las mutantes M93V y S15L fueron las que mostraron un mayor aumento en su vida media a 50°C cuando se compararon con la xilanasa original. Estas dos mutaciones fueron combinadas en un doble mutante. Dicho mutante mostró un incremento adicional en su estabilidad muy superior al efecto de las dos mutaciones por separado.

Con el fin de conocer la estructura tridimensional de la enzima y la situación en ella de los residuos mutados, la xilanasa salvaje fue cristalizada y analizada por rayos X. La proteína presenta un plegamiento en barril tipo (α/β)₈, típico de la familia 10 de glicosil hidrolasas. Los aminoácidos situados en posiciones 15 y 93, correspondientes a las dos mutaciones que incrementan la termoestabilidad, están situados en la superficie de la estructura plegada de la enzima, donde interacciones más fuertes con aminoácidos próximos en el plegamiento pueden causar el incremento en estabilidad observado.

Ingeniería proteica de la celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis*.

Chiriac, A.I., Pastor, F.I.J.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona,
Av.Diagonal 645, 08028, Barcelona. e-mail: iuliachiriac@ub.edu

Las celulasas son O-glicosil hidrolasas que hidrolizan enlaces glicosídicos del polímero de celulosa. La abundante utilización de materiales celulósicos en la industria convierte a las celulasas en enzimas con un enorme potencial biotecnológico. Conjuntamente con las hemicelulasas se utilizan en la industria papelera con distintas finalidades, destacando su potencial para la mejora de las propiedades mecánicas del papel.

La celulasa Cel9B de *Paenibacillus barcinonensis* es una enzima modular con tres tipos de dominios estructurales: un dominio catalítico de la familia 9 (GH9), dos dominios de unión a celulosa de la familia 3 (CBD3c y CBD3a) y dos dominios de unión a fibronectina III (Fn3). Estudios previamente realizados mostraron que Cel9B presenta potencial aplicación en el refinado de la pasta de papel de *Eucalyptus* permitiendo importantes ahorros energéticos en dicho proceso [1].

Debido a su efecto diferencial respecto a otras celulasas ensayadas hasta el momento, es de interés profundizar en el estudio de la Cel9B, enzima aislada y caracterizada por el grupo investigador [2].

Mediante técnicas de ingeniería genética y clonación molecular se obtuvieron las celulasas recombinantes CD y CD-CBD correspondientes al dominio catalítico y al dominio catalítico más el primer dominio de unión a celulosa respectivamente, que se clonaron y se sobreexpresaron en *Escherichia coli*.

La caracterización bioquímica de las celulasas truncadas se realizó en paralelo con la celulasa salvaje y se hizo un estudio comparativo. Similar a la Cel9B, ambas enzimas truncadas mostraron una clara preferencia para celulosa amorfa, presentando máximo de actividad sobre carboximetil celulosa. La escisión del primer dominio de unión a celulosa (CBD3c) causó un descenso drástico en la actividad enzimática de la proteína, hecho observado en otros casos de enzimas con arquitectura estructural similar [3,4]. El dominio catalítico (CD) presentó muy baja actividad celulasa, equivalente al 0,52% de la actividad de la celulasa salvaje sobre el sustrato más afín, mientras que CD-CBD se mostró relativamente efectiva sobre celulosa amorfa. CD-CBD mostró un máximo de actividad a 60°C al igual que Cel9B, mientras que la temperatura óptima de la celulasa CD fue de 50°C. Únicamente Cel9B que contiene un segundo dominio de unión a celulosa (CBD3a) se unió a los sustratos de celulosa ensayados.

Actualmente se está realizando una caracterización más completa de las construcciones realizadas y construyendo otras nuevas con el resto de los dominios de Cel9B.

[1] García, O., Torres, A.L., Colom, J.F., Pastor, F.I.J., Díaz, P., Vidal, T. 2002. 9: 115-125

[2] Pastor, J.I.P., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A.L., Díaz, P. 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 61-68.

[3] Irwin, D., Shin, D.-H., Zhang, S., Barr, B.K., Sakon, J., Karplus, P.A. y Wilson, D.B. 1998. *J. Bacteriol.* 180: 1709-1714.

[4] Arai, T., Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. 2001. *Appl. Microbiol. Biotech.* 57: 660-666.

Molecular cloning, purification and characterization of a family 12 glycosyl hidrolase from *Stachybotrys atra* in *Escherichia coli*.

Picart, P.* and Pastor, F.I.J.

Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. * e-mail: perepicart@hotmail.com

β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-Glucans are polysaccharides widespread in nature as component of cell walls of cereals and also found in lichens (Stone and Clarke, 1992). The biodegradation of these polymers in nature is catalyzed by licheninases (lichenases, β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.73) that can differ in the substrate specificity.

Family 12 Glycosyl-hidrolase fungal cellulases degrade amorphous, but not crystalline cellulose (Henriksson et al. 1999). These enzymes act specifically on lichenan, barley glucans and other cereal β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucans, but not on beta-D-glucans containing only 1,3- or 1,4-bonds. They strictly hydrolyze β -(1 $\rightarrow$ 4)-linkages (like cellulases), but they typically have no activity against true β -(1 $\rightarrow$ 4)-glucans (such as cellulose and carboxymethyl-cellulose, CMC) (Planas, 2000).

The lichenase Cel12A of *Stachybotrys atra* BP-A, a strain isolated in our laboratory from a dishcloth, was cloned in the expression vector pET28a and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The nucleotide sequence of the encoding gene was determined. It shows an open reading frame of 238 amino acids with a calculated molecular weight of 26.9 kDa and isoelectric point of 7.9. The majority of the recombinant protein was produced in an inactive form as inclusion bodies. Aims of solubilization of these inclusion bodies were not successful. To increase the proportion of soluble recombinant protein, we decreased the temperature of cultures after induction with IPTG. The recombinant protein was purified from the total soluble protein in crude cell lysate supernatants using Ni⁺-His TrapTM HP columns. The pure enzyme was highly active on mixed β -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucans (barley β -glucan and lichenan) but its specific activity against carboxymethyl-cellulose was much lower (50-fold). The lichenase activity of the recombinant protein showed optimal activity at a temperature between 45 and 50°C and the optimum pH for activity was 6.

Currently, we have cloned this enzyme in the fungi strain *Aspergillus niger* var. awamori to increase the levels of recombinant protein secreted to the medium to study its applications in industry.

Stone, B. A.; Clarke, A. E. (1992) Chemistry and Biology of 1,3- β - Glucans; La Trobe University Press: Bundoora, Australia.

Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. Biochim. Biophys. Acta 1543, 361-382.

Henriksson G, Nutt A, Henriksson H, Petterson B, Stahlberg J, Johansson G, Pettersson G (1999) Endoglucanase 28 (cel12A) a new Phanerochaete chrysosporium cellulase. Eur J Biochem 259:88-95.

Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of *Enterococcus faecium* strains with potential application in biopreservation in the food industry

Samuel Arlindo¹, Pilar Calo^{1,2}, Carlos Franco¹, Marta Prado³, Alberto Cepeda¹, Tomás G. Villa² and Jorge Barros-Velázquez^{1,2}

¹Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, LHICA, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain;

²College of Biotechnology, Institute of Aquaculture, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago, Spain; and ³Institute for Reference Materials and Measurements, European Commission Joint Research Centre, B-2440, Geel, Belgium; e-mail: jbarros@lugo.usc.es

The bacteriocins produced by two lactic acid bacteria isolated from non-fermented fresh meat and fish, respectively, and exhibiting a remarkable anti-listerial activity, were characterized. Bacteriocinogenic strains were identified as *Enterococcus faecium* and the maximum bacteriocin production by both strains was detected in the stationary phase of growth. The activity against *L. monocytogenes* was maintained in the 3-7 pH range and was stable in both strains after heating at 100°C or 121°C. The genes encoding for enterocin P was detected, isolated and sequenced in both *E. faecium* strains. They exhibited DNA/DNA homology in the 87.1-97.2% range with respect to the other four enterocin P genes reported so far. Three single nucleotide polymorphism events, silent at the amino acid level, were detected at nucleotide positions 45 (G/A), 75 (A/G) and 90 (T/C) in *E. faecium* LHICA 28-4 and may explain the differences reported for those *loci* in other enterocin P-producing *E. faecium* strains. This work provides the first description of enterocin P-producing *E. faecium* strains in non-fermented foodstuffs and, in the case of *E. faecium* LHICA 51, the first report of an enterocin P-producing strain isolated from fish so far. These strains may find industrial application for the biopreservation of non-fermented animal foods.

Characterization of bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from farmed turbot and with potential application to the seafood industry

Pilar Calo-Mata, Carmen A. Campos, Óscar Rodríguez, Marta Prado, Jorge Barros-Velázquez

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, LHICA, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain; e-mail: mppcalo@usc.es

The aim of this work was the characterization of new strains of lactic acid bacteria (LAB) from farmed fish and with potential application as biopreservatives against both *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Twenty-five strains of LAB isolated from the muscle of farmed turbot were investigated. Genetic identification of the bacteriocin-producing LAB strains was performed by means of a PCR method using novel BAL1/BAL2 16S ribosomal-RNA-targeted primers. Maximum bacteriocin production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* USC-39, *Enterococcus faecium* USC-46 and *Enterococcus mundtii* USC-51 was detected in the stationary phase of growth. Both acidification and the production of hydrogen peroxide by LAB were ruled out as the source of the inhibition. In contrast, the antimicrobial activity of all three LAB strains was inactivated by the addition of proteinase K, thus confirming the proteinaceous nature of the inhibition. The activity against *L. monocytogenes* was maintained in the 3.5-5.5 or 3.5-6.5 pH range, depending on the LAB strain. Likewise, inhibition of *S. aureus* strains was observed in the 3.5-4.5 and in the 3.5-5.5 pH ranges, depending on the LAB strain and on the *S. aureus* strain tested. Bacteriocin activity was stable in all three strains after heating the cell-free extract for 60 min at 100°C, or even for 15 min at 121°C, in all the three LAB strains. The acidic and heat-resistant bacteriocins produced by the three LAB strains isolated from turbot, able to inhibit the growth of both *L. monocytogenes* and *S. aureus* may find industrial application as biopreservatives in fermented and/or heated food products in the seafood industry.

Efecto de la agitación sobre la producción de bioetanol utilizando el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas.

Pena R.¹, Lu-Chau T.A.¹, Sánchez J.L.², Mielgo I.³, Lema J.M.¹

(1) Dpto. Enx. Química, Escola Técnica Superior de Enxeñaría, Universidade de Santiago de Compostela (2) Bioetanol Galicia S.A., (3) ABOTEC, S.L.

El proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) para la obtención de etanol a partir de cereal consiste en efectuar en un mismo reactor la reacción enzimática (transformación de almidón en glucosa por acción del enzima glucoamilasa) y la microbiana (obtención de etanol a partir de glucosa mediante la levadura *S. cerevisiae*). El objetivo de una buena homogeneización es lograr una adecuada distribución de sustrato, productos, biomasa y enzimas, incrementando de esta manera la velocidad del proceso. Además, en un proceso industrial mantener un nivel adecuado de agitación representa una parte importante de los gastos en energía del proceso. En el proceso SSF una alta agitación incrementa el stress celular de *S. cerevisiae* y por lo tanto disminuye la concentración de biomasa viable en el medio, pero también aumenta la velocidad de reacción de la etapa enzimática.

El objetivo del presente trabajo es determinar la velocidad de agitación óptima en función de la producción de bioetanol utilizando el proceso SSF. Los experimentos se realizaron en un reactor de tanque agitado (Biostat-E de 10L) variando la velocidad del agitador y manteniendo constante el resto de condiciones de operación. Se utilizó como sustrato mosto de cereal pretratado procedente de una planta industrial de producción de bioetanol (Bioetanol Galicia S.A.). En un experimento previo se había observado que a 400 rpm se logra una buena homogeneización del mosto, por lo tanto se tomó esa agitación como valor central del rango experimental (200, 400 y 600 rpm). También se realizó un experimento en el que se operó a dos velocidades de agitación, 400 rpm durante las primeras 24 h, y 100 rpm durante el resto del experimento.

En todos los experimentos la glucosa se consumió totalmente tras 72 h. A 200 rpm se observó una menor acumulación de glucosa tras 24 h debido a que no se logra una buena homogeneización en el reactor, por lo que la etapa enzimática fue más lenta. El mayor rendimiento en etanol se obtuvo a 400 rpm. Sin embargo, el valor obtenido a 100 rpm fue sólo un 6% menor. Por otro lado, el parámetro que se ve más afectado por la agitación fue el crecimiento de la biomasa. A 600 rpm la fuerte agitación provoca que la concentración de biomasa viable en el reactor sea menor que a velocidades más bajas debido probablemente a una reducción de la velocidad de crecimiento o a una mayor muerte celular, y por tanto la velocidad de consumo de glucosa fue menor.

El análisis de los resultados experimentales permiten afirmar que la velocidad de agitación tiene un efecto contrapuesto en las dos etapas del proceso SSF por lo que se propone mantener una agitación alta (400 rpm) durante las primeras 24 horas del proceso para luego reducirla durante el resto de la operación (100 rpm), lográndose así una reducción de los gastos energéticos sin que la producción de etanol se vea afectada.

Reducción del nivel de ploidía en cepas vínicas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el empleo de benomilo

Blasco L, Cachafeiro Pin, J, Feijoo-Siota, L, Veiga-Crespo, P, Villa, T.G.
Dpto Microbiología, Fac. Farmacia, Campus Sur s/n, Universidad de Santiago de Compostela C.P. 15782. lblasco@usc.es

Las cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae* se emplean como pie de cuba en la fermentación del vino. Estas cepas tienen ploidía variable y una baja capacidad de esporulación, lo que hace que las características que confieren al vino varíen de unas fermentaciones a otras. Por ello, es necesario reducir los niveles de ploidía y eliminar las aneuploidías presentes en estas cepas, para lograrlo se desarrolló un método basado en el agente antifúngico benomilo.

Mediante el tratamiento con benomilo de forma consecutiva durante tres meiosis, se consiguió aumentar el número de tétradas en cada meiosis. Sin embargo, la mejor tasa de viabilidad de las esporas se obtuvo a partir de cepas de *S. cerevisiae* tratadas con benomilo de manera independiente en cada meiosis. La selección de ascas con cuatro esporas y la pérdida cromosómica originada por el benomilo, que supuso la pérdida de alelos letales para la viabilidad de las esporas, son los factores que permiten explicar los cambios en la capacidad de esporulación y en la viabilidad antes y después del tratamiento con benomilo.

