

296

BIOTRANSFORMACION DE LA LIGNOCELULOSA POR HONGOS: ESTUDIOS QUIMICOS, ENZIMATICOS Y ULTRAESTRUCTURALES. Lignocellulose biotransformation by fungi: chemical, enzymatic and ultrastructural studies. Barraza, J.M.; Guillén, E.; Almendros, G.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. y González, A.E. (Centro de Investigaciones Biológicas, Velázquez 144, Madrid, España. Los estudios sobre los mecanismos de biodegradación de la lignocelulosa han experimentado un importante avance en los últimos años. Nuestros primeros estudios se orientaron a la caracterización de un proceso natural de deslignificación llamado "hucupe" producido en la pluvisilva valdiviana y que es consumido por el ganado. Posteriormente se han utilizado otros sustratos de interés en la industria papelera y en la alimentación animal. Se ha realizado la caracterización físico-química de la lignocelulosa transformada. En una selección de las muestras más representativas se realizó el estudio de la digestibilidad, enriquecimiento proteico y la cinética del proceso. Por otro lado, se caracterizó la lignina mediante: distribución de tamaño molecular y carga eléctrica, estudios espectroscópicos derivatográficos; IR y ¹³C-NMR, oxidación alcalina con CuO y análisis de los productos por CG-EM. Se determinaron las actividades enzimáticas (celulasas, xilanasas, feruloxidasas y ligninasas) de los hongos estudiados. Por último se realizaron estudios de microscopía óptica y electrónica con EDAX. La caracterización química del "hucupe" ha revelado que la disminución de la lignina es paralela a la degradación de los xilanos en madera de *Eucryphia cordifolia* colonizada por *Ganoderma australe*. Las zonas con grandes acumulos de micelio presentan un patrón de degradación simultánea que coincide con el comportamiento in vitro de los hongos de podredumbre blanca estudiados. La degradación de la relación S/G que se correlaciona con la deslignificación. En general se comprueba que maderas de baja relación S/G son difícilmente biodegradables.

MICROBIOLOGIA Y GENETICA

297

COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD TOXICA Y GENOTOXICA DE MEZCLAS COMPLEJAS DE CONTAMINANTES PRESENTES EN AGUAS CONTINENTALES DE LA VIII REGION. (Chemical composition and toxic and genotoxic activity of pollutant complex mixtures present in continental water bodies in the VIII Region). Venegas, W.*., Alarcón, M., Duk, S., Weigert, G., García, M. Depto. de Biología Molecular, Fac. Cs. Biológicas y de Rec. Nat. Universidad de Concepción.

Entre los riesgos que para la salud de los seres vivos conllevan los contaminantes ambientales, productos de la actividad humana, hay que destacar los denominados agentes genotóxicos, tanto por la naturaleza de las lesiones inducidas como por el largo periodo de latencia que las caracteriza. Es por tanto una tarea urgente diseñar y poner a punto ensayos de detección de esta actividad que permita eliminar y/o aminorar la exposición humana frente a agentes potencialmente genotóxicos.

En la parte terminal del río Bio-Bio, VIII Región, se ha detectado concentraciones de algunos agentes químicos que sobrepasan los valores máximos establecidos por la norma chilena. El efecto genotóxico de los complejos químicos totales presentes en el ambiente acuático señalado está siendo estudiado por nuestro grupo mediante ensayos de Genética Toxicológica de respuesta rápida *in vitro* e *in vivo*. Los test de aberraciones cromosómicas y micro-núcleos fueron realizados usando como modelos vertebrados y vegetales. Se presentan los resultados de los análisis químicos y se discuten los efectos genotóxicos inducidos.

Los resultados positivos encontrados en los efluentes de varias industrias de la VIII Región, nos ha llevado a repetir las experiencias usando cada dos meses por un periodo de dos años, los mismos modelos y otros ensayos de respuesta rápida a objeto de detectar la presencia de variaciones estacionales. La información que de estos estudios se puede generar, se estima, será de interés para las políticas de control de la calidad de los ambientes acuáticos de Chile.

*Financiado por FONDECYT 91/0366.

298

GENES DE *Salmonella typhi* REGULADOS POR LA DISPONIBILIDAD DE OXIGENO. (Oxygen-regulated Genes of *Salmonella typhi*). Obregón, Y.H., Contreras, L., Blanco, L.P. y Mora, G.C. Unidad de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica causada por *Salmonella typhi*. Durante su ciclo infectivo la bacteria enfrenta diversas condiciones ambientales, a las que debe adaptarse para sobrevivir. Una condición que encuentra *Salmonella typhi* durante la infección es la escasa disponibilidad de oxígeno tanto en el epitelio intestinal como en los tejidos del hospedero, lo que constituye para la bacteria un ambiente anaeróbico.

