

Comodoro Rivadavia, 04 de julio de 2007.-

**VISTO:**

La nota entrada a FCN. N° 1823/07 presentada por el Departamento Bioquímica, mediante la cual eleva una Práctica Profesional a elección para la carrera de Bioquímica, y

**CONSIDERANDO:**

- Que la misma ha sido avalada por el Comité de Carrera del Departamento de Bioquímica.
- Que ha seguido el camino crítico correspondiente.
- Que cumple con las Resoluciones CAFCN. N° 234/92 y 057/99.
- Que el tema fue tratado en la IV sesión ordinaria del año en curso.

**POR ELLO, EL CONSEJO ACADÉMICO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
RESUELVE**

Art. 1°) Aprobar la **Práctica Profesional** que se detalla, en el marco de la Práctica Profesional a elección de la carrera de Bioquímica cuyos contenidos figuran en el Anexo que forma parte integrante del presente despacho:

Estudio de bacterias tolerantes a los ambientes áridos de la Patagonia.	Dr. Héctor M. Alvarez / Bioq. Roxana A. Silva
---	---

Art. 2°) Regístrese, cúrsense las comunicaciones pertinentes, notifíquese a quien corresponda y cumplido, archívese.-

**RESOLUCION CAFCN. N° 369/07.-**

  
MSC SUSANA FERRERO  
Sec. Académica  
Facultad de Ciencias Naturales  
U.N.P.S.J.B.

  
Lic. ADOLFO GENINI  
DECANO  
Fac. De Ciencias Naturales  
U.N.P.S.J.B.

Hoja N° 1/5

**ANEXO – Cpde. R.CAFCN. N° 369/07.-**

Práctica Profesional a Elección de Bioquímica- 2007

Cátedra Genética- Depto de Bioquímica

Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT)

Responsable: Dr. Héctor M. Alvarez (Prof. Adjunto Cátedra de Genética)

Colaboradores: Bioq. Roxana A. Silva (Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Genética)

**Título: Estudio de bacterias tolerantes a los ambientes áridos de la Patagonia**

**Objetivos:**

Objetivo formal: el objetivo del presente trabajo es que el alumno realice sus prácticas utilizando conceptos, razonamientos y metodologías aprendidas en la carrera y aplicadas durante el desarrollo del proyecto de investigación en curso en la Cátedra de Genética.

Objetivo específico: Caracterizar bacterias tolerantes a la desecación aisladas de muestras de suelo de la Patagonia semiárida y establecer la relación entre la tolerancia a la desecación y la capacidad de acumular triacilglicéridos.

Palabras claves: desecación, bacterias tolerantes, triacilglicerol

**Introducción:**

La desecación es uno de los factores ambientales más críticos que deben afrontar los microorganismos en suelos desérticos. La remoción de agua en la célula impone una serie de problemas estructurales, fisiológicos y bioquímicos a los que los microorganismos deben adaptarse para poder sobrevivir. El estrés oxidativo es una de las consecuencias que afrontan los microorganismos durante su incubación bajo condiciones de desecación. Sin embargo, este no es el único efecto que deben afrontar las bacterias sometidas al estrés hídrico, sino que es un evento multifactorial donde coexisten otros tipos de estrés como por ejemplo el estrés osmótico y la escasez de nutrientes externos, entre otros. Una de las respuestas clásicas de las bacterias al estrés hídrico es el detenimiento del crecimiento y división celular y un ajuste de su fisiología y bioquímica. Entre los mecanismos de adaptación de los microorganismos a las condiciones de desecación se pueden mencionar, (1) la inducción de sistemas de reparación de ADN eficientes, (2) la producción de solutos compatibles, como la trealosa o la ectoína, entre otros, para balancear su estado osmótico, (3) la reducción de la actividad metabólica de las células, (4) la activación de sistemas de protección antioxidantes como la síntesis de pigmentos carotenoides y de enzimas catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, (5) la producción de una sustancia polimérica extracelular (EPS) y (6) la acumulación y movilización de lípidos de reserva como los triacilglicéridos (TAG), que sirven de fuente endógena de carbono y energía y como fuente de agua metabólica, (7) entre otros mecanismos posibles.