La frecuencia de aparición de auxotrofías así como el tipo de auxotrofia aumentó en cada una de las meiosis en las cepas tratadas con benomilo de forma consecutiva, lo que indica que la cepa original tenía aneuploidías y la reducción de ploidía originada por efecto del benomilo en cada una de las meiosis.

Cuando se analizaron las características enológicas de los vinos elaborados con las cepas silvestres sometidas a meiosis y las cepas tratadas con benomilo se observó que existían diferencias. Sin embargo, no se observaron diferencias cuando se compararon los resultados obtenidos para la cepa original y las tratadas con benomilo de forma consecutiva. El mantenimiento de las características enológicas de la cepa silvestre en las cepas derivadas de la misma y sometidas al tratamiento con benomilo indica que el benomilo no altera las características del vino.

El benomilo aumenta la capacidad de esporulación, la viabilidad de las esporas, y la producción de tétradas en *Saccharomyces cerevisiae*. También favorece la reducción del número cromosómico, y su efecto se incrementa tras varias meiosis. El tratamiento con benomilo junto con la selección de tétradas elimina mutaciones letales en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* silvestres. El tratamiento con benomilo permite obtener cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con un nivel de ploidía bajo pero con las características enológicas de las cepas vínicas silvestres.

Adherencia de nisina a materiales de uso alimentario

N. P. Guerra, A. Torrado, P. Fajardo, I. Rodríguez, L. Pastrana

Dpto. de Química Analítica y Alimentaria. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo.

Campus As Lagoas s/n, 32004. Ourense. e-mail: nelsonpg@uvigo.es

Los *biofilms* se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Aunque su formación y desarrollo en superficies de equipos de la industria alimentaria puede producir interferencias en la transferencia de calor e incrementar la velocidad de corrosión, su implicación más importante en el sector alimentario es su potencial para la contaminación de los alimentos. Por estas razones, el desarrollo de películas antimicrobianas sobre las superficies de contacto con alimentos podría ser una alternativa para prevenir la formación de *biofilms* en los materiales comúnmente utilizados en la industria alimentaria en equipos y envases. La utilización de bacteriocinas resulta particularmente atractiva, no sólo por constituir una barrera a la adherencia bacteriana, sino porque su posterior liberación en el seno del alimento puede contribuir adicionalmente a la inhibición y el control de la microbiota que podría quedar presente en el alimento tras los tratamientos térmicos.

Por ello, el objetivo de este estudio se centró en el estudio de la adsorción de nisina (bacteriocina de amplio espectro antibacteriano) sobre tres superficies de uso común en la industria alimentaria en equipos de procesamiento (acero inoxidable) y en materiales de envasado (polietilentereftalato (PET) y celofán) de alimentos.

Para cumplimentar este objetivo, primeramente se determinaron las condiciones óptimas de adsorción (pH de adsorción y tiempo de contacto). A partir de estos resultados, se construyeron las isotermas de adsorción de nisina (*Nisaplin*®) a diferentes temperaturas para cada superficie. Para ello se pusieron en contacto las superficies con diferentes concentraciones de la bacteriocina a diferentes temperaturas (8°C, 25°C, 40°C y 60°C) y diferentes concentraciones de adsorbato que oscilaron entre 0,6 y 12 g/L. Finalmente, en las condiciones óptimas de adsorción (temperatura y concentración de adsorbato), se prepararon dos superficies con nisina adherida (superficies activas) y se evaluó su efectividad para inhibir el crecimiento de *Enterococcus hirae* CECT 279 en placa y en dos sistemas alimentarios: leche (PET activo) y carne picada (celofán activo).

La formación de halos de inhibición en placa alrededor de las tres superficies activas demostró su capacidad para liberar al medio la nisina adsorbida e inhibir el crecimiento de *Ent. hirae*. Finalmente, la utilización de las superficies activas de PET y celofán para controlar el crecimiento de la microbiota en leche y en carne, demostró su efectividad al reducir los conteos iniciales de microorganismos aeróbicos totales presentes en ambos sistemas alimentarios.

Identificación y caracterización de levaduras de vinificación autóctonas de la zona de la Ribera del Duero.

E. H. de Laorden, M. Iglesias, G. Rodríguez-Tarduchy¹ y C. Santos

Universidad Francisco de Vitoria. Ctra. M-515, Pozuelo-Majadahonda, Km. 1.800.
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid). e.herrero@ufv.es

¹. Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. CSIC-UAM. Madrid.

La denominación de origen Ribera del Duero incluye algunos de los mejores vinos tintos del mundo debido a sus características diferenciales y a su gran calidad. La mayoría de los estudios enológicos se centran en análisis químicos y sensoriales de los vinos, sin embargo, existen pocos estudios referentes a la microbiota responsable de la fermentación alcohólica de los mostos, aunque es bien aceptado que son las levaduras las que aportan gran cantidad de compuestos responsables del bouquet final del vino. El objetivo de nuestro trabajo es analizar la población levaduriforme autóctona presente en los viñedos y en los mostos de dos bodegas de la Ribera del Duero, Aster y Legaris. Se pretende aislar, identificar y caracterizar bioquímica y genéticamente las levaduras presentes en las muestras de mosto para después estudiar su comportamiento durante la fermentación y el aporte que cada una hace a la complejidad final del vino. La identificación de las levaduras presentes en las muestras se ha hecho mediante secuenciación de la región D1-D2 del rRNA 26S y de este modo se han podido identificar varias especies pertenecientes a los géneros, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Torulaspora* y *Candida*. Las cepas identificadas se han caracterizado morfológica y bioquímicamente respecto a la capacidad de fermentar y asimilar distintos compuestos orgánicos. Actualmente se están desarrollando marcadores moleculares específicos que sirvan para la identificación rápida y eficaz de las cepas aisladas. Estos marcadores se utilizarán en el estudio de la dinámica poblacional de las levaduras durante el proceso de fermentación y facilitarán el análisis posterior de asignación de características organolépticas de los vinos a la presencia o ausencia de cepas de levadura concretas.

Presencia de actividad β -glucosidasa en *Oenococcus oeni* RS1

Alegre, M.T.^a, Rodríguez, M.C.^b, Mesas, J.M.^c

^aDepartamento de Microbiología y Parasitología, ^bDepartamento de Fisiología Vegetal,

^cDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología (Tecnología de Alimentos). Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo. E-mail: mtalegre@lugo.usc.es

El empleo de distintas preparaciones enzimáticas para la mejora de las características organolépticas de los vinos constituye una práctica común en enología. En la actualidad se está dedicando especial atención al estudio de la presencia de actividades glicosidasa en bacterias lácticas (LAB), como *Oenococcus*, *Lactobacillus* o *Pediococcus*, involucradas en la elaboración de vino (Grimaldi et al., 2005 a, b). Estas enzimas presentan gran interés tecnológico por su capacidad de hidrolizar precursores glicoconjugados procedentes de las uvas liberando compuestos aromáticos activos que potencian el aroma de los vinos. El objetivo del presente trabajo ha consistido en detectar la presencia de actividad β -glucosidasa en *O. oeni* RS1 y en analizar, tanto en extractos crudos como en células enteras, la resistencia de esta actividad a las particulares condiciones del vino.

La cepa *Oenococcus oeni* RS1, aislada en nuestro laboratorio a partir de vinos de la D.O. Ribeira Sacra (Mesas et al., 2004), posee una actividad β -glucosidasa cuyos valores de actividad específica son notablemente superiores a los descritos para otras cepas de *O. oeni* (Barbagallo et al., 2004). Esta actividad enzimática parece ser distinta a las previamente descritas para otras cepas de esta misma especie (Spano et al., 2005), a juzgar por los resultados obtenidos en los ensayos de amplificación por PCR del ADN total de *O. oeni* RS1, realizados con oligonucleótidos específicos del gen de la β -glucosidasa de una cepa comercial de *O. oeni*. La actividad β -glucosidasa de *O. oeni* RS1 permanece funcional frente a las condiciones restrictivas del vino (pH, %Vol, concentración de azúcares residuales, etc.), tanto en extractos acelulares como en células enteras, lo que sugiere la posibilidad del empleo de *O. oeni* RS1 como fuente de enzima β -glucosidasa para la elaboración de vinos.

Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R. and Torriani, S. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb. Tech.* 34: 292-296.

Grimaldi, A., Bartowsky, E. and Jiranek, V. (2005 a). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1061-1069.

Grimaldi, A., Bartowsky, E. and Jiranek, V. (2005 b). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 233-244.

Mesas, J.M.; Rodríguez, M.C. and Alegre, M.T. (2004). Plasmid curing of *Oenococcus oeni*. *Plasmid* 51: 37-40.

Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L. and Massa, S. (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.* 98, 855-861.

Obtención de mutantes negativos para la producción de polihidroxicanoatos en la cepa *Pseudomonas* 47T2 para optimizar la producción de ramnolípidos.

Torrego, N.; Manresa, A.; Díaz, P.

Departament Microbiologia i parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona. noeliatorrego@yahoo.es

Departament Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal, 645, 08028 Barcelona

La cepa de *Pseudomonas* 47T2 tiene la capacidad de producir diversos productos lipídicos, entre ellos los polihidroxicanoatos (PHAs) y los ramnolípidos (Rhls), productos de elevado interés biotecnológico por sus propiedades como plásticos biodegradables los primeros [1] y de actividad superficial los segundos [2], entre otras.

Dado que ambos productos comparten intermediarios comunes en sus rutas biosintéticas [3], para la optimización de la producción de ramnolípidos y su posterior caracterización, se pretende redirigir el flujo de carbono hacia la producción de estos. Este objetivo se ha abordado desde un punto de vista genético, a través de la mutación del operón que codifica para la enzima PHA sintasa. Se ha procedido a la obtención de mutantes PHA sintasa a través de la irradiación controlada con luz UV, por transposición y finalmente mediante mutagénesis dirigida.

Si bien no se obtuvieron mutantes negativos para la producción de PHAs mediante irradiación UV y por transposición, sí se obtuvieron posibles mutantes cuando se realizó la mutagénesis dirigida. Los candidatos obtenidos se analizaron en placas suplementadas con rojo Nilo, por microscopía óptica de fluorescencia y por citometría de flujo, procesos que permitieron la selección de cuatro potenciales mutantes cuya producción de PHAs se encontraba aparentemente muy disminuida. Para confirmarlo se procedió a la cuantificación de los PHAs y Rhls producidos por las potenciales cepas mutantes seleccionadas. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias realmente importantes en cuanto a la producción de PHAs entre la cepa parental y los potenciales mutantes seleccionados. Por ello, actualmente se sigue una nueva estrategia de mutagénesis dirigida en la cual se fuerza la recombinación, y la mutación por tanto, mediante el uso del plásmido suicida pEX100Tlink [4].

[1] Luzier, W.D. (1992) Materials derived from biomass/biodegradable materials.. *Proceedings of National Academic Sciences*. 89: 839-842.

[2] Lang, L.; Wullbrandt, D. (1999) Rhamnose lipids-biodynesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32.

[3] Deziel, E.F., Lepine, F., Milot, S. Villemur, R. (2003) *rhIA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* 3(3-hydroxyalkanoic) acids (HAAs) the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149: 2005-2013.

[4] Quéneé, L.; Lamotte, D.; Polack, B. (2005) Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* 38: 63-67.

Capacidad autolítica como criterio de selección de levaduras enológicas

Valero, E.¹; Serrano, A.¹; Arroyo, T.¹ y González, R.²

¹ Departamento de Agroalimentación. IMIDRA. Finca El Encín, Apartado 127. 28800-Alcalá de Henares, Madrid. ² Instituto de Fermentaciones Industriales-CSIC. C/ Juan de la Cierva, 3. 28006-Madrid. E-mail: eva.valero@madrid.org

La elaboración de ciertos tipos de vinos, como vinos espumosos o tintos de crianza, requiere de un periodo de envejecimiento en presencia de las levaduras que han llevado a cabo la fermentación. Es durante este periodo, cuando estos vinos adquieren sus características particulares debidas, en su mayor parte, a la autólisis de las levaduras y la liberación de los productos de la autólisis al vino. La autólisis de la levadura es un proceso extremadamente lento, dicha lentitud puede suponer una limitación a la rentabilidad comercial de estos vinos. Se han propuesto ciertas soluciones para su aceleración que no han tenido resultados exitosos a la hora de la aceptación del producto final. Para evitar estos efectos negativos, más recientemente se ha propuesto la utilización de levaduras autolíticas obtenidas por mutagénesis o por ingeniería genética, sin embargo la utilización de estas últimas hoy en día no es posible a nivel industrial. Ante este problema, el presente trabajo se planteó como objetivo la selección de levaduras autóctonas con elevada capacidad autolítica, utilizando como criterio de selección un ensayo de autólisis en condiciones aceleradas (Martínez-Rodríguez et al., 2001).

Como material de partida para este trabajo se tomó la colección de levaduras autóctonas del IMIDRA aisladas en la D.O. Vinos de Madrid. De entre ellas inicialmente se seleccionaron las 30 cepas de mayor capacidad fermentativa, y posteriormente se adoptaron otros criterios de selección de interés enológico como producción de etanol, producción de acidez volátil y cantidad de azúcares residuales. Tras esta selección nos quedamos con 15 levaduras, las cuales fueron sometidas a un proceso de autólisis acelerada en un medio vínico modelo, sin fuente de carbono ni de nitrógeno y con un 10% v/v de etanol. Las muestras fueron incubadas a 30 °C y analizadas a diferentes tiempos tomando como parámetros indicativos de la autólisis, la pérdida de viabilidad y de peso seco de las levaduras y la cantidad de aminoácidos liberados al medio.

Los resultados obtenidos mostraron que la cantidad de aminoácidos liberados fue diferente en las distintas cepas estudiadas, encontrándose que una de las cepas, CLI 706, liberó al medio una cantidad de aminoácidos del doble que en la mayoría de las otras cepas estudiadas, a partir de las 6 horas en medio de autólisis. Dicha liberación de aminoácidos se correlacionó con una pérdida de viabilidad elevada, no encontrándose variaciones significativas en cuanto a pérdida de peso seco. La proporción de los distintos aminoácidos liberados al medio a las 48 h fue diferente en cada una de las cepas analizadas, generalmente los mayoritarios fueron lisina y treonina, no obstante la cepa CLI 706 fue también la que mostró mayor cantidad de isoleucina, leucina y fenilalanina, que son precursores de determinados ésteres, favorables para la calidad sensorial del vino. Según las características mostradas, la cepa CLI 706 parece una buena candidata para ser seleccionada como levadura de segunda fermentación para la elaboración de vinos espumosos, así como para tintos de crianza que requieren un periodo de envejecimiento sobre lías.

Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Barcenilla, J.M., Pozo-Bayon, M.A., Polo, M.C., 2001. Food Microbiol. 18, 183– 191.

Screening de hongos ligninolíticos para el tratamiento de vinazas procedentes del proceso de producción de bioetanol

Sánchez J.L.¹, Pena R.², Lu-Chau T.A.², Lema J.M.² y Mielgo I.³

(1) Bioetanol Galicia S.A., jsanchez@bioetanolgalicia.abengoa.com; (2) Dpto. Enx. Química, Escola Técnica Superior de Enxeñaría, Universidade de Santiago de Compostela; (3) ABOTEC S.L.

Las corrientes residuales del proceso de producción de bioetanol a partir de cereales (vinazas) suelen destinarse principalmente a la producción de residuos sólidos de destilería (DDGS), el cual es utilizado como complemento en dietas animales para incrementar su valor proteico. La calidad del DDGS depende tanto del origen de las materias primas como del proceso utilizado en la producción de bioetanol. Sin embargo, una característica común es su elevado contenido en fibras y lignina. Una reducción en el contenido de lignina y fibras, permitiría obtener un producto de mayor valor alimentario. En este trabajo se plantea el uso de hongos ligninolíticos para el pretratamiento de las vinazas con el fin de incrementar el contenido proteico mediante la reducción del contenido de fibras y lignina.

Como un primer paso en la utilización de estos hongos se realizó la selección del hongo ligninolítico de un total de nueve cepas de hongos de putrefacción blanca procedentes de la colección de hongos del Dpto. de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela. Los hongos evaluados fueron los siguientes: *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, *Lentinus tigrinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Polyporus ciliatus* y *Stereum hirsutum*. Se llevaron a cabo cultivos estáticos utilizando como sustrato tanto vinaza como el producto final (DDGS). Durante las fermentaciones se determinaron la velocidad de crecimiento, la producción de enzimas ligninolíticos y la disminución del contenido de sólidos totales del medio de cultivo.

Se observó que tanto la vinaza como el DDGS pueden ser utilizados como medio de cultivo de hongos ligninolíticos ya que poseen los sustratos y micronutrientes necesarios para mantener el crecimiento y activar su sistema ligninolítico. De las nueve cepas de hongos ligninolíticos evaluados durante cultivos estáticos, se observó crecimiento en ocho de ellas y se detectó actividad ligninolítica en cinco. Los hongos que presentaron los niveles mas altos de actividad ligninolítica fueron *P. ciliatus* y *S. hirsutum* (2300 y 1500 U/L, respectivamente), aunque el tiempo tanto de colonización como el que emplean en alcanzar esta actividad máxima es muy largo. Por otro lado, los hongos que crecieron más rápidamente fueron *P. sordida* y *P. chrysosporium*. Sin embargo, la actividad manganeso peroxidasa encontrada en sus cultivos fue prácticamente cero. *L. tigrinus* fue el hongo que obtuvo buenos resultados tanto en velocidad de crecimiento como en producción enzimática. En base a los resultados obtenidos utilizando DDGS y vinazas como sustrato se decidió seleccionar a *L. tigrinus* para posteriores experimentos en los que se evaluará la calidad del DDGS obtenido tras el tratamiento con hongos ligninolíticos.

Empleo de técnicas moleculares para la identificación, selección y control de la micobiota presente en la fermentación alcohólica y la crianza biológica en vinos finos y manzanilla

Cantoral, J.M., Espinazo-Romeu, M.L., Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M.*, Pérez, E.,

Laboratorio de Microbiología y Genética. CASEM. Universidad de Cádiz. * Bodegas Barbadillo, S.L. jesusmanuel.cantoral@uca.es

A lo largo de estos últimos años, nuestros trabajos de investigación han estado orientados a la caracterización y selección de cepas de levaduras, generalmente del género *Saccharomyces*, implicadas en la producción del vino joven, así como la caracterización de la micobiota presente en el sistema de envejecimiento de la Manzanilla, estudiando la influencia de la temperatura y ubicación de las botas en el desarrollo de dicha micobiota. Estos productos se incluyen en la D. de Vinos de la Tierra de Cádiz en el caso del vino joven y en la D.O. Jerez, Xères, Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda en el caso de los vinos de Crianza Biológica.

Estos estudios se han visto influenciados, por la tendencia del sector vitivinícola en España y especialmente en la D.O. Jerez, Xères, Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda, a una renovación basada en la modernización de los procesos de producción para hacerlos más viables económicamente (disminución del tiempo de crianza y menor consumo de alcohol) y la obtención de productos finales más adecuados a la tendencias de los nuevos consumidores (menor graduación alcohólica, mayor contenido en aromas). Todas estas características están directamente relacionadas con las levaduras responsables del proceso de producción y por lo tanto éstas constituyen la principal variable sobre la que actuar. Para ello, es imprescindible un exhaustivo conocimiento de la relación existente entre las propiedades de las levaduras y la aportación de cada una de ellas a las características del producto final.

Para abordar este estudio, hemos empleado técnicas de Biología Molecular, como Electroforesis de Campo Pulsante (CHEF), que nos permite obtener el cariotipo electroforetico de cada cepa de levadura, RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) de ADN mitocondrial obteniéndose un patrón de bandas características de una especie o incluso de una determinada cepa industrial. El polimorfismo encontrado al aplicar RFLP de ADN mitocondrial a diferentes cepas industriales, hace que junto con la Electroforesis en Campo Pulsante, sean las dos técnicas más aplicadas en Microbiología Industrial en la actualidad. La utilización de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), nos llevará a poder identificar las distintas especies de levaduras presentes en la fermentación alcohólica, así como la comparación entre distintas cepas de levaduras pertenecientes al sistema de criadera y solera del envejecimiento biológico del vino Fino y de la Manzanilla.

De esta forma, los objetivos de nuestro trabajo son: a) Caracterizar de forma inequívoca las diferentes cepas de levadura de “velo de flor” implicadas en la elaboración de la Manzanilla, así como la micobiota presente en un sistema de fermentación industrial. b) Determinación de un método de control rápido de fermentación inoculada, relacionando la presencia de un determinado tipo de cepa con las propiedades organolépticas del vino resultante. c) Estudio de la influencia que determinados parámetros externos tienen sobre el desarrollo de este tipo de levaduras.

Desarrollo y caracterización de un *starter* para la fabricación de queso artesanal

Castro, J.M.^{1,2}, Tornadijo, M.E.^{2,3}, Fresno, J.M.^{2,3}, Sacristán, N.³ y Sandoval, M.H.^{2,3}

¹Dpto. de de Ecología Genética y Microbiología. ²Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL). ³Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. 24071- León. E-mail: degjcg@unileon.es

Se han desarrollado *starters* de utilidad en la fabricación de queso artesanal previa caracterización de cepas seleccionadas por su aptitud tecnológica aisladas a partir de queso de Armada. Se ha ensayado la capacidad de producción de bacteriocinas así como la susceptibilidad a diversos antimicrobianos. Un tercio de las cepas ensayadas mostraron capacidad bacteriocinogénica frente a alguno de los microorganismos de referencia ensayados si bien, solamente una de cada siete mostraron actividad frente a alguna de las demás cepas de bacterias lácticas objeto de estudio. El nivel de resistencia a diversos grupos de antimicrobianos mostró ser sorprendentemente alto (> 50%) debido a causas de naturaleza intrínseca o bien por la presencia de elementos transmisibles. Estudios de *fingerprinting* plasmídico evidenciaron la presencia de plásmidos en 14 cepas (55% de las ensayadas), en número de 1 (3 cepas), 2 (2 cepas), 3 (1 cepa), 4 (4 cepas) o >4 (4 cepas), de conformación circular y de tamaño comprendido entre 2.1 y >16 Kb.

La secuenciación directa de fragmentos obtenidos mediante PCR correspondientes a regiones informativas del ADNr 16S confirmó la identificación fenotípica previa de las cepas a nivel de especie en tres de cada cuatro casos. Por otro lado la aplicación de la técnica RAPD permitió obtener *fingerprintings* específicos para las cepas y su discriminación a nivel inter e intraespecífico.

Las cepas finalmente seleccionadas que formaron parte de las mezclas de iniciadores se escogieron por sus características tecnológicas a partir de una treintena de cepas de bacterias lácticas inicialmente seleccionadas como candidatas procedentes a su vez de cientos de cepas aisladas de queso artesanal elaborado con leche cruda de cabra sin adición de iniciadores. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TAUL 1292 se seleccionó por sus capacidades acidificantes y proteolíticas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* TAUL 12 se incluyó también por su elevada actividad dipeptidasa y su capacidad para producir compuestos que contribuyen al aroma. *Enterococcus raffinosus* TAUL 1351 fue incluido por su alta capacidad carboxipeptidasa y esterolítica. Finalmente, las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (TAUL 1795) y especialmente *Lactobacillus plantarum* (TAUL 1736) se incluyeron por su capacidad aminopeptidasa y β -galactosidasa. Varias de estas combinaciones han sido objeto de patente.

Estudio financiado parcialmente por Proyectos Junta de Castilla y León ((LE010A06) y MCYT (AGL2001-0092-CO1 y CO2).

Producción de isómeros del ácido linoleico conjugado a partir de ácido linoleico mediante *Lactobacillus plantarum* CECT 749

Cristina García, Josune Ayo y Félix Amárta

AZTI - Tecnia / Unidad de Investigación Alimentaria, Txatxarramendi Ugarte z/g
48395 Sukarrieta (Bizkaia) Tel:946029400-Fax:946870006. e-mail:
cgarcia@suk.azti.es

Introducción y objetivos: El término ácido linoleico conjugado (CLA) designa una mezcla de isómeros del ácido linoleico que presentan sus dobles enlaces en posición conjugada. Recientes estudios han evidenciado el interés de algunos de estos isómeros. De entre ellos, las configuraciones 9-*cis*,11-*trans* y 10-*trans*,12-*cis* 18:2 muestran un efecto en la reducción de la grasa corporal. El objetivo de este trabajo es comprobar si *Lactobacillus plantarum* CECT 749 isomeriza el ácido linoleico convirtiéndolo en sus isómeros conjugados. Para ello se ha estudiado la presencia de tres isómeros: 9-*cis*,11-*trans* 18:2 (CLA1), 9-*trans*,11-*trans* 18:2 (CLA2) y 10-*trans*,12-*cis* 18:2 (CLA3).

Procedimiento: El microorganismo se obtuvo de acuerdo al protocolo de Kishino y col. (2002). Las células se incubaron en presencia de ácido linoleico a 30 °C durante 8, 24 y 48h. Posteriormente los ácidos grasos fueron extraídos según el método descrito por Bligh & Dyer (1959), identificados y cuantificados mediante GC-MS y GC-FID.

Resultados: Se produjeron dos isómeros: CLA1 y CLA2, sin embargo no se detectó la presencia de CLA3. La producción máxima de ambos ocurrió a las 8 h, y se obtuvieron 297 y 250 µg de CLA1 y CLA2 respectivamente a partir de 62,28 mg de linoleico. Del total de CLA producido, un 54,3 % correspondió a CLA1 y un 45,7 % a CLA2. Con el tiempo los isómeros producidos fueron disminuyendo progresivamente. A las 24 h, el CLA1 disminuyó un 42,4 %, reduciéndose hasta el 64,7 % a las 48 h, mientras que el CLA2 se redujo un 45,6 % a las 24 h, alcanzando un 50 % a las 48 h.

Discusión: La transformación microbiológica del ácido linoleico en sus conjugados por parte de la cepa CECT 749 es selectiva hacia la producción de CLA1 y CLA2. Sin embargo esta bacteria no produjo CLA3. Kishino y col. (2002) observaron el mismo comportamiento. Los rendimientos de producción obtenidos para los dos isómeros fueron bajos, por lo que se plantea estudiar procesos para mejorarlos. Además estos isómeros disminuyen con el tiempo, posiblemente por su inestabilidad. Asimismo el ratio CLA1/CLA2 se podría variar modificando las condiciones de reacción para producir mayor cantidad del isómero de interés: CLA1.

Conclusiones: Se ha probado la utilidad de *Lactobacillus plantarum* CECT 749 en la producción de 9-*cis*,11-*trans* 18:2. Estas funciones conducirán a nuevos usos de estas bacterias con el fin de producir ácidos grasos potencialmente funcionales.

Bibliografía

Kishino et al. (2002) J. Am. Oil Chem. Soc., 79 (2), 159-163.
Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). Can. J. Bioch. Phys., 37, 911-917.

Aislamiento y clonación del gen de la β -(1,3)-glucanasa de *Bacillus circulans* WL13 en *Escherichia coli*.

Cachafeiro Pin, J., Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Poza, M., Villa, T.G.

Dpto. Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidade de Santiago de

Compostela. CP.15782. Santiago de Compostela. cachafeiropin@yahoo.es

El aumento de la incidencia de infecciones fúngicas graves, y potencialmente mortales en pacientes inmunocomprometidos, ha generado la necesidad de ampliar el arsenal terapéutico disponible con nuevos fármacos más seguros y eficaces. La infección fúngica de mayor prevalencia en humanos es la producida por *Candida albicans*.

Bacillus circulans WL13 ha sido estudiada por su capacidad para producir la lisis de paredes celulares de hongos y levaduras. Uno de los enzimas extracelulares hidrolíticos producidos por la cepa WL13 ha sido caracterizado como una endo- β -(1,3)-glucanasa [(E.C.3.2.1.39)] y es secretada al medio únicamente cuando la bacteria crece en presencia de paredes celulares de levaduras.

La estructura de las paredes celulares de hongos y levaduras es compleja y la presencia de glucano con una proporción de enlaces β -(1,3) es significativa. El enzima β -(1,3)-glucanasa actúa sobre los enlaces β -1,3 de los glucanos que forman parte de las paredes celulares de levaduras y hongos, dificultando su desarrollo.

Independientemente de otras aplicaciones industriales que estos enzimas presentan y, a pesar de su potencialidad en el tratamiento de las infecciones fúngicas, hasta la fecha no se ha estudiado su formulación en preparados farmacéuticos para el tratamiento de infecciones fúngicas en humanos. Su estudio se ha basado fundamentalmente en su efecto sobre hongos patógenos de plantas.