Para estudiar la regulación de la expresión génica de *Salmonella typhi* en respuesta a la anaerobiosis, se construyeron fusiones de operones utilizando el derivado del fago-transposón Mu: MudJ (*lac*, Kan^R). Se obtuvieron 12450 clones Kan^R, los que fueron replicados en agar Luria con X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) e incubados en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Gas-Pak). Se seleccionaron las colonias con fenotipo Lac⁺ en anaerobiosis (colonias azules), pero con fenotipo Lac⁻ en aerobiosis (colonias blancas), que corresponden a fusiones en genes inducidos en ausencia de oxígeno. Además, se seleccionaron aquellas fusiones que fueron reprimidas en anaerobiosis.

De 326 mutantes con estas características, 26 fusiones demostraron ser, por ensayo de la actividad β-galactosidasa, inducidas en anaerobiosis, mientras que otras 23 fueron reprimidas. Estas mutantes fueron caracterizadas tanto fisiológica como bioquímicamente.

Financiado por proyecto FONDECYT 619/89, grant AID-Porinas y proyecto 91/079 Universidad de Chile.

299

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL GEN *ompC* DE *Salmonella typhi* MEDIANTE FUSION DE OPERON *ompC-lacZ* CROMOSOMAL. (*S. typhi ompC* gene expression studied by chromosomal *ompC-lacZ* operon fusion) Asenjo, C.A. y Toro, C.S. Unidad de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: G.C. Mora)

S. typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea. En el interior del hospedero, esta bacteria se ve sometida a diferentes condiciones de osmolaridad, oxigenación y temperatura. Con el objeto de estudiar la regulación de la porina *OmpC* se implementó un sistema el cual hace uso de un derivado del fago-transposón Mu, llamado *MudJ* (*lac*, *Kan^R*), el que nos permitió obtener fusión de operones con el gen *ompC*.

A partir de una colección de mutantes por inserción de *MudJ* en *S. typhi* rugosa MMW001, se seleccionaron mutantes en la porina *OmpC* por resistencia al fago P221 y por ausencia de la proteína en la membrana externa; los clones *Lac⁺* seleccionados en placas agar Luria con X-Gal fueron crecidos en distintas condiciones de osmolaridad para determinar su actividad β -galactosidasa. De un total de 40 clones analizados se seleccionaron aquellos que presentaron regulación por osmolaridad. Estudios con estas mutantes han mostrado que la expresión del gen *ompC* de *S. typhi* es inducido por aumento de osmolaridad en el rango que va desde 0.03 hasta 0.3 osmolar. Sin embargo, a mayores osmolaridades, se observa una represión de la expresión de este gen. Estos estudios muestran además que la porina es inducida por anaerobiosis. Este comportamiento fue observado también en el patrón de membrana externa de *S. typhi* silvestre crecida en condiciones equivalentes, analizado en geles de poliacrilamida-SDS.

Estos resultados demuestran que *OmpC* es la porina expresada preferentemente en condiciones fisiológicas de osmolaridad y anaerobiosis presentes en el hombre, su huésped natural.

Financiado por proyecto FONDECYT 619/89.

301

EMPLEO DE SONDAS MARCADAS MEDIANTE LA TECNICA DE PCR PARA ESTUDIAR LOS GENES DE RECEPTORES QUIMIOTACTICOS EN BACTERIAS QUIMIOLOTROFICAS. (Use of PCR-labeled probes to study the chemotactic receptor genes in chemolithotrophic bacteria). Rojas, J. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Anteriormente demostramos que las bacterias móviles *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* presentan actividad quimiotáctica, posiblemente mediada por receptores metilables, como ocurre en *E. coli*. El receptor *Tar* de *E. coli* media la respuesta frente a Aspartato (atrayente) y a Ni^{12} (repelente). En cambio, las bacterias hierro - oxidantes responden siendo atraídas por Ni^{12} y repelidas por Asp. Para estudiar los genes de los receptores de *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, se prepararon sondas utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para marcar y amplificar diferentes regiones del gen *tar* de *E. coli* con dUTP-digoxigenina. Para marcar la región que codifica el dominio periplásmico de *Tar*, se emplearon como partidores, oligonucleótidos cuyas secuencias estaban comprendidas entre las bases -1 a -20 y 896 a 912 del gen. Se marcó la región más conservada del dominio citoplásmico del receptor, empleando como partidores los oligonucleótidos comprendidos entre las bases 915 a 935 y 1612 a 1632. Como DNA templado se empleó el pAkl01, que contiene *tar* y otros genes quimiotácticos de *E. coli*. Estas sondas se hibridaron con los DNA totales de las bacterias en estudio, digeridos con diferentes enzimas de restricción y transferidos a filtros de nylon. Encontramos homología con ambas regiones del gen *tar* de *E. coli*, en el DNA de *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, y *T. thiooxidans* lo que demuestra una alta conservación en el sistema quimiotáctico bacteriano.