**ANEXO – Cpde. R.CAFCN. N° 369/07.-**

La síntesis y acumulación del EPS podría retrasar la pérdida de agua de la célula y suministrarle el tiempo necesario para realizar sus ajustes a nivel bioquímico, fisiológico y molecular, mientras que la oxidación endógena de los TAG podría suministrar la energía y los precursores moleculares necesarios para desencadenar los mecanismos de protección y adaptación a las condiciones de desecación. Debido a esto, en el presente proyecto se propone comprobar la existencia de una relación entre la adaptación a condiciones áridas y la síntesis y acumulación de TAG en bacterias. Para tal fin, se analizará la presencia de genes claves para la síntesis de TAG, en las bases de datos genómicas disponibles de microorganismos con capacidad conocida de tolerancia a la desecación. Por otro lado, se propone realizar el aislamiento de cepas bacterianas autóctonas con capacidad de sobrevivir a condiciones extremas de desecación. Una vez aisladas, se propone conocer su identidad y su capacidad de acumular TAG.

**Bibliografía**

La Cátedra cuenta con una variedad de libros del área que servirán de fuente de conocimientos básicos sobre el tema. Además se cuenta con bibliografía específicamente relacionada con el tema de estudio representada por artículos científicos de revistas tales como: Applied and Environmental Microbiology, Journal of Bacteriology, Archives of Microbiology, Applied Microbiology and Biotechnology, entre otros.

**Metas:**

- 1- Aislar y caracterizar bacterias tolerantes a la desecación de muestras de suelo de la región.
- 2- Establecer la relación entre la tolerancia a la desecación y la capacidad de acumular TAG en las cepas aisladas.
- 3- Establecer la presencia de genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de TAG en el genoma de bacterias tolerantes a la desecación.
- 4- Análisis de los resultados y conclusiones.

**Actividades:**

- 1- Lectura y análisis de la temática a desarrollar en la bibliografía actual.
- 2- Aislamiento de cepas bacterianas con capacidad de tolerar condiciones de desecación extremas a partir de muestras de suelo de la Patagonia semiárida.
- 3- Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.
- 4- Análisis de la capacidad de las bacterias aisladas para tolerar condiciones de desecación (determinación del grado de tolerancia).
- 5- Análisis de la capacidad de acumular lípidos neutros (TAG y ceras) en las cepas autóctonas y cepas modelo tolerantes a la desecación.

**ANEXO – Cpde. R.CAFCN. N° 369/07.-**

6- Búsqueda en bases de datos disponibles y análisis de los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de TAG en bacterias tolerantes a la desecación.

7- Análisis y procesamiento de datos.

**Materiales y Métodos:**

Materiales:

La Cátedra cuenta con los materiales, equipos y soporte financiero necesarios para la realización del presente trabajo. La presente Práctica será financiada con los subsidios obtenidos por nuestro grupo para la realización de los proyectos de investigación en curso.

Métodos:

*Aislamiento de cepas bacterianas con capacidad de tolerar condiciones de desecación extremas a partir de muestras de suelo de la Patagonia semiárida.*

Se realizará el aislamiento de cepas no esporuladas a partir de muestras de suelo de la Patagonia semiárida, con o sin contaminación, utilizando dos tipos de técnicas de aislamiento:

- Se realizarán las recolecciones de muestras de suelo de diferentes lugares de la Patagonia semiárida, se realizarán recuentos de bacterias totales (UFC/g) al inicio del ensayo y se incubarán las muestras de suelo bajo condiciones de desecación (28° C- 30 % HR) durante diferentes períodos de tiempo (semanas). Se analizará para cada tiempo la variación de los recuentos de bacterias totales (UFC/g) y se realizará el aislamiento de las colonias representativas o dominantes crecidas en el medio de cultivo luego del tratamiento de desecación del suelo.
- Se realizará la siembra masiva directa y luego de diluciones de un inóculo de 100 µl de una suspensión de 1 g de suelo en solución fisiológica estéril (SF), en agar LB diluido 1/5. Se incubarán las placas durante 7 días a 25° C hasta la aparición de colonias. A continuación se realizará una suspensión en SF de todo el material celular crecido en el medio de cultivo y se colocará el mismo sobre un filtro de nitrato de celulosa (0,45 µ). Los filtros conteniendo el material celular se incubarán en desecador bajo condiciones controladas (28° C- 30 % HR) por el término de 10 días. Luego del tratamiento de los filtros, se resuspenderá el material celular y se sembrarán en agar LB diluido 1/5 para la recuperación de las colonias de los microorganismos sobrevivientes al tratamiento de desecación.