Dada la complejidad y el coste de preparación del medio con paredes celulares de levaduras se propone la obtención de cepas de *Escherichia coli* recombinantes que contengan el gen de la β -(1,3)-glucanasa de *B. circulans* WL13 para el posterior análisis de su actividad antifúngica frente a cultivos de *C. albicans*.

Las secuencias nucleotídicas de las endo- β -1,3-glucanasas de *Bacillus circulans* WL12 (cepa con menor actividad lítica que la WL13) están descritas y depositadas en las bases de datos. Teniendo en cuenta estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos que permitieron obtener mediante técnicas de PCR un fragmento de DNA que tras su secuenciación resultó tener una elevada similitud (98%) con el gen homólogo de *Bacillus circulans* WL12.

El análisis de la secuencia de nucleótidos puso de manifiesto una pauta de lectura abierta de 2048 pb, que codifica un polipéptido de 2316 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 190,302 KDalton y un punto isoelectrónico teórico de 4,91 calculados ambos con el programa ProtParam (Bjellqvist *et al.* 1993; Bjellqvist *et al.* 1994). Esta secuencia de DNA se insertó en el vector PCR Blunt II TOPO (Invitrogen) empleando el Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen). La construcción obtenida se analizó y se empleó para transformar células de *E. coli* TOP10. Las colonias recombinantes se seleccionaron en placas de LB con kanamicina y se analizaron con el fin de confirmar la presencia de inserto.

***Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins exhibiting the eight-cysteine-containing CFEM domain, exhibit altered biofilm formation.**

Pérez, A., and Martínez, J.P.

Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Farmacia, Universitat de València/Estudi General (UEVG). Avda. Vicente Andrés Estellés, s/n. 46100-Burjasot, Valencia, España (Spain). ana.maria.perez-sanchez@uv.es.

Cloning and further characterization of a *C. albicans* gene, *PGA10* (standard name; also designated as *RBT51* [1]), coding for a putative protein species containing an eight cysteine domain referred as CFEM (common in several fungal extracellular membrane proteins) is described. CFEM-containing proteins could function as cell-surface receptors or signal transducers, or as adhesion molecules in host-pathogen interactions (2). The nucleotide sequence of this gene was initially submitted to DBBJ/EMBL/GenBank by our group under the accession number AF307520, being defined then as a gene coding for a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) protein. We have found that the protein coded by this gene also exhibit some features reminiscent of a class II-type hydrophobin; for this reason, we have proposed in some forums the acronym *HPB1* to name this gene (3). Hydrophobins appear to be of ubiquitous occurrence among filamentous fungi belonging to the ascomycetes and the basidiomycetes and are among the most surface active biomolecules known, being involved in cell adhesion and interaction with the environment (4). Deletion of *PGA10/HPB1* gene resulted in a cascade of pleiotropic effects, mostly affecting cell surface related properties. In this context, the null *pga101Δ* mutant formed very fragile biofilms that appeared partially split and weakly attached to the substratum. The biofilm-forming ability of several *C. albicans* mutants with single, double and triple deletions of genes encoding other protein species also containing the CFEM domain (*RBT5*, and *WAP1/CSA1*) was determined. Strains bearing mutations in these genes also exhibited an abnormal ability to form biofilms. Consequently, fungal proteins containing the CFEM domain (Pga10p/Hpb1p, Rbt5p, and Wap1p/Csa1p) may play a key role in the formation, development and/or maintenance of the biofilm structure in *C. albicans*. Disruption of the above mentioned genes did not significantly affect virulence as assessed in a murine model of experimentally induced candidiasis. Analysis by Light Cycler RT-PCR revealed that *PGA10* gene was overexpressed in mycelial cells when compared to yeast. In this context, in order to perform a quantitative analysis of expression of Pga10p by fluorescence microscopy, the insertion of the *PGA10* promoter region into pGFP is currently under construction. A preliminary proteomic analysis revealed the presence of Pga10p/Hpb1p in the extracellular polymeric material of biofilms, as well as a number of proteins that may be involved in the maintenance of biofilm integrity and functionality and could be regarded as a potential targets for the development of strategies for the prevention and/or treatment of candidiasis.

(1) Weissman, Z. and Kornitzer, D. (2004). *Mol. Microbiol.* **53**, 1209-1220.

(2) Kulkarni, R.d., Kelkar, H.S. And Dean, R.A.(2003) *Trends Biochem. Sci.* **28**, 118-121.

(3) Pérez, A., M. Casanova, A. Murgui, J.L. López-Ribot, and J.P. Martinez. A family of hydrophobin-like molecules in *Candida albicans* with a role in biofilm formation. FEBS Advanced Lecture Course. Human fungal pathogens: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions and virulence, La Colle sur Loup, France, 2005).

(4) Wösten, H. A. (2001) *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 625-46.

Supported by grants BFU2005-02572, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, and ACOMP06/103, Generalitat Valenciana, Valencia, Spain.

Evidence of carotenoid biosynthesis control in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by oxidative metabolism

Pilar Calo-Mata¹, Margarita Poza², Carlos Echavarri-Erasun³, Tomás G. Villa², Jorge Barros-Velázquez¹ and E.A. Johnson³

¹Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, LHICA, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, E-27002 Lugo, Spain;

²College of Biotechnology, Institute of Aquaculture, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago, Spain; ³Department of Food Microbiology & Toxicology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, U.S.A.

e-mail: jbarros@lugo.usc.es

The carotenoid astaxanthin provides the natural color to salmonids and crustaceans. The yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* produces astaxanthin as a secondary metabolite. The astaxanthin biosynthetic pathway involves several demethylation and oxidation reactions. Very little is known about the enzymes involved in the carotenoid biosynthesis in *X. dendrorhous*. Cytochrome P450 enzymes mediate a variety of chemical reactions in animals, plants and microorganisms including hydroxylation and demethylation of exogenous and endogenous compounds. The metabolism of benzantracene (BA) and benzo(a)pyrene (BP) is mediated by the cytochrome P450 enzymatic system. BA and BP are rapidly uptaken by the cell and metabolized to water-soluble non-fluorescent derivatives. The aim of this study was to evaluate the involvement of cytochrome P450s in astaxanthin biosynthesis in the basidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anamorph *Phaffia rhodozyma*). Evidence from biochemical and physiological analyses supported the role of cytochrome P450 in the biosynthesis of astaxanthin. Differential spectroscopy of yeast microsomes in reducing conditions and in the presence of carbon monoxide confirmed the presence of cytochrome P450s in all *X. dendrorhous* strains tested. The subcellular location of cytochrome P450s was examined by incubating cells *in vivo* with the P450-specific reagent phenoxazone. Cytochrome P450s reacted with phenoxazone producing the highly fluorescent dye resofurin, which accumulated in lipid globules. The intracellular location of the resofurin was compared to the location of carotenoids by fluorescence microscopy in a wild-type strain and an astaxanthin hyperproducer of *X. dendrorhous*. The locations of resofurin and fluorescent regions showed matching patterns suggesting similar locations of P450(s) and carotenoids. Additionally, it was demonstrated that astaxanthin accumulation decreased when *X. dendrorhous* cells were exposed to P450 inhibitors such as carbon monoxide (CO), metyrapone and piperonyl butoxide (PB). These findings support the involvement of cytochrome P450 enzymes in astaxanthin biosynthesis.

Oxidación avanzada de colorantes textiles por microorganismos ligninolíticos

Moya, R., García-Martín, A.B, Pérez-Leblic, M.I., Troyano, N, Arias, M.E y Guillén, F.

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Alcalá, N-II, Km. 33,6, 28871 Alcalá de Henares, Madrid. E-mail: raquelsurina@hotmail.com

A finales de la década de los ochenta se introdujo por primera vez el término “procesos de oxidación avanzada” (POA) para agrupar un conjunto de tecnologías fisicoquímicas de degradación de contaminantes, basadas en la producción de radicales muy reactivos, principalmente radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estos radicales son producidos en concentraciones elevadas y pueden llegar incluso a mineralizar toda la materia orgánica presente en aguas contaminadas bajo condiciones suaves de presión y temperatura. Atendiendo al fundamento de estos procesos y a la extensa variedad de contaminantes que pueden ser degradados, las únicas estrategias de biorremediación comparables son las que implican a microorganismos ligninolíticos. En efecto, la capacidad de estos microorganismos para degradar contaminantes tan dispares como hidrocarburos aromáticos policíclicos, clorofenoles, dioxinas, bifenilos policlorados, colorantes textiles, etc., se basa en la baja especificidad de sustrato de las enzimas ligninolíticas y, sobre todo, en la producción de radicales muy reactivos derivados de la oxidación por dichas enzimas de algunos metabolitos fúngicos y productos de degradación de la lignina, denominados mediadores. Además, los microorganismos ligninolíticos producen en el medio extracelular los principales radicales generados en los POA, si bien su contribución a la degradación de contaminantes no ha sido bien evaluada, debido a la carencia de un conocimiento preciso de sus mecanismos de producción.

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha demostrado un mecanismo de producción extracelular de radicales $\cdot\text{OH}$ en el hongo y la bacteria ligninolíticos *Pleurotus eryngii* y *Streptomyces cyaneus*, basado en ciclos redox de quinonas derivadas de la lignina, que se establecen por la acción conjunta de deshidrogenasas intracelulares y las enzimas ligninolíticas. La producción de radicales $\cdot\text{OH}$ mediante este mecanismo solo requiere la incubación de los microorganismos con una quinona y Fe^{3+} convenientemente quelado, y puede ser cuantitativamente controlada variando las condiciones de incubación: pH, tipo de quinona y quelante del Fe^{3+} , presencia de Mn^{2+} y concentración de reactivos. Sentada esta base, hemos emprendido estudios encaminados a demostrar que la producción extracelular de radicales $\cdot\text{OH}$ por ambos microorganismos puede, por un lado, incrementar la eficacia de degradación de contaminantes cuya oxidación por el sistema ligninolítico ha sido comprobada previamente, y por otro, ampliar enormemente el rango de compuestos susceptibles de degradación, como si de un POA se tratara. En la presente comunicación presentamos los resultados obtenidos en ensayos de degradación de ocho colorantes textiles de tipo azo por *P. eryngii* y *S. cyaneus*, incubados bajo condiciones de producción de diferentes niveles de radicales $\cdot\text{OH}$. La inducción de la producción extracelular de dichos radicales en ambos microorganismos, realizada con 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona y el complejo Fe^{3+} -oxalato, incrementó notablemente o posibilitó, según el caso, la decoloración de todos los compuestos ensayados. Además, la velocidad de degradación de los colorantes guardó una relación directa con los niveles de radicales $\cdot\text{OH}$ generados, los cuales fueron modulados con Mn^{2+} (*P. eryngii*) o variando el pH de la incubación (*S. cyaneus*). Por último, cabe destacar que, en general bastaron pocas horas para que la tasa de decoloración de los compuestos (50 μM) alcanzara el 50%.

Desarrollo de modelos mecanísticos de digestores anaerobios UASB pulsantes

A. Franco Uría, E. Roca Bordello, E. Fernández Carrasco, J.M. Lema Rodicio

Departamento de Ingeniería Química, ETSE, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España. E-mail: afranco@usc.es

Los nuevos avances en la digestión anaerobia han hecho de esta tecnología una buena alternativa a los tratamientos convencionales de aguas residuales industriales, ya que su aplicación a una gran variedad de efluentes ha resultado tener numerosas ventajas. Por otro lado, la aplicación de sistemas pulsantes ha permitido mejorar la transferencia de materia y eliminación de metabolitos gaseosos que son dos de los principales inconvenientes de las tecnologías de digestión anaerobia (Filtros anaerobios, UASB...) y causan la reducción de su eficacia.

En este trabajo, se estudió el efecto de la aplicación de flujo pulsante sobre equipos de tratamiento anaerobio de aguas residuales de alta carga. El objetivo fundamental fue establecer los mecanismos y parámetros que más influencia tienen sobre el comportamiento de los reactores, mediante modelización de los datos experimentales obtenidos en el proceso de tratamiento. El establecimiento de modelos mecanísticos se aplicó a tres reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Bed) inoculados con biomasa granular, dos de ellos operados con pulsación (P1 y P2) y el tercero sin pulsación (NP) a efectos de comparación. Se utilizó como lenguaje de programación Matlab para la implementación de los modelos, basados en balances de materia. Para definir los balances se tuvieron en cuenta el comportamiento hidráulico y el mecanismo limitante de la velocidad de reacción aparente (transferencia de masa o velocidad de reacción biológica).

Los resultados obtenidos del ajuste de los datos experimentales por el modelo desarrollado para reactores UASB muestran que el mecanismo limitante en los reactores pulsantes es la transferencia de materia, mientras que en el reactor NP, varía según el periodo de operación. Así, en la última fase, el modelo que mejor ajusta los datos, es el que considera el mecanismo de la velocidad de reacción biológica, principalmente debido a una acusada disminución de la Actividad Metanogénica Específica (AME) debido a un incremento de carga que provocó la acumulación de productos intermedios. Los valores del coeficiente de transferencia de materia medio (K) calculados a partir del modelo son mayores para los reactores pulsados (20 y 150% para P2 y P1, respectivamente), lo que justifica razonablemente la hipótesis de que el flujo pulsante mejora la transferencia de materia.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SEDAN (PGIDIT04-TAM265006PR) Xunta de Galicia.

Modelización de un Filtro Anaerobio pulsante para el tratamiento de aguas residuales

A. Franco Uría, E. Roca Bordello, E. Fernández Carrasco, J.M. Lema Rodicio

Departamento de Ingeniería Química, ETSE, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España. E-mail: afranco@usc.es

Los reactores UAF han sido ampliamente utilizados en los años 70 y 80 para el tratamiento anaerobio de aguas residuales, porque permitían alcanzar elevadas VCO y retener altas cantidades de biomasa en su interior. El poco éxito de este reactor en la actualidad reside principalmente en la formación de caminos preferenciales y en la retención de metabolitos gaseosos, con la consiguiente disminución en el volumen útil. Sin embargo, mediante la aplicación de sistemas pulsantes se puede mejorar la transferencia de materia, y por tanto, la eficacia de este tipo de digestores.