Financiado por: Proyecto Fondecyt 91-1010 y Universidad de Chile B. 2889 - 9034

300

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FLAGELO DE CAMPYLOBACTER JEJUNI. (Purification and characterization of flagella of *Campylobacter jejuni*). Andrews, E., Fernández, H. Instituto de Inmunología, Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile. (Patrocinante: O. Garrido).

Campylobacter jejuni es un frecuente agente de diarrea en humanos, capaz de colonizar la mucosa del intestino y causar enfermedad. El flagelo de CJ ha sido identificado como potencial adhesina por la cual la bacteria se adhiere a las células epiteliales.

Se trabajó con una cepa virulenta de CJ aislado de un lactante con diarrea, la cual fue cultivada en medio bifásico a 42°C en ambiente de CO₂ obteniéndose, por centrifugación, las bacterias. Estas fueron sometidas a sonicación por unos minutos. El flagelo fue separado con ciclos de centrifugación diferencial a 5000xg 30 min y 100000 xg 60 min. La proteína flagelar se purificó por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Analizando los resultados por microscopía electrónica y SDS-PAGE se observó una estructura flagelar de PM 63 K y un contaminante menor de 42 K.

Este estudio está dirigido a purificar y caracterizar la proteína flagelar, con el objeto de establecer la real participación de la estructura flagelar en la adhesión bacteriana.

(Financiado por Proyecto FONDECYT 59-89).

302

CHARACTERIZACION DE BACTERIAS MARINAS AGAROLITICAS. (Characterization of agarolytic marine bacteria). Quintana, L., Peruzzo, G., León, O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Varias especies de bacterias agarolíticas se encuentran descritas en la literatura. Estas han sido clasificadas principalmente dentro de los géneros *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Vibrio* y *Pseudomonas*.

En nuestro laboratorio hemos aislado tres cepas de bacterias agarolíticas (N-1, C-1 y C-2), en muestras de agua de mar y algas marinas de la VIII y X regiones. Estas difieren entre sí en algunas características morfológicas y especialmente en la forma como degradan el agar cuando se crecen en placas de cultivo.

En este trabajo se presentan resultados de estudios morfológicos y bioquímicos tendientes a identificar cada una de las cepas aisladas. También se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas aisladas y la producción de agarasas extracelulares.

Las bacterias aisladas tienen en común las siguientes características: necesitan de una concentración salina semejante al agua de mar para su desarrollo, requieren de iones Na^+ crecen en un intervalo de temperatura entre 4 y 28 °C, poseen un metabolismo de carbohidratos de tipo oxidativo, son aerobias estrictas, oxidasa y catalasa positivas. Morfológicamente corresponden a bacilos Gram (-), no esporulados, no capsulados y móviles por flagelación polar. Estas características permiten clasificarlas tentativamente en el género *Pseudomonas*, de acuerdo a los criterios de identificación propuestos en el Manual de Bergey.

La producción de agarasas extracelulares se determinó a distintos tiempos de crecimiento de las bacterias, midiendo el aumento del poder reductor en una solución tamponada de agar, incubada en presencia de una alícuota del sobrenadante libre de células (Dyggert, S. et al. (1965) Anal. Biochem., 13, 367-374).

Las agarasas producidas por estas bacterias en todos los casos estudiados son inducidas por la presencia de agar en el medio de cultivo, encontrándose la mayor concentración de enzima durante la fase estacionaria de desarrollo bacteriano. Solamente la producción de agarasa en la cepa C-1 fue reprimida por glucosa.

(Financiado por: DID, UACH S-90-2 y FONDECYT 90/0051)

303

MUTANTES DE *Thiobacillus ferrooxidans* CON ALTERACIONES DEL LIPOPOLISACARIDO. INFLUENCIA EN EL MECANISMO DE ADHERENCIA A MINERALES. (*Thiobacillus ferrooxidans* mutants affecting the lipopolysaccharide. Influence in the attachment mechanism to minerals). Delgado, M., Melis, P., Osses, J. y Rodríguez, M.- Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Microbiología, Casilla 114-D, Santiago.

Thiobacillus ferrooxidans es el principal organismo involucrado en el proceso de Biolixiviación de minerales sulfurados.

En el mecanismo directo, la adherencia juega un papel decisivo. Trabajos previos, de nuestro laboratorio, han demostrado que el Lipopolisacárido (LPS), participa en la adherencia en forma importante. Es necesario establecer, sin embargo, la especificidad del fenómeno mediada por esta molécula. Para ello se han estudiado mutantes inducidas con Nitroso Guanidina y mutantes espontáneas, que no poseen la capacidad de oxidar ión ferroso, para así determinar si en ellas, además, se produce alteración del LPS, y consecuentemente en el mecanismo de adherencia.