*Caracterización taxonómica de las cepas aisladas.*

Se realizará la caracterización taxonómica de las cepas aisladas tolerantes a la desecación mediante los siguientes análisis: microscopía, coloración de Gram, OF, oxidasa, catalasa y secuenciamiento de gen DNAr 16S.

**ANEXO – Cpde. R.CAFCN. N° 369/07.-**

*Análisis de la capacidad de acumular lípidos neutros (TAG y ceras) en las cepas autóctonas y cepas modelo tolerantes a la desecación.*

Con el fin de analizar la capacidad de las cepas aisladas para acumular TAG y otros lípidos neutros, se realizará el cultivo de las células en medio mineral con un exceso de la fuente de carbono (gluconato o acetato de sodio) y un déficit de la fuente de nitrógeno (MSM0,1). El análisis químico de las células se llevará a cabo mediante la extracción de lípidos totales con solventes orgánicos y separación por cromatografía en capa delgada (TLC) y por cromatografía gaseosa previa metanólisis, según trabajos previos (Alvarez et al. 1996. Arch. Microbiol. 165:377-386).

*Ensayos de estrés y supervivencia.*

Para realizar los ensayos de desecación en las cepas seleccionadas, se utilizará el método llevado a cabo en trabajos anteriores (Alvarez et al. 2004. FEMS Microbiol. Ecol. 50:75-86). Brevemente, se sembrarán alícuotas de 7 µl de una suspensión de células (OD<sub>436</sub> de 3) sobre un filtro de nitrato de celulosa (0,45 µ de diámetro de poro) y los filtros se colocarán en la superficie de un medio sólido de medio mineral conteniendo 0,5 % de gluconato de sodio (o 0,2 % de acetato de sodio) con un déficit de la fuente de nitrógeno para favorecer la acumulación de lípidos y se incubará a 28° C. Una vez crecidas las colonias, se incubarán los filtros en desecador a una temperatura de 28° C y en una atmósfera de humedad relativa de 30 %, controlada con un higrómetro. Para determinar la supervivencia de los microorganismos, se cortarán pequeños trozos del filtro conteniendo una única colonia, se resuspenderán las células y se realizarán recuentos celulares (determinación de UFC/ml). El efecto de la desecación será determinado calculando el número de células supervivientes respecto del número total de células antes del estrés.

*Búsqueda en bases de datos disponibles y análisis de los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de TAG en bacterias tolerantes a la desecación.*

Las secuencias de los genes y proteínas implicadas en la biosíntesis y acumulación de TAG serán obtenidas de la base de datos de Proyectos Genómicos disponibles de bacterias de los géneros *Mycobacterium*, *Deinococcus*, *Rubrobacter* y *Anabaena*. Se analizará la presencia de los genes de interés en el contexto de clusters u operones en el programa respectivo. Para el análisis de las secuencias, comparación de las secuencias con otros microorganismos, alineamientos y búsqueda de secuencias conservadas o motivos específicos, se utilizarán programas disponibles en Internet o programas específicos disponibles en la Cátedra de Genética. Para el análisis de los genes, se prevé una búsqueda bibliográfica y análisis detallado de publicaciones específicas para cada microorganismo a investigar.

**Cronograma:**

*Duración:* 16 semanas.

**ANEXO – Cpde. R.CAFCN. N° 369/07.-**

<b>Actividades</b>	<b>Semanas</b>															
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>1</b>	x	x														
<b>2</b>		x	x	x	x	x	x	x								
<b>3</b>					x	x	x	x	x	x	x					
<b>4</b>								x	x	x	x	x	x	x		
<b>5</b>								x	x	x	x	x	x	x		
<b>6</b>		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<b>7</b>															x	x

*Cantidad de alumnos:* 1 (uno)

*Cuatrimestre:* segundo cuatrimestre

\*\*\*\*\*