En este trabajo, se estudió el efecto de la aplicación de flujo pulsante sobre filtros anaerobios de lecho ascendente para el tratamiento biológico de aguas residuales de alta carga. El objetivo fundamental fue desarrollar un modelo mecanístico para describir el comportamiento de este tipo de reactores. El modelo propuesto debe permitir identificar los mecanismos y parámetros clave que intervienen en la operación de este tipo de reactores, así como su relación con los problemas que puedan surgir durante la misma. El establecimiento de modelos mecanísticos se aplicó a dos reactores UAF (Upflow Anaerobic Filter) operados con (P) y sin pulsación (NP). El reactor pulsado P se operó sin recirculación, por lo que sólo se pulsó la alimentación. Se utilizó como lenguaje de programación Matlab para la implementación de los modelos, basados en balances de materia. Los balances se basaron en dos factores: el comportamiento hidráulico del reactor, obtenido experimentalmente mediante la determinación de curvas DTR (Distribución de Tiempos de Residencia) y el mecanismo limitante de la velocidad de reacción aparente. Este último puede ser o bien la transferencia de masa entre fases líquido-sólido (biomasa) o la velocidad de reacción biológica, que está relacionada con la actividad de la biomasa presente en el reactor.

Los reactores UAF tienen un comportamiento diferente a los reactores de lechos de lodos convencionales, ya que contienen un relleno que actúa como sistema de retención para la biomasa que hace que su comportamiento hidráulico sea también diferente. En este caso, la transferencia de materia resultó ser el mecanismo limitante para ambos reactores. Los resultados obtenidos muestran un mayor K medio para el reactor NP, con un ajuste adecuado durante la primera fase de la operación (bajas velocidades de carga). Sin embargo, en la última etapa, los valores estimados por el modelo se alejan considerablemente de los experimentales, debido a una gran acumulación de biogás que originó una disminución importante en el área de transporte (y por lo tanto, de K). En el reactor P, el ajuste de los datos experimentales por el modelo propuesto fue bueno, probando que las suposiciones asumidas para el planteamiento del modelo fueron adecuadas. Así, a pesar de que el valor teórico estimado de K fue mayor para el reactor NP, la correcta desgasificación del lecho originada por la pulsación permitió aplicar velocidades de carga mayores en el reactor pulsante.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SEDAN (PGIDIT04-TAM265006PR) Xunta de Galicia.

Aerobic granules for the integrated wastewater treatment

M. Figueroa, J.R. Vázquez-Padín, B. Arrojo, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral and R. Méndez

Dept. of Chemical Engineering. School of Engineering. Lope Gómez de Marzoa s/n. University of Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela. E-mail: mncfig@usc.es

The aerobic granular sludge technology is based on a one-reactor system operated as a sequencing batch reactor (SBR); meaning that phases of feeding, reaction, settling and effluent withdrawal take place in a single reactor. In these systems the biomass self-aggregates forming granules in aerobic conditions. These units require smaller footprints, reach larger biomass concentrations and handle larger volumetric loads than conventional activated sludge plants. All these aspects produce economical benefits and increase the research interest on the aerobic granular systems.

Furthermore inside the aerobic granules different biological processes can take place simultaneously. Due the diffusional limitations of the dissolved oxygen inside the granules its presence is restricted to their most external layers, and depending on their size, an inner anoxic or anaerobic core exists. The possible processes occurring in the granules are distributed as follows: organic matter oxidation and nitrification simultaneously occur in the outermost layers where oxygen concentration is high. In the internal layers, where the oxygen is not available, the anoxic processes, like denitrification and Anammox process, occur. The aim of the work is the development of aerobic granular sludge to accomplish the treatment of specific type of wastewater.

Experiments were performed in two SBR reactors, R1 and R2, with a volume of 1.5 L each. Two operational cycles A (feeding: 3 min; aeration: 171 min; settling: 1 min and effluent withdrawal: 5 min) and B (idle: 3 min; feeding + aeration: 171 min; settling: 2 min and effluent withdrawal: 4 min) were used.

Aerobic granules with an average diameter of 3.5 mm and density of 15 g VSS/(L_{granules}) were easily obtained in R1 where organic matter and nitrogen loads treated were of 1-7 g COD/(L·d) and 0.1-0.7 g NH₄⁺-N/(L·d) reaching removal efficiencies of 70 and 80 %, respectively [1].

Autotrophic aerobic granules were obtained in R2 by treating a synthetic medium with a nitrogen load rate of 0.8 g NH₄⁺-N/(L·d) obtaining nitrification efficiencies of 90% [2]. The average diameter was 3.3 mm and density of 78 g VSS/(L_{granules}). In these aerobic granules, the ammonia oxidizing bacteria were located in the external layers, checked by the microbiological FISH technique, where the oxygen was present.

In conclusion, the type of populations and their distribution inside the aerobic granules can be modified and adapted to the influent characteristics and operational conditions, achieving the performance of different desired biological processes in a single reactor. In this way an integrated wastewater treatment can be achieved.

Acknowledgements: This work was funded by the Spanish Government (Biogramem project CTQ2005-04935/PPQ) and Xunta de Galicia (Grafan project PGIDIT04TAM265008PR).

References

- [1] Arrojo B., Mosquera-Corral A., Garrido J.M. and Méndez R. (2004). Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Research*, **38**, 3389 – 3399.
- [2] Mosquera-Corral A., Vázquez-Padín J.R., Arrojo B., Campos J.L. and Méndez R. (2005). Nitrifying granular sludge in a sequencing batch reactor. In: *Aerobic Granular Sludge*. Water and Environmental Management Series. IWA Publishing. Munich, 63-7

Combination of partial nitrification and Anammox processes for the post-treatment of effluents from a fish cannery

I. Fernández, A. Dapena-Mora, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral and R. Méndez

Dept. of Chemical Engineering. School of Engineering. Lope Gómez de Marzoa s/n. University of Santiago de Compostela, E-15782. Spain. (Email: ifernand@usc.es)

The partial nitrification-Anammox system has been proved to be a cheaper alternative compared to the conventional nitrification-denitrification system to treat wastewaters with low C/N ratio. In the partial nitrification process the ammonium is 50% nitrified to nitrite. The generated effluent is then suitable to be fed to the Anammox reactor where ammonium and nitrite are combined under anoxic conditions to generate nitrogen gas.

In Spain the anaerobic digestion is widely used to treat effluents generated in fish canneries reaching removal percentages around 70-90% for COD, but leading to the release of large levels of ammonium (up to 5 g/L) due to protein degradation, producing effluents with low C/N ratios and in many cases with large salts (NaCl) content. The objectives of this work were to determine the effects of high salinity conditions on both processes, the partial nitrification-Anammox, and to study their stability and efficiency treating fish canning effluents.

The partial nitrification according to the SHARON process was carried out in a continuous stirred tank reactor of 3.2 L [1]. A sequencing batch reactor (SBR) with a working volume of 3 L was used to carry out the Anammox process. In order to test the effect of NaCl on the partial nitrification, the SHARON reactor was fed with a media containing 4.7 g (NH₄)₂SO₄/L, 6.5 g NaHCO₃/L and 0-30 g NaCl/L while the media supplied to the Anammox reactor contained 0.7 g (NH₄)₂SO₄/L, 0.74 g NaNO₂/L, 0.42 g NaNO₃/L and 0-20 g NaCl/L. The effluent of the anaerobic digester of a fish canning supplied to the system contained 0.7-1.0 g NH₄⁺-N/L, 0.1-0.25 g TOC/L and salinity up to 10-12 g NaCl/L.

Results obtained during the operation with synthetic media showed that partial nitrification and Anammox processes can be operated under stable conditions up to concentrations around 25 and 18 g NaCl/L, respectively. When the partial nitrification reactor was fed with the industrial effluent, its efficiency was reduced from 50% to 30-40% after less than 10 days of operation. This loss of efficiency can be attributed to the presence of organic matter at concentrations up to 250 mg TOC/L. By adjusting the operational pH to 7.5, the conversion percentage increased up to 70%. The effluent of this unit was fed to the Anammox reactor, which reached an averaged nitrogen removal efficiency of 68%, mainly limited by the non stoichiometric relation between the ammonium and nitrite present in the feeding. Only in the period when NO₂⁻-N was present in excess in the feeding the process destabilized, due to inhibition caused by nitrite accumulation.

It can be stated that the partial nitrification-Anammox system can be applied for the treatment of fish canning wastewaters containing large nitrogen loads and salt concentrations if an appropriate control of the NO₂⁻-N/NH₄⁺-N ratio of the effluent of the partial nitrification reactor is performed.

Acknowledgements This work was funded by the Spanish Government (Biogramem project CTQ2005-04935/PPQ) and Xunta de Galicia (Grafan project PGIDIT04TAM265008PR).

References

[1] Mosquera-Corral A, Gonzalez F, Campos JL and Mendez R (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem*, 40 (9), 3109-3118.

Eliminación de naftaleno en aguas marinas contaminadas por vertidos de petróleo mediante células inmovilizadas de *Pseudomonas stutzeri*

Feijoo-Siota, L. ; Blasco, L ; Cachafeiro Pin, J.; de Miguel, T; Villa, T.G.
Dpto Microbiología .Fac. Farmacia-Campus Sur s/n. Universidad de Santiago de
Compostela. Santiago de Compostela. C.P.15782. luciafs@usc.es

El naftaleno es un hidrocarburo aromático de toxicidad elevada y efectos carcinogénicos (Preuss et al.,2003), por lo que es muy importante que no entre en la cadena trófica de los peces y del hombre. Entre los diversos hidrocarburos contenidos en el fuel vertido en las costas gallegas tras el hundimiento del buque Prestige se encuentra el naftaleno. A pesar de que su solubilidad en agua es reducida, no puede excluirse la posibilidad de que el agua marina pueda contener cantidades mínimas de dicho hidrocarburo y, por tanto, llegue a los peces y mariscos que se extraen de las costas y a los cultivos de acuicultura, acumulándose en sus tejidos y pasando al hombre tras su consumo.

Pseudomonas es un género caracterizado por una gran versatilidad metabólica y su capacidad para utilizar como fuente de carbono una amplia variedad de productos tóxicos, entre los cuales se encuentran los hidrocarburos aromáticos (Atlas, 1981). El objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de degradación del naftaleno en agua de mar mediante células libres e inmovilizadas por atrapamiento en esferas de alginato de la cepa *Pseudomonas stutzeri* 19SMN4 bajo diferentes condiciones de cultivo y el estudio de las condiciones óptimas de almacenamiento de las células inmovilizadas.

Los resultados de este estudio demuestran que:

- la bacteria degrada eficientemente el naftaleno en agua de mar
- la capacidad degradativa se mantiene tras la inmovilización celular por atrapamiento en esferas de alginato
- las células libres presentan una velocidad de degradación mayor que las células inmovilizadas debido probablemente a los límites difusionales determinados por el alginato.
- la temperatura es un parámetro fundamental en el proceso de degradación. La velocidad de degradación del hidrocarburo es mayor en las muestras con células inmovilizadas crecidas a 30°C con respecto a las crecidas a una temperatura de 10°C.
- la temperatura óptima de almacenamiento de las células inmovilizadas en alginato es de 4°C conservándose en estas condiciones su viabilidad durante al menos un mes.

Atlas, R.M. (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiol. Rev. 45, 180-209.

Preuss R. , Angerer J. and Drexler H. (2003) Naphthalene—an environmental and occupational toxicant. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 76(8),556-76.

Arseniato reductasas de *Corynebacterium glutamicum*: su papel en la resistencia a arsénico.

Ordóñez E, Letek M, Fiuza M, Ramos A, Villadangos A F, Gil J A y Mateos L M.

Área de Microbiología, Fac. CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León, León, España. E-mail: degeoa@unileon.es

Corynebacterium glutamicum es una bacteria Gram-positiva, con alta resistencia a arsénico, asociada a dos operones de destoxificación (*arsI* and *ars2*) que presentan la organización básica de tres genes *arsRBC* (regulador-permeasa-reductasa). El operón *arsI* posee una arseniato reductasa adicional (*arsC1'*). En las bacterias, el arsenito (AsIII), la forma reducida del arsénico, se elimina del citoplasma celular a través de una permeasa de arsenito (ArsB), un canal que depende de la fuerza quimiosmótica para llevar a cabo la expulsión del metaloide de la célula. El arseniato (AsV), la forma oxidada, antes de ser expulsado se debe reducir previamente a arsenito, ya que las células no tienen permeasas específicas para AsV. Las enzimas que catalizan este proceso son las arseniato reductasas (ArsC), y son indispensables en los mecanismos de defensa de la célula frente al arsénico.

Se han descrito al menos tres diferentes familias de arseniato reductasas. La primera y segunda familias representadas respectivamente por la ArsC del plásmido R773 de *Escherichia coli* y la arseniato reductasa eucariótica de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque no están relacionadas, ambas reciben el poder reductor del glutatión. En la tercera familia, representada por la arseniato reductasa del plásmido pI258 de *Staphylococcus aureus*, es la tiorredoxina la que actúa como donador de electrones.

En este trabajo ponemos de manifiesto el papel de las reductasas de arseniato de *C. glutamicum* en la resistencia a arseniato. Los análisis basados en las búsquedas por homología y los alineamientos realizados con estas proteínas revelan tres tipos diferentes de reductasas en este microorganismo. ArsC4 (que se encuentra aislada en el cromosoma) y ArsC1' pertenecen a las familias de las reductasas de arseniato de *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. En cambio, ArsC1 y ArsC2 son diferentes a las reductasas descritas hasta la fecha. Mediante análisis de interrupción y complementación (tanto homóloga como heteróloga) hemos puesto de manifiesto que únicamente estas dos proteínas (ArsC1 y ArsC2) son funcionales y responsables de los niveles de resistencia a arseniato que se alcanzan en *C. glutamicum*.