Las características fenotípicas de estas mutantes, la frecuencia de aislamiento, su estabilidad y efecto sobre el LPS y adherencia, así como otras características biológicas, se presentan en esta comunicación.

Financiado por Proyectos PNUD CHI/88/003 y FONDECYT 575/89.

305

EVIDENCIAS DE AISLAMIENTO SEXUAL ENTRE LINEAS DE *Drosophila melanogaster*. (Evidences of sexual isolation between lines of *Drosophila melanogaster*). Ruiz, G., Meneses, U. y Ganzur, P. Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Los experimentos de selección divergente en *Drosophila* han constituido una importante vía para investigar especiación simpátrida a nivel experimental.

Ruiz (1990), ha obtenido mediante selección divergente en *Drosophila melanogaster*, Valdivia, dos líneas significativamente diferentes; una para oviposición altamente agregada y otra para baja agregación de huevos. Estas líneas, permitieron posteriormente, establecer que el rasgo "oviposición agregada" poseía una base hereditaria poligénica, con participación de genes con efecto dominante.

Con estos antecedentes, se postuló que 220 generaciones de selección para el rasgo poligénico antes mencionado, podría estar conduciendo a un incipiente aislamiento reproductivo.

Para poner a prueba esta hipótesis, se estimaron los índices de aislamiento sexual, mediante tres diseños experimentales; elección por parte del macho, elección por parte de la hembra y elección múltiple.

Los resultados permiten comprobar la existencia de un incipiente aislamiento reproductivo pre y postcigótico; dada la mayor proporción de cruzamientos homogaméticos, y el mayor número de descendientes obtenidos de los homocruzamientos.

(Trabajo parcialmente financiado por el proyecto FONDECYT 85-0060).

304

MUTAGENESIS POR TRANSPOSICION EN *Brucella abortus* 2308 (Mutagenesis by transposition in *Brucella abortus*). García, A., Sangari, F. y Aguero, J. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile; Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, España. (Patrocinio: R. Zemelman).

El avance de la tecnología del ADN recombinante ha permitido el desarrollo de una nueva estrategia para la inserción de genes foráneos en el genoma de bacterias Gram-negativas no relacionadas estrechamente con *E. Coli*. El sistema consta de dos componentes: (1) una cepa de *E. coli* "especial" llamada cepa movilizante y (2) vectores plasmídicos derivados de *E. coli* incapaces de replicarse en cepas ajenas al grupo entérico. El sistema es ampliamente aplicable para la mutagénesis mediante la inserción de transposones en forma aleatoria. Nos propusimos la creación de un conjunto de mutantes de *B. abortus* 2308, con el objeto de generar mutantes en la expresión de los genes omp.

Tenemos la evidencia física de la inserción de Tn5 en el cromosoma de *B. abortus* y la frecuencia de transposición fue de 10⁻⁶. Construimos una banca de 500 mutantes. Las propiedades afectadas, investigadas hasta el momento, son: hidrólisis de la urea, susceptibilidad a la penicilina, sensibilidad al eritritol y la fago resistencia.

Financiamiento: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, España.

306

INFLUENCIA DEL ACIDO ASCORBICO Y CISTEINA EN LA GENOTOXICIDAD DE N-NITROSODIMETILAMINA. (Influence of the ascorbic acid and cisteina on the genotoxicity of N-nitrosodimethylamine). Bastías, J.M. y Aranda, M. Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Depto. Química y Bioquímica, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile. (Patrocinio: R. Godoy-Herrera).

En trabajos previos hemos establecido la presencia de nitrosaminas en cecinas de consumo habitual en nuestra población, de las cuales un 51,6% de las muestras presentaron N-nitrosodimetilamina (NDMA), en concentraciones de 3,5 - 210 ppb. Extractos de cecinas con 1 ppb de NDMA provocaron daño al ADN de fibroblastos de pulmón humano (UDS test). El objetivo de este estudio fue determinar la posible inhibición del potencial mutagénico de NDMA por la adición de dos antioxidantes alimentarios como son el ácido ascórbico y cisteína, mediante el uso de bioensayos bacterianos.

Se utilizó *Salmonella typhimurium* TA100/pSK1002 que lleva el gen fusionado umuC'-lacZ para estudiar la regulación del gen umu que controla la expresión de la actividad β-galactosidasa. El operon umu es inducido por agentes que dañan el ADN y regulado genéticamente por los genes recA y lexA.

Se establece un paralelo entre el umu test y el test de Ames en relación a la inhibición del potencial mutagénico de diversas concentraciones de NDMA y los dos antioxidantes alimentarios, además se discute la sensibilidad de ambos métodos.

Financiado por Proyecto DICYT 02-90-11AL USACH.