

UCH-FC
Biotecnología
V 161
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**BÚSQUEDA DE SISTEMAS DE "QUORUM SENSING" TIPO AI-1 EN
DIFERENTES MICROORGANISMOS RELEVANTES EN BIOMINERÍA**

Memoria de Título
Entregada a la
Universidad de Chile
para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular

Susana Valeria Valenzuela Mayorga

Enero, 2007

Director de Memoria de Título: Dr. Nicolás Guiliani Guerin





**“BÚSQUEDA DE SISTEMAS DE QUORUM SENSING TIPO AI- 1 EN
DIFERENTES MICROORGANISMOS RELEVANTES EN
BIOMINERÍA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

SUSANA VALERIA VALENZUELA MAYORGA

Dr. Nicolás Guiliani
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'N. Guiliani', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'V. Cifuentes', written over a horizontal line.



Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Baeza', written over a horizontal line.

Santiago de Chile, 18 de enero 2007

A mis padres, Patricio y Susana



Desde Viña del Mar vine a caer a un lugar llamado Juan Gómez Millas, en el cual aprendí mi actual oficio de hacer ciencia, comprendí lo que es la discusión científica y adquirí una amplia gama de conocimientos, sin embargo, tengo que destacar lo valiosísimas son todas las personas que se encuentran en este lugar, profesores, compañeros, funcionarios e invitados. Todos me hicieron crecer como persona y agradezco a cada uno de ellos por aportar su grano de arena al desarrollo de una sociedad como queremos.

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota."

Teresa de Calcuta



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis padres, a quienes además dedico esta tesis, por el apoyo recibido y por ser este estudio, el resultado de un esfuerzo compartido y del amor que me enseñaron a dedicar a los diferentes objetivos en la vida.

También agradezco a Nicolás por su dedicación y paciencia en mi formación académica y por su apoyo emocional en mis momentos difíciles.

Al Dr. Jerez por permitirme utilizar las dependencias de su laboratorio para el desarrollo de mi trabajo.

A Juan Araos por su imprescindible ayuda en todas mis actividades experimentales y por compartir su inmensa sabiduría.

A mis compañeros Álvaro, Francisco, Mario, Simón y Alex por las discusiones cometidas, que hicieron avanzar la investigación y mis conocimientos.

A Matías, Alex y Pilar, por ayudarme con sus manos a realizar los experimentos de mi investigación.

A todo el equipo del laboratorio por el exquisito ambiente de trabajo que hemos logrado desarrollar y el apoyo que nos hemos prestado entre todos en diferentes circunstancias.

A mis amigas Natalia, Pilar, Francisca, Valentina, Bárbara y Melina por su incesable apoyo y por el cariño que me han entregado.

A mis amigos de la U que han compartido las frustraciones y éxitos del camino que elegimos y por acompañarnos siempre en la utilización de la mejor manera que conocemos de sobrellevar esta carga.

Y finalmente agradezco a la ciudad de Viña del Mar y su gente por ser mi fuente de inspiración en momentos de encierro en el Valle.

ÍNDICE



1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Lixiviación bacteriana.....	6
2.2. "Quorum Sensing".....	8
2.3. Proteína R.....	9
2.4. Proteína I.....	10
2.5. Otras sintasas.....	11
2.6. Detección de AHLs mediante biosensores.....	12
2.7. "Quorum Sensing" en <i>A. ferrooxidans</i>	13
2.8. Planteamiento de la investigación.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	16
3.2. Monitoreo del crecimiento celular.....	17
3.3. Técnicas generales de biología molecular.....	18
3.3.1. Extracción de DNA genómico.....	18
3.3.2. Extracción de DNA plasmidial.....	18
3.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	19
3.3.4. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.....	19
3.3.5. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.....	19
3.3.6. Clonamiento de productos de PCR.....	20
3.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
3.3.7.1. CODEHOP-PCR.....	23
3.3.7.2. PCR sobre las colonias recombinantes.....	24

3.3.8.	Experimento de Southern Blot.....	25
3.3.9.	Preparación de muestras para electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.....	25
3.4.	Extracción orgánica de acil homoserina lactonas.....	26
3.5.	Separación de la extracción orgánica por cromatografía en capa fina (CCF).....	27
3.6.	Ensayo biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4), para la detección de <i>N</i> -acil homoserina lactona.....	27
3.7.	Construcción del biosensor basado en el sistema de QS del tipo AI-1 de <i>A. ferrooxidans</i>	28
3.8.	Ensayo biosensor DH5 α - <i>pafeIuc</i>	29
3.9.	Análisis <i>in silico</i> de secuencias y comparación con bases de datos.....	31
4.	RESULTADOS.....	32
4.1.	Desarrollo de un biosensor de homoserina lactonas basado en el sistema de "Quorum Sensing" tipo AI-1 de <i>A. ferrooxidans</i>	32
4.1.1.	Bioensayos.....	32
4.1.1.1.	Validación experimental de las construcciones.....	33
4.1.1.2.	Estudio de la especificidad y sensibilidad de DH5 α - <i>pafeIuc</i>	34
4.2.	Caracterización del sistema de QS del tipo AI-1 en diferentes bacterias mineras.....	38
4.2.1.	Análisis de la producción de AHLs.....	38
4.2.2.	Búsqueda de los genes <i>I</i> y <i>R</i>	41
4.2.2.1.	Extracción de DNA genómico de diferentes bacterias involucradas en procesos de biolixiviación.....	42
4.2.2.2.	Búsqueda de genes homólogos a <i>afeI</i> y <i>afeR</i>	