Simulación de procesos biológicos aerobios y anaerobios para el tratamiento de aguas mediante el simulador AQUASIM

E. Fernández Carrasco, C. García Diéguez, E. Roca Bordello, J.M. Lema Rodicio

Departamento de Ingeniería Química, ETSE, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España. E-mail: eugeniof@lugo.usc.es

Los programas de simulación pueden convertir al ordenador en un microlaboratorio artificial, facilitando al usuario la posibilidad de manipular los datos y/o elementos que intervienen en un proceso y que modifican el resultado del mismo. Dentro de este tipo de programas, el simulador AQUASIM permite emplear modelos determinísticos para ejecutar simulaciones de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

La mayor parte de los modelos matemáticos de este tipo de plantas de tratamiento existentes, se limitan a la predicción de los procesos una vez alcanzado el estado estacionario. Sin embargo, los procesos anaerobios y, en menor medida, los aerobios son muy dinámicos, por ejemplo en la puesta en marcha de los reactores, la operación normal de estos, su mantenimiento diario o en momentos de transición, etc. En consecuencia, un modelo matemático que sólo represente el estado estacionario no es útil para interpretar, por ejemplo, un sistema que se está desequilibrando. Por estas razones, diversos grupos de trabajo de la International Water Association (IWA) han elaborado modelos completos y exhaustivos tanto del proceso de fangos activos, que es el proceso aerobio más utilizado, modelo denominado "Activated Sludge Model N° 1" (ASM1), como para la digestión anaerobia, modelo denominado "Anaerobic Digestion Model N° 1" (ADM1), siendo ambos modelos buenos puntos de partida para la formulación de modelos más específicos.

En el trabajo aquí presentado se implementan, utilizando el simulador AQUASIM, ambos modelos. En concreto, el modelo ASM1 se aplica al diseño de una planta típica de fangos activos, mientras que el modelo ADM1 se utiliza para predecir el destino y transformación de los distintos compuestos en el arranque de un digestor anaerobio.

El digestor anaerobio utilizado es un reactor híbrido UASB-UAF, a escala planta piloto, que se modelizó como un reactor continuo de tanque agitado ideal (RCTA) en AQUASIM, ya que su comportamiento hidrodinámico se ajusta bastante bien a este. Tiene un anillo de distribución de la alimentación en la parte inferior y cuatro tomas de muestra distribuidas a distintas alturas. Su volumen útil es de aproximadamente 1,1 m³ y posee geometría cilíndrica. La zona UASB está ubicada en la parte inferior del reactor y representa un 75% del volumen total. Inmediatamente sobre esta zona se encuentra el filtro anaerobio cuyo volumen útil es un 25 % del total. La alimentación utilizada es un efluente sintético compuesto por vino blanco diluido. De esta forma se simula un efluente de una bodega o de procesos de embotellado y lavado de botellas de vino.

Como conclusión de este trabajo se puede afirmar que el simulador AQUASIM resulta una herramienta extremadamente útil y sencilla a la hora de modelizar sistemas aerobios, anaerobios o una combinación de ambos utilizando, para ello, los modelos ASM1 y ADM1 elaborados por la IWA y que, en general, reproducen de un modo más adecuado lo que sucede en los procesos anteriormente mencionados.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto SEDAN (PGIDIT04TAM265006PR) Xunta de Galicia.

Selección de variables para la identificación de sobrecargas orgánicas en reactores anaerobios

Molina, F.^{a,b}, Carneiro, D.^a, García, C.^a, Roca, E.^a, Lema, J.M.^a

^a Universidad Santiago de Compostela, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n 15782 Santiago de Compostela, España ; ^b Universidad de Antioquia, Facultad de Ingeniería, A. A. 1226, Medellín- Colombia. fmolina@usc.es

La operación en condiciones de estabilidad es uno de los objetivos fundamentales en la depuración biológica de aguas residuales; esta condición es básica en el proceso de digestión anaerobia, donde participan un complejo e interdependiente conjunto de microorganismos, logrando un proceso estable se garantiza la conversión a metano de la materia orgánica y la baja o nula acumulación de productos intermedios como son los ácidos grasos volátiles. Por estas razones, la identificación de sobrecargas orgánicas, es fundamental en el control y operación de reactores biológicos anaerobios.

En este trabajo se presenta la selección de las variables más adecuadas para identificar sobrecargas depurando aguas residuales tipo hidratos de carbono. La investigación se realizó en un reactor híbrido anaerobio USBF (UASB+Filtro Anaerobio) de 1.1 m³, dotado de instrumentación on-line avanzada que permite evaluar tanto la línea de agua de entrada como la línea de agua de salida (analizador de TOC, analizador de AGVs, Caudalímetros, pHmetros y sondas de temperatura) así como la línea de biogás (Caudalímetro, analizador de composición del biogás y analizador de hidrógeno). Como sustrato se utilizó dextrina (6 a 8 glucosas), se realizaron perturbaciones tipo pulso y escalón, incrementando la Velocidad de Carga Orgánica (kg DQO/m³.d) para los pulsos en 8 veces y para los escalones en 1.5 veces. Las variables on-line estudiadas para la línea de biogás son: caudal de Biogás, caudal de Metano, contenido de Metano (%), concentración de Monóxido de carbono (CO) y concentración de Hidrógeno (H₂); para línea de agua efluente se estudiaron las variables: pH, Carbono Orgánico Disuelto y ácidos grasos volátiles (AGVs). La selección de variables se realizó evaluando los siguientes parámetros: i) tiempo de retardo a partir del inicio de la perturbación (h), ii) nivel de excitación, calculado como la variación de la señal respecto a su valor inicial, (Valor final-Valor Inicial)/Valor final (adimensional); y iii) pendiente normalizada de la señal de respuesta, pendiente/Valor inicial (h⁻¹). El nivel de excitación y la pendiente normalizada expresan respectivamente la sensibilidad y la velocidad de respuesta de cada variable estudiada. La adquisición de datos on-line se realizó cada 15 minutos, este período es determinante, ninguna de las variables estudiadas presentó un tiempo de retardo mayor, por lo tanto no se utilizó este parámetro en la selección de las variables.

Los resultados obtenidos indican que las mejores variables para detectar sobrecargas orgánicas con sus respectivos valores para nivel de excitación y pendiente normalizada (entre paréntesis) son, para la perturbación tipo pulso: concentración de CO (8.99, 3.10 h⁻¹), concentración de H₂ (4.60, 1.74 h⁻¹) y concentración de AGV (41.66, 6.48 h⁻¹); y para la perturbación tipo escalón: concentración de H₂ (2.16, 0.70 h⁻¹). De acuerdo con lo anterior, en digestores anaerobios que depuran aguas residuales tipo hidratos de carbono la monitorización de las concentraciones de H₂ en el biogás y los AGV en el efluente líquido, permitiría la detección temprana de sobrecargas orgánicas y dichas variables podrían utilizarse en el control automático del proceso.

Agradecimientos: Proyecto ANACOM (CTQ2004-07811-C02-01), financiado por el Ministerio de Educación (CICYT), cofinanciación FEDER incluida.

Tratamento biológico da água de produção de petróleo por haloarqueas

Maricy Raquel Lindenbah Bonfá, Francine Piubeli & Lucia Regina Durrant

Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP – Rua Monteiro Lobato, 80 CEP 13083-862, Campinas-SP Brasil – maricy@fea.unicamp.br

A água residuária da atividade de extração de petróleo é altamente salina e contém uma mistura complexa de hidrocarbonetos, muitos dos quais são altamente tóxicos. Nestes locais podem ser encontrados microrganismos halofílicos, como as haloarqueas, estando estes inclusive relacionados com a degradação destes poluentes. Desse modo, onze linhagens de haloarqueas, com potencial de degradação de compostos aromáticos, isoladas de quatro diferentes ambientes salinos (Salar de Uyni, Bolívia; Cabo Rojo, Porto Rico; Mar Morto, Israel e Jordânia; Arábia Saudita), foram testadas quanto à capacidade de reduzir a Demanda Química de Oxigênio (DQO) de amostras de água produzida na extração de petróleo, adquiridas na Petrobrás de São Sebastião-SP (Brasil). As linhagens foram inoculadas diretamente em 100 mL de água de produção de petróleo estéril ou não estéril e mantidas por sete dias, a 38,0°C e a 150 rpm. Após esse tempo foram coletadas amostras para a análise da diminuição da carga orgânica do efluente. Uma linhagem isolada no Green Lake (Arábia Saudita) foi responsável pela maior redução da DQO da água de produção (87,4% em sete dias). Até o momento, poucos estudos foram realizados utilizando-se linhagens de haloarqueas no tratamento de efluentes salinos. Woolard & Irvine (1995) estudaram a capacidade de haloarqueas e halobactérias em degradarem efluentes sintetizados em laboratório com salinidade e componentes semelhantes aos da água de produção como fenol. Após a tentativa de isolar microrganismos em salinidades altas verificaram que somente halobactérias e haloarqueas foram capazes de crescer em meios com salinidade semelhante ao da água de produção e, além disso, de degradarem o fenol.

Bioremediation of hydrocarbons by two microbial consortia in sand microcosms

Sara Cuadros Orellana; Lorna Falcão Félix; Murilo Porto Brandão; Otávio Augusto Santos; Suiane Andrade Lima; Álvaro Silva Lima
Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju – SE, Brazil, Phone: + 55 79 32182190, E-mail: sara_cuadros@yahoo.com

The addition of nutrients (fertilization) to stimulate biodegradation rates is a main technique for the *in situ* bioremediation of hydrocarbon-contaminated sites. However, the addition of exogenous microorganisms (bioaugmentation) to improve bioremediation has also been shown to be potentially efficient in some cases. Bioaugmentation can be especially useful to treat extremely sensitive ecosystems for which rapid and efficient decontamination is a necessity, and environments devoid of an indigenous competent biodegrading population of microorganisms, for which remediation treatments based exclusively on fertilization are useless. In this study we evaluated the efficiency of fertilization alone, and fertilization combined with bioaugmentation, in the bioremediation of hydrocarbon-contaminated sand. Two bacterial enrichment cultures capable of actively metabolizing petroleum hydrocarbons were obtained from contaminated coastal areas, individual strains were purified, and the best hydrocarbon-degraders were selected on the basis of growth rate, biomass formation and emulsifier activity when diesel oil was the sole carbon source for growth. Seven strains from Carmópolis (consortium CA) and six strains from Sergipe Harbour (consortium HA) were chosen for use in microcosm studies. The microcosms were designed according to EPA protocols. The matrix used was beach sand, pH 7.2, whose humidity was kept constant at 50% of its water holding capacity. The microcosms were prepared in glass flasks containing 300 g sand each. Diesel oil was added as a model hydrocarbon mixture to a final concentration of 20 mL.kg⁻¹, and nutrients were added as a solution of nitrogen (urea) and phosphorous (KH₂PO₄), to a final proportion of 100:5:1 C:N:P. A control microcosm (CT) received only the nutrient solution, while microcosms CA and HA were inoculated with microorganisms (consortia CA and HA, respectively) together with the addition of nutrients. The microcosms were stored in the dark at 37° C and the degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) was monitored using GC/FID. Our results demonstrate that, two weeks after the beginning of the treatment, bioaugmentation with any of the two consortia was 36% more efficient in the removal of TPHs than fertilization alone. Also, TPH removal at the end of the 90-day incubation period was between 8.5 and 11% higher for bioaugmented microcosms, as compared to CT. After 2 weeks, the n-alkane fraction was more efficiently degraded in microcosm HA (91%), followed by microcosms CA and CT, which had similar degradation efficiencies (78%). The biodegradation of the unresolved complex mixture (UCM) was higher in CA (25%) as compared to HA (18%) and CT (8%). These results demonstrate that bioaugmentation can improve bioremediation rates in diesel oil-contaminated sand, and thus represents a promising technology for the bioremediation of coastal areas. Consortium H was the most efficient in this study, and we believe it could be useful for *in situ* bioremediation of hydrocarbon-contaminated beaches in northeast Brazil, with the advantage of being composed exclusively of autochthonous microorganisms. This work was supported by CNPq and FAP-SE.

Molecular analyses of *Pseudomonas stutzeri* identified in a MGP-contaminated soil enriched for a long period with complex PAHs

Í. S. Silva^{1,2}, L. R. Durrant¹, S. J. Pepper² and M. L. Britz²

¹State University of Campinas - UNICAMP, Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, R. Monteiro Lobato, 80. Caixa Postal 6121, Cidade Universitária, cep:13083-682. Campinas, SP. Brazil.²The University of Melbourne, Faculty of Land and Food Resources, Department of Agriculture and Food Systems, Gilbert Chandler Intitute, Sneydes Road, Werribee, VIC3030. Melbourne, Australia. Email: isis@fea.unicamp.br

Soil collected from a manufactured-gas-plant (MGP) site in Port Melbourne, VIC, Australia, contaminated with petroleum hydrocarbons and PAHs, was previously studied regarding the potential of the microflora to degrade PAHs as sole carbon and energy sources. This soil has been stored since in bins at 4°C in the dark for several years. In this present work, several cycles of enrichment were performed over a period of six months in a basal salt medium (BSM) supplemented with a mixture of seven PAHs. Bacteria surviving in enrichments were isolated periodically on nutrient agar and BSM plus pyrene (100mg.l⁻¹). Some macro- and micro-scopic differences were observed between colonies isolated from early stages of enrichment, but after enrichment for six months, two morphologically different colonies were predominant on plates. PCR amplification and subsequent sequencing of 16S rRNA genes showed that these colonies (beige smooth and white filamentous) were genetically similar to *Pseudomonas stutzeri* (98% of similarity). It is hypothesized that these isolates represent genetic variants of the same species. The presence of other non-cultivable species from this soil when cultured in BSM with complex PAHs was confirmed using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of PCR products generated using bacterial general primers with a GC-clamp, and after six months of successive enrichments only *P. stutzeri* bands were seen in the gels. Furthermore, when using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) to compare these strains, it was clear that more than one biotype of *P. stutzeri* was present. The presence of catabolic genes responsible for PAH degradation, the alpha subunit gene of initial PAH-dioxygenases (*nahA*) and catechol-dioxygenases (C12O and C23O), were not detected in the original soil without enrichment in PAHs; nonetheless, the presence of these genes was found only in colonies of *P. stutzeri* isolated on agar plates from the same soil after enrichment in PAHs. A fungal isolate identified as a *Penicillium* species was also isolated from the original (non-enriched) Bin#4 soil. Serial enrichments in pyrene and benzo[a]pyrene were also performed to evaluate the capability of this fungal isolate to grow on PAHs as sole carbon source. The enrichment of soil microbiota has an important role in obtaining microorganisms that may be catabolically active in the bioaugmentation of polluted soil. *P. stutzeri*, which was the only species to survive after several months of enrichment in PAHs, and the *Penicillium* sp that resided in the same soil, are possibly organisms with potential for bioaugmentation in bioremediation processes.

We acknowledge CAPES for PhD scholarship concession and UNIMELB for financial support.

Efecto del ion sulfato sobre la toxicidad del cadmio en la microalga *C. moewusii*.

Suárez, C.; Torres, E.; Pérez-Rama, M.; Abalde, J.; Herrero, C.

Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Alejandro de la Sota nº 1. 15008. A Coruña.

e-mail: crisbiolog@yahoo.es

El cadmio (Cd) es un metal que ejerce efecto tóxico sobre las microalgas, afectando a su crecimiento de manera significativa. En los últimos años se ha producido un considerable aumento de dicho metal en ambientes acuáticos debido a su creciente presencia en las aguas residuales. Como consecuencia de esto, las microalgas han desarrollado diversos mecanismos de tolerancia, entre los que se encuentra la producción de compuestos tiólicos (fitoquelatinas), para lo cual es necesaria la reducción asimilatoria del azufre, que aporte los grupos tiol a partir del sulfato (SO_4^{2-}).

Considerando que el crecimiento es un buen indicador de toxicidad, para estudiar las posibles variaciones del efecto tóxico del Cd, en función de la presencia de diferentes concentraciones de SO_4^{2-} en el medio, es interesante observar la variación del crecimiento de las microalgas bajo estas condiciones.

El objetivo de este ensayo es observar el efecto del aumento progresivo de la concentración de SO_4^{2-} en el medio sobre el crecimiento de la microalga *Chlamydomonas moewusii*, cuando es expuesta a distintas concentraciones de Cd. Para ello se realizaron ensayos en los que se sometió a la microalga a diferentes concentraciones de Cd, las mismas en cada ensayo, e incluyendo como variable entre dichos ensayos, el incremento de la concentración de SO_4^{2-} en 4, 8 y 16 veces con respecto al valor estándar (control) presente en el medio de cultivo adecuado para esta microalga, que en este caso fue el Bristol. Las concentraciones de Cd ensayadas en las cuatro experiencias fueron 0.25, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 $\text{mg Cd} \cdot \text{l}^{-1}$.

Después de 96 horas de crecimiento, se compararon las curvas de crecimiento de los cultivos expuestos a las distintas concentraciones de Cd, de las cuatro experiencias con diferentes concentraciones de SO_4^{2-} , observando como resultado la ausencia de una influencia significativa de éste en el efecto tóxico que el metal ejerce sobre el crecimiento de esta microalga. Además, se calcularon los valores de EC50 (concentración de Cd que reduce en un 50% el crecimiento microalgal con respecto al control) de cada ensayo, obteniéndose valores sin diferencias significativas, lo que también indicó la ausencia de un efecto del SO_4^{2-} sobre la toxicidad del cadmio.

Toxicidad y retirada de cadmio por la microalga marina *Dunaliella salina*

Folgar, S.; Torres, E.; Cid, A. y Abalde, J.

Departamento de Biología Celular y Molecular, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Alejandro de la Sota nº1. 15008. A Coruña. email: sfolgar@udc.es

El cadmio es uno de los contaminantes metálicos más importantes para los organismos acuáticos. La creciente utilización de este metal en procesos industriales y su aumento en la concentración en aguas residuales derivadas de dichos procesos ha supuesto un sustancial aumento de su concentración en ambientes acuáticos. Esto supone la necesidad de desarrollar técnicas de retirada de este metal del medio ambiente. Actualmente se están desarrollando métodos basados en las capacidades de ciertos materiales naturales de origen biológico de acumular metales. Por este motivo, la acumulación de metales por diversos organismos (bacterias, algas y hongos) ha sido objeto de numerosos estudios.

Uno de los índices de toxicidad más ampliamente utilizados es el crecimiento. En este trabajo se ha estudiado los efectos que ejercen diferentes concentraciones de Cd (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 y 120 mg Cd l⁻¹) sobre el crecimiento de la microalga marina *Dunaliella salina*. Se observa que una concentración de 5 mg Cd l⁻¹ tiene un claro efecto en el crecimiento de la microalga a las 96 h de exposición. Después de 48 h de exposición al metal, los cultivos expuestos a las mayores concentraciones de Cd (100 y 120 mg Cd l⁻¹) presentan una inhibición en el crecimiento. A partir de los datos obtenidos de densidad celular se calculó la EC50 (concentración de Cd que reduce en un 50% el crecimiento microalgal con respecto al control) con un valor de 65 ± 0.03 mg Cd l⁻¹ después de 96 horas de exposición al metal. Este elevado valor pone de manifiesto algún posible mecanismo de protección en *D. salina* contra la toxicidad del Cd.

El cadmio extraído por esta microalga fue proporcional a la concentración de éste en el medio y dependiente del tiempo de exposición; en los cultivos con mayor concentración de cadmio la cantidad de metal retirado por célula fue mayor. En los cultivos expuestos a 5 mg Cd l⁻¹, las células de *D. salina* retiraron el 11.3% del total del Cd añadido con 1.93x10⁻¹⁰ µg Cd cél⁻¹, mientras que en los cultivos a los que se añadió 120 mg Cd l⁻¹ sólo el 2.9% fue retirado con 6.61x10⁻⁹ µg Cd cél⁻¹. A pesar de esto, después de 96 horas de cultivo, la mayor proporción de Cd estaba presente en el medio extracelular, siendo muy pequeña la cantidad de Cd retirado por las células de *D. salina*.

El elevado valor de la EC50 unido a los bajos niveles de cadmio retirado que presenta esta microalga, hace pensar en la presencia de algún mecanismo que limite la entrada del metal en la célula impidiendo así su acumulación y su posible retirada del medio.

Análisis de señales de hiperglicosilación en una proteína heteróloga expresada en *Saccharomyces cerevisiae*.

Gutiérrez, F., de la Rosa, J.M., Ruiz T., Rodríguez, L.

Departamento de Microbiología y Biología Celular, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna. Avenida Astrofísico Francisco Sánchez, s/n, 38205 La Laguna, Tenerife.

E-mail: fgunico@ull.es

La glicosilación covalente es una modificación especialmente frecuente en aquellas proteínas que siguen la ruta secretora, o son incorporadas a membranas, de los organismos eucariotas y resulta crucial para un correcto plegamiento de las mismas. De los diversos tipos de glicosilación descritos, la *N*-glicosilación es el que ha recibido una mayor atención, no sólo porque se trata del más frecuente sino, también, porque las etapas iniciales de este proceso son comunes en humanos y levaduras y, por tanto, están altamente conservadas en la evolución.

En *Saccharomyces cerevisiae* una pequeña fracción de los *N*-oligosacáridos unidos a proteínas sufren, en el aparato de Golgi, la adición de unos pocos (8-14) residuos de manosa, mientras que el resto experimentan un proceso de hiperglicosilación por el que adquieren una cadena oligosacárida externa formada por un número de unidades de manosa generalmente superior a 50. Hasta el momento, es relativamente poco lo que se conoce sobre las características estructurales que sirven como señales para que algunas proteínas expresadas en esta levadura se hiperglicosilen y otras no lo hagan, ni las que hacen que, dentro de una misma proteína, en algunos oligosacáridos se produzca la elongación de su cadena externa mientras que en otros esto no ocurra. Este hecho condiciona enormemente el empleo de *S. cerevisiae* como sistema para la producción de glicoproteínas recombinantes. Sin embargo, otras especies de levaduras, entre las cuales se cuentan varios miembros del género *Pichia*, no hiperglicosilan, o lo hacen con baja frecuencia, las proteínas que en ellas se expresan.

En este trabajo hemos utilizado, como modelo de estudio de las mencionadas señales de hiperglicosilación, la invertasa de *Pichia anomala* (Inv1p), una glicoproteína que, tanto cuando es producida por esta especie como cuando se expresa de manera heteróloga por *S. cerevisiae*, presenta siempre oligosacáridos constituidos por un número reducido de residuos de manosa. Mediante el empleo de mutagénesis dirigida hemos modificado la secuencia interna de uno de los secunones (secuencias del tipo Asn-Xaa-Ser/Thr, a las que se unen oligosacáridos por enlaces *N*-glicosídicos a través de la Asn), introduciendo variaciones en la posición correspondiente al aminoácido Xaa del secuón, así como en su entorno inmediato. Se ha generado, así, una batería de plásmidos portadores de genes que dan lugar a proteínas mutantes, algunas de las cuales contienen un oligosacárido cuyo número de residuos de manosa es similar a los de las proteínas hiperglicosiladas. Los resultados obtenidos muestran una gran correlación entre el nivel de elongación de la cadena oligosacárida y la naturaleza del aminoácido que ocupa la posición intermedia en el secuón, en consonancia con lo que ha sido descrito previamente para otra glicoproteína (la exoglucanasa extracelular) de *S. cerevisiae* (Conde *et al.*, 2004, J. Biol. Chem., 279:43789-43798).

(Financiado parcialmente por los proyectos BIO2003-09180-C02-01, del MEC, y PI042005/035, de la DGUI del Gobierno de Canarias)

The use of blood peptone (PEP®) obtained from enzymatic hydrolysis of porcine hemoglobine as ingredient in culture growth medium in some industrial fermentation models

J. Ródenas¹, A. Casablanco², G. González-Anadón², O. Fernández², R. Español², C. Rodríguez¹, N. Saborido¹ and J. Polo¹

¹APC EUROPE, Avda. San Julián 246-258. Pol. Ind. El Congost. E-08403. Granollers. Spain. ²Planta Piloto Fermentación. Dep. Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Barcelona. E-08193. Bellaterra. Spain. Corresp. author: jesus.rodenas@ampc-europe.com

The objective was to evaluate the effect on growth for different microorganism (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *B. thuringiensis* spp *kurstaki*, *P. pastori* and *S. erythraea*) in medium containing blood peptone (PEP®, APC EUROPE, S.A.) confronted with medium containing commercial peptones. In addition, for the last three microorganisms listed, we studied the performance of blood peptone on product formation too (production of insecticide spores, lipase and erythromycin respectively).

Media composition. For each strain a different culture medium were defined that incorporate peptone, mainly as a nitrogen source. In every case the reference medium, according with the recommendations for each microorganism, contains a commercial peptone (LP0037, OXOID) that, for the objective of the present study, was replaced with the globin peptone to constitute the tested medium.

Results: Growth comparison. To compare blood and commercial peptone performance, the increase in average final maximum biomass reached is calculated as percentage referred to the commercial peptone value. The results indicated that blood peptone offers, generally speaking, at least the same biomass productivity that bacteriological peptone, if not a better one. It is worth mentioning that the best results were obtained with *Bacillus* strains (28.7% and 17.4% higher dry weight (DW) for *B. subtilis* and *B. thuringiensis* respectively), followed by *E. coli*. (5.0% improvement in DW) So, blood peptone could have positive effects in bacterial fermentation processes. For yeasts cells differences in biomass yield were not significant (4.6% improvement for *S. cerevisiae*). For *P. Pastori* and *S. erythraea* there was not difference in growth between the blood and commercial peptone (0.3% and -1.2% in DW respectively). In these cases it can be said that blood peptone offers the same results than bacteriological peptone.

Product comparison. To compare blood and commercial peptone performance, the increase in average final maximum product concentration reached were calculated as percentage referred to the commercial peptone value. The results indicated that the production of insecticide spores of *B. thuringiensis* was increased by 15.2% with the inclusion of blood peptone in the culture medium. Similar increased productivity was observed for lipase production (12.3% improvement) in the fermentation with *P. pastoris*. The erythromycin production from *S. erythraea* was reduced by 8.6% with the inclusion of blood peptone replacing commercial peptone. In this case, it must be taken into account that analytical method used for product analysis shows variability in the range of the increase percentage observed, so it is not a significant difference.

Conclusions: From these results, it can be concluded that blood peptone can be a suitable alternative to other commercial peptones for industrial fermentation.

Aislamiento de *thiobacillus ferroxidans* de una muestra de agua industrial

de la Fuente, A., Rodríguez, M., Guiu, N., Arosemena, L., Adelantado, C., Shiva, C., y Calvo, MA.

Departamento de Sanidad y Anatomía Animales. Facultad de Veterinaria. (Universidad Autónoma de Barcelona). Campus Universitari Bellaterra 08193 Bellaterra (Barcelona).

aroadela Fuente@gmail.com

La presencia de bacterias capaces de degradar sustratos metálicos determina un potencial peligro, por lo que su control adquiere notable importancia cuando el sustrato degradado forma parte de las conducciones de agua destinada al consumo.

A partir de muestras de agua con un contenido filamentosos y lechoso y que presentaban un alta concentración en azufre se procedió a la siembra de alícuotas de la misma en Agar Czapek Dox. Las alícuotas inoculadas se incubaron a diferentes temperaturas: 25°C, 28°C, 30°C, 37°C, y 42°C por espacio de 24-48 horas y en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Transcurrido el período de incubación indicado y tras la observación de las placas, se evidenció crecimiento de colonias transparentes en todas las placas a excepción de la incubada a 42°C, que no presenta crecimiento. Las placas incubadas a 37°C (tanto en condiciones aeróbicas como en anaerobiosis) presentan un crecimiento óptimo. A partir de las colonias desarrolladas se procedió a la obtención de un cultivo axénico.

Tras tinción de Gram del cultivo, se observa que las bacterias aisladas son Bacilos Gram negativos, no esporulados y muy pleomórficos, con presencia de cápsula, que por haber sido aisladas en un medio de cultivo rico en azufre y por ser la temperatura óptima de crecimiento inferior a 42°C son compatibles con *Thiobacillus ferroxidans*.

Estudio microbiológico elSanek®: un tejido antimicrobiano de utilización en clínica.

César Escribano, Lidia Ruiz, Teresa Vinuesa, Miguel Viñas

Depto. de Patología y Terapéutica Experimental. Facultades de Medicina y Odontología. IDIBELL. Universidad de Barcelona.

Uno de los objetivos preferentes de la industria Nacional Textil es el desarrollo de productos textiles con propiedades particulares que justifiquen su utilización en segmentos o actividades que confieran a sus productos un alto valor añadido. Este objetivo presenta dos vertientes complementarias: por una parte el diseño de nuevos productos, dado que la investigación desarrollada al generar y controlar los mismos y la creación de conocimientos en este sector son la única arma viable para hacer frente a la competencia que la industria textil tiene en países en los que los costes de producción son mucho menores; por otra los nuevos productos vienen a cubrir necesidades del mercado en este caso la prevención de la infección cruzada.