mediante PCR en otras cepas biomineras.....	43
4.2.2.3. Búsqueda de genes codificantes para la proteína I, mediante CODEHOP-PCR.....	44
4.2.2.4. Búsqueda de la presencia de genes tipo I mediante Southern Blot con sonda radioactiva de <i>afel</i>	49
4.2.2.5. Búsqueda bioinformática de genes involucrados en el QS en una comunidad presente en el drenaje de una mina.....	51
5. DISCUSIÓN.....	53
6. CONCLUSIONES.....	58
7. REFERENCIAS.....	60



ÍNDICE TABLAS



Tabla 1	Cepas bacterianas.....	17
Tabla 2	Partidores utilizados durante el desarrollo de la tesis.....	22
Tabla 3	Sensibilidad del biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) para las diferentes AHLs.....	28
Tabla 4	Caracterización de las AHLs presentes en el medio de cultivo de diferentes cepas de <i>A. ferrooxidans</i>	42
Tabla 5	Resumen de la búsqueda bioinformática de genes involucrados en el QS tipo AI-1 en microorganismos presentes en una comunidad del drenaje ácido de una mina.....	52
Tabla 6	Resumen de resultados obtenidos para el presente estudio.....	58

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1	Locus QS descrito en la cepa <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	14
Figura 2	Esquema de la estrategia de clonamiento utilizada para el desarrollo del biosensor DH5 α - <i>pafeluc</i>	30
Figura 3	Efecto del crecimiento en cultivo mixto de la cepa biosensora DH5 α - <i>pafeluc</i>	33
Figura 4	Estudio de la especificidad del biosensor DH5 α - <i>pafeluc</i>	34
Figura 5	Análisis de la sensibilidad del biosensor DH5 α - <i>pafeluc</i>	35
Figura 6	Análisis de la producción de AHLs en extractos de diferentes cepas de <i>A. thiooxidans</i>	40
Figura 7	Análisis de la integridad física de los diferentes DNA genómicos purificados.....	43
Figura 8	Electroforesis de los productos de PCR obtenidos durante la búsqueda de los genes homólogos a genes <i>afel</i> y <i>afeR</i>	44
Figura 9	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídica de diferentes proteínas I identificada en diferentes proteobacterias...	46
Figura 10	Bloques conservados de las secuencias aminoacídicas de las proteínas I utilizados en el diseño de partidores CODEHOP-PCR.....	47
Figura 11	Electroforesis de los productos de CODEHOP-PCR obtenidos durante la búsqueda de los genes homólogos a genes <i>afel</i> en bacterias biomineras y resultados de las secuenciaciones.....	48
Figura 12	Experimento de Southern Blot utilizando la sonda de <i>afel</i> marcada con dCTP ^{a32}	50
Figura 13	Representación del locus QS de tipo AI-1 identificado en <i>Leptospirillum</i> sp. grupo III.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC:	Colección Americana de cultivos celulares
CCF:	Cromatografía en capa fina
COCHILCO:	Comisión Chilena del cobre
CODEHOP:	Partidor concenso degenerado
DSMZ:	Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB:	Luria Bertani
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE:	Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
TAE:	Amortiguador Tris acetato



1. RESUMEN

La minería del cobre actualmente en Chile constituye la mayor fuente de ingresos a las arcas fiscales. El desarrollo de nuevas tecnologías que permitan el avance sostenido de esta actividad contribuirá a mantener el lugar que ha ganado nuestro país como primer productor mundial de cobre. La biolixiviación aparece como una alternativa de bajo costo y no contaminante para realizar las tareas de extracción de minerales de baja ley frente a la actualmente utilizada pirometalurgia.

En la biolixiviación se describe como responsable del proceso a un consorcio de microorganismos donde predominan bacterias Gram-negativas y arqueas, dentro de las cuales *Acidithiobacillus ferrooxidans* es la bacteria más estudiada. El mecanismo por el cual se realiza la biolixiviación actualmente no se conoce del todo, pero se postula que las bacterias adheridas al mineral en forma de biopelícula son las encargadas de realizar este proceso.

El desarrollo de biopelículas es un proceso regulado por "Quorum Sensing" (QS) en diversas bacterias. El QS actualmente se define como el método de comunicación que presentan las bacterias y que utilizan para coordinar diversas funciones fisiológicas dentro de las cuales estarían involucradas la virulencia, el desarrollo de flagelo, producción de exopolisacarido, entre otras.

Para *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se ha descrito un sistema de QS del tipo AI-1 funcional, el cual es el que está más ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas. Este consta de la proteína AfeI que es la sintasa de diversos autoinductores (AI) del tipo acil homoserina lactonas, las cuales se encuentran presentes en el medio y se unen a nivel citoplasmático al regulador transcripcional AfeR, el cual regula entonces la expresión de los genes blanco al unirse a cajas palindrómicas presentes en zonas promotoras del genoma.

Debido a la potencial importancia del QS en la formación de biopelículas y la eficiencia del proceso de biolixiviación, se decidió determinar si el sistema tipo AI-1 descrito en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 es ubicuo para la especie. Además, se estudio la presencia de componentes del sistema AI-1 en otros microorganismos de importancia biominera.

Para lograr este objetivo se desarrollo un biosensor basado en el sistema QS del tipo AI-1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, se extrajeron AHLs en sobrenadantes de cultivos y se realizó la búsqueda de los componentes genéticos *I* y *R* mediante diferentes técnicas de biología molecular para cepas de catálogo de *A. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.

Se lograron identificar señales involucradas en el sistema de QS del tipo AI-1 presentes en sobrenadantes de cultivos de *A. thiooxidans*. Se estableció también, que el sistema QS del tipo AI-1 era ubicuo en *A. ferrooxidans*, identificando en distintas cepas, moléculas de AI presentes en los sobrenadante de cultivo, el gen *I* y en al menos una cepa diferente de la cepa ATCC 23270, el gen *R*. No se encontraron componentes del sistema QS del tipo AI-1 en *L. ferrooxidans*.

Por último, se analizaron los genomas disponibles de otros microorganismos presentes en ambientes biohidrometalurgicos mediante herramientas bioinformáticas. Dicho análisis reveló la existencia de un locus QS del tipo AI-1 en la secuencia parcial disponible del genoma de *Leptospirillum sp.* Grupo III.

ABSTRACT

Nowadays the copper mining industry in Chile generates the greatest source of income for the fiscal coffers. The development of new technologies that will allow the sustained advance of this activity will contribute to maintain the place that our country has gained as the main copper producer in the world. Biolixiviation is a low-cost, non-polluting alternative to perform the extraction of low law minerals when compared to pyrometallurgy, which is currently the most widely-used technology.

The microorganisms responsible for the process of biolixiviation are a consortium composed of Gram-negative bacteria and archaeas among which *Acidithiobacillus ferrooxidans* is the most studied. The mechanism by which the biolixiviation process is performed is not yet fully understood, but it is believed that the bacteria adher to the mineral forming a biofilm are those responsible for carrying out this process.

The development of biofilms by bacteria is a process that is regulated by "Quorum Sensing" (QS) in diverse microorganisms. QS is defined as the communication system that bacteria display and use to coordinate diverse physiological functions, including virulence, flagellum development and EPS production.

For *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a functional QS type AI-1 system has been described, which is most widely distributed system in Gram-negative bacteria. This system consists of the AfeI protein, which is the synthase of diverse auto-inducers (AI) of the acyl-homoserine lactone (AHL) type that are present in the media and bind to the transcriptional regulator AfeR, which regulates the expression of target genes when it binds to palindromic boxes present in the promoter regions of the genome.

Due to the potential importance of QS in the formation of biofilms and the efficiency of the process of biolixiviation, we decided to determine if the QS type AI-1 system described in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is ubiquitous in this specie. In addition, we analyzed the presence of the components of the QS type AI-1 system in other biomining microorganisms.

In order to achieve these objectives, a biosensor based on the QS type AI-1 system of *A. ferrooxidans* ATCC 23270, extractions of AHLs from culture supernatants and a screening for genetic components *I* and *R*, using different molecular biology techniques, in different strains of *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* was developed.

Positive signals involved in the QS type AI-1 system were identified in the culture supernatants of *A. thiooxidans*. Our results also revealed that this system was ubiquitous in different strains of *A. ferrooxidans*, that the AI molecules were present in the culture supernatant, and that the *I* gene and in at least one additional strain of ATCC 23270, the *R* gene were present. Components of the QS type AI-1 system in *L. ferrooxidans* were not identified.

Finally, the available genomes of other microorganisms present in the biohydrometallurgic environment were analyzed using bioinformatic tools. These analyses revealed the presence of a QS type AI-1 locus in the partial genome sequence available of the *Leptospirillum* sp. Group III.

2. INTRODUCCIÓN

La minería históricamente se constituye como la primera fuente de ingresos del país. Hasta