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana del producto elSanek® mediante la determinación de los índices bactericida y bacteriostático comparados con tejidos convencionales de polipropileno y de algodón. Para ello se procede al recuento de la población bacteriana utilizada para inocular las muestras (1,5 cm²) de tejido. Tras el contacto entre el tejido y la suspensión bacteriana durante 1, 6 y 12 horas se procede al recuento de bacterias viables en la muestra de tejido. Los valores se expresan como sigue:

Valor de la prueba ($V_c = \text{Log } N_{24} - \text{Log } N_0$): se considera que la prueba es válida cuando es mayor de 1,5; El parámetro índice bacteriostático se define como la diferencia entre los logaritmos de la población superviviente en la tela control (sin agentes antimicrobianos) y la problema (elSanek®) ($I_c = \text{Log } N_{c24} - \text{Log } N_{p24}$) y, finalmente el índice bactericida definido como la diferencia de logaritmos entre los tiempos 0 y 24 ($\text{Log } N_{24} - \text{Log } N_0$).

Se ha determinado la inocuidad del tejido mediante experimentos de susceptibilidad dérmica en conejo, y se han desarrollado diversos experimentos de campo para determinar la idoneidad del uso de elSanek® en clínica.

Los resultados obtenidos pueden resumirse como sigue: el índice bactericida de elSanek® frente a *Staphylococcus aureus* fue de 3.2 mientras que el índice bacteriostático frente a la misma especie microbiana fue de 7.5. Por lo que respecta a los valores determinados frente a *Klebsiella pneumoniae* los índices bactericida y bacteriostático fueron respectivamente de -0.6 y 3.17. No se apreciaron reacciones adversas dérmicas al contacto continuado con elSanek®. Finalmente en los experimentos de mantenimiento de la actividad tras sucesivos lavados, tras tratamiento del producto a distintas temperaturas o tras esterilización muestran que la actividad bactericida decrece, no así la actividad bacteriostática que se mantiene sin alteraciones dignas de mención a lo largo del proceso.

Los resultados microbiológicos junto a las pruebas de campo realizadas con piezas fabricadas con elSanek® muestran claramente el interés en la utilización clínica de este tejido y otros que puedan derivar de procesos industriales similares.

Producción simultánea de ácido láctico y xilitol a partir de podas de sarmiento

Sandra Rivas, Beatriz Rivas, Ana Torrado, Ana Belén Moldes, José Manuel Domínguez

Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo (Campus Ourense), As Lagoas s/n, 32004 Ourense, ESPAÑA
sandrarivas@uvigo.es

La viticultura es un subsector de gran importancia en numerosos países y que genera grandes cantidades de residuos de carácter lignocelulósico, como las maderas de podas, que pueden llegar a ser muy nocivos para el medio ambiente y la salud humana.

Las maderas de podas de las cepas (principalmente sarmiento), son un residuo agroindustrial que generalmente se quema en el campo, causando problemas medioambientales y ecológicos, así como un riesgo para la salud humana por la formación de compuestos tóxicos durante la combustión de la lignina.

Los hidrolizados hemicelulósicos de las podas del sarmiento, obtenidos a partir de la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido, han sido empleados para la obtención de xilitol por *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426, sin embargo dicha bioconversión no ha sido eficiente debido a la formación de otros subproductos (principalmente etanol). Teniendo en cuenta que las hexosas (tales como glucosa o manosa) pueden inhibir el metabolismo de la xilosa por represión o inactivación de las enzimas implicadas en el transporte y catabolismo de la xilosa, y que esos hidrolizados hemicelulósicos se caracterizan por su elevada concentración de glucosa, se ha desarrollado una tecnología de aprovechamiento, consistente en la conversión secuencial de glucosa a ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* seguido de una fermentación de xilosa a xilitol por *Debaryomyces hansenii* tras la eliminación de *L.rhamnosus* del medio por microfiltración.

Las condiciones óptimas se han conseguido empleando los hidrolizados hemicelulósicos detoxificados y concentrados, tras la adición de CaCO_3 en ambas etapas de la fermentación, y empleando purgas de nitrógeno después de cada toma de muestra con la finalidad de reducir el oxígeno disuelto. En estas condiciones se han obtenido 31.5 g de ácido láctico l^{-1} ($Q_{\text{AL}} = 1.312 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $Y_{\text{AL/S}} = 0.93 \text{ g g}^{-1}$) y 27.5 g de xilitol l^{-1} ($Q_{\text{Xilitol}} = 0.458 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $Y_{\text{Xilitol/S}} = 0.53 \text{ g g}^{-1}$).

Finalmente, el ácido láctico fue recuperado selectivamente mediante el empleo de la resina Amberlite IRA 400 (0.0374 g de ácido láctico/g de resina seca), permitiendo así la posterior recuperación de xilitol gracias al desarrollo de un proceso en etapas secuenciales de adsorción, concentración, precipitación con etanol y cristalización hasta llegar a obtener xilitol apto para el consumo alimentario.

Método para evaluar la actividad antimicrobiana de muestras de pintura y revestimientos para paredes.

Rodríguez, M., de la Fuente, A., Guiu, N., Arosemena, L., Adelantado, C., Shiva, C., y Calvo, MA.

Departamento de Sanidad y Anatomía Animales. Facultad de Veterinaria. (Universidad Autónoma de Barcelona). Campus Universitari Bellaterra 08193 Bellaterra (Barcelona).

Maria.RodriguezG@uab.es

Entre los revestimientos que se utilizan con el fin de proteger a determinadas superficies, ocupan un lugar fundamental las pinturas.

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de pinturas y otros tipos de revestimientos utilizados de forma habitual, se procedió al estudio del comportamiento de los microorganismos que se detallan a continuación, al estar en contacto con ellos. Los microorganismos utilizados en el ensayo se han seleccionado entre los más habituales en el medio ambiente o entre los que se consideran indicadores de calidad medio-ambiental. Estos microorganismos son: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Candida albicans*.

Para llevar a cabo el estudio planteado, se prepararon portaobjetos previamente esterilizados que fueron impregnados con la pintura objeto de evaluación. Los portaobjetos se dejaron secar y se depositaron sobre placas de Petri que contenían el medio de cultivo adecuado según el ensayo posterior se llevara a cabo sobre bacterias o bien sobre hongos. Paralelamente se prepararon suspensiones de cada uno de los microorganismos en suero fisiológico estéril. Las suspensiones fueron depositadas sobre las placas de Petri preparadas con el medio de cultivo y el portaobjetos impregnado con la pintura a ensayar. Para cada microorganismo se sembraron cinco placas que contenían el revestimiento o pintura en estudio y se mantuvieron placas controles con el fin de comprobar la viabilidad de los microorganismos ensayados. Las temperaturas de incubación fueron las adecuadas para cada microorganismo, manteniéndose las placas en un ambiente de humedad controlada, durante dos semanas, a lo largo de las cuales y cada siete días se realizaron lecturas.

En todos los ensayos control se observó crecimiento de las cepas en estudio.

Se aportan los resultados obtenidos que permiten seleccionar las pinturas y/o revestimientos adecuados a cada tipo de ambiente, en función de la contaminación ambiental esperable.

Índice de alfabético de autores

Abalde, J.....	86, 87	Dapena-Mora, A.....	78
Adam, A.C.....	25	de la Fuente, A.....	93
Adelantado, C.....	90, 93	de la Rosa, J.M.....	88
Adrio, J.L.....	16	de Laorden, E.H.....	63
Ageitos, J.M.....	45	de Miguel, T.....	19, 79
Alonso, J.C.....	30	de Vos, W.M.....	33
Amárita, F.....	70	Díaz, P.....	52, 55, 65
Andreu, D.....	15	Domínguez, J.M.....	39, 92
Araque, I.....	53	Durrant, L.R.....	83, 85
Argandoña, M.....	48	Echavarri-Erasun, C.....	73
Arias, A.....	11	Escribano, C.....	91
Arias, M.E.....	51, 74	Español, R.....	89
Arosemena, L.....	90, 93	Espinazo-Romeu, M.L.....	68
Arrojo, B.....	77	Fajardo, P.....	62
Arroyo, T.....	66	Falcocchio, S.....	24
Ayo, J.....	70	Feijoo-Siota, L.....	19, 61, 71
Ballesteros, A.....	26	Félix, L.F.....	84
Baños, S.....	47	Fernández Carrasco, E.....	75, 76, 81
Barreiro, C.....	21, 31	Fernández-Lafuente, R.....	54
Barrio, E.....	11	Fernández, I.....	78
Barros-Velázquez, J.....	34, 36, 50, 58, 59, 73	Fernández, O.....	89
Belloch, C.....	11	Figuroa, M.....	77
Beloqui, A.....	26	Fiuzza, M.....	18, 80
Benítez, T.....	17	Franco Uría, A.....	75, 76
Berenguer, J.....	13	Franco, C.....	58
Berlanga, M.....	27	Franco, E.....	31
Blanco, E.....	15	Fresno, J.M.....	69
Blasco, L.....	71, 79	Gallardo, O.....	55
Bordons, A.....	53	Ganges, L.....	15
Brandão, M.P.....	84	García Diéguez, E.....	81
Britz, M.L.....	85	García-Estepa, R.....	48
Cachafeiro Pin, J.....	61, 79	García-Martín, A.B.....	74
Cadahía, O.....	42	García, C.....	70, 82
Calo-Mata, P.....	36, 34, 46, 58, 59, 73	García, V.....	38
Calvo, M.A.....	90, 93	Gil, J.A.....	18, 80
Campos, C.A.....	59	Goedegebuur, F.....	23
Campos, J.L.....	40, 77, 78	Golyshin, P.N.....	26
Carballo, S.....	44	Golyshina, O.V.....	26
Carneiro, D.....	82	González-Anadón, G.....	89
Carrascosa, A.V.....	35	González-Lavado, E.....	21
Casablanco, A.....	89	González, R.....	35, 66
Casanova, M.....	28	González, S.S.....	11
Castro, J.M.....	69	Guerra, N.P.....	62
Cebollero, E.....	35	Guerrero, R.....	12
Cepeda, A.....	36, 58	Guillén, F.....	74
Cid, A.....	87	Guisán, J.M.....	54
Codón, A.C.....	17	Guiu, N.....	90, 93
Combina, M.....	11	Hahn-Hägerdal, B.....	37

Hernández, M.....	51	Pepper, S.J.....	85
Herrero, C.....	86	Pérez-Leblic, M.I.....	74
Hurtado, A.....	38	Pérez-Rama, M.....	86
Iglesias, M.....	63	Pérez-Redondo, R.....	47
Infante, J.J.....	68	Pérez-Través, L.....	11
Isorna, P.....	55	Pérez, A.....	28
Johnson, E.A.....	73	Pérez, E.....	68
Kalinowski, J.....	21	Piubeli, F.....	83
Latorre-García, L.....	25	Polaina, J.....	25, 26, 55
Lema Rodicio, J.M....	60, 67, 75, 76, 81, 82	Polo, J.....	89
Letek, M.....	18, 80	Poza, M.....	29, 45, 46, 50, 71, 73
Lima, A.S.....	84	Prado, M.....	34, 36, 58, 59
Lima, S.A.....	84	Pratto, F.....	30
Lioy, V.S.....	30	Prim, N.....	52
Liras, P.....	47	Ramos, A.....	18, 80
López-Cortés, N.....	26	Ramos, J.J.....	38
López-García, M.T.....	47	Reguant, C.....	53
Lorente, I.....	43	Reina-Bueno, M.....	48
Lorezana Vega, L.M.....	47	Reyes-Duarte, D.....	26
Lu-Chau, T.A.....	60, 67	Rincón, M.A.....	17
Luengo, J.M.....	20	Rivas, B.....	92
Manca de Nadra, M.C.....	53	Rivas, R.....	92
Manresa, A.....	65	Rivera, B.....	38
Maqueda, M.....	49	Roca Bordello, E.....	75, 76, 81
Martín, J.F.....	21, 31	Roca, E.....	82
Martín, S.....	54	Rodríguez García, A.....	31, 47
Martínez-Bueno, M.....	49	Rodríguez-Hervá, J.J.....	38
Martínez-Peinado, J.....	41	Rodríguez-Tarduchy, G.....	63
Martínez-Rodríguez, A.....	35	Rodríguez, A.....	59
Martínez, J.P.....	28, 72	Rodríguez, C.....	89
Mateos, L.M.....	18, 80	Rodríguez, F.....	15
Méndez, R.....	40, 77, 78	Rodríguez, I.....	62
Mesas, J.M.....	64	Rodríguez, J.....	51
Mielgo, I.....	60, 67	Rodríguez, L.....	88
Moldes, A.B.....	92	Rodríguez, M.....	90
Molenaar, D.....	33	Rodríguez, M.C.....	64
Molina, M.....	68	Rodríguez, M.E.....	68
Montalbán-López, M.....	49	Rosa dos Santos, F.....	19
Mosquera-Corral, A.....	40, 77, 78	Ruiz T.....	88
Moya, R.....	51	Ruiz, C.....	24
Muñoz, R.....	35	Ruiz, L.....	91
Murgui, A.....	28	Saborido, N.....	89
Nieto, J.J.....	48	Sacristán, N.....	69
Núñez, J.I.....	15	Saguir, F.....	53
Núñez, Y.....	35	Sánchez, J.L.....	60, 67
Ordóñez, E.....	18	Sancho, J.....	27
Pascoal, A.....	34, 36	Sandoval, M.H.....	69
Pastor, F.I.J.....	24, 52, 55, 56, 57	Santamarta, I.....	47
Pastrana, L.....	62	Santos, C.....	63
Peláez, F.....	14	Santos, F.....	31
Pena, R.....	67	Santos, O.A.....	84

Sanz-Aparicio, J.....	55	Torres, E.....	86, 87
Saso, L.....	24	Troyano, N.....	51, 74
Segura, A.....	38	Valdivia, E.....	49
Serrano, A.....	66	Vallejo, J.A.....	50
Shiva, C.....	90, 93	Vázquez-Padín, J.R.....	77
Siezen, R.J.....	33	Veiga-Crespo, P.....	45, 61
Silva, I.S.....	85	Ventosa, A.....	54
Smid, E.J.....	33	Villa, T.G.....	19, 34, 45, 46, 50, 58, 61, 71, 73, 79
Sola-Landa, A.....	31	Villadangos, A. F.....	80
Tabera, L.....	35	Villadangos, A.F.....	18
Tauch, A.....	21	Vinuesa, T.....	27, 91
Teusink, B.....	33	Viñas, M.....	27, 91
Timmis, K.N.....	26	Wiersma, A.....	33
Tornadijo, M.E.....	69		
Torrado, A.....	62, 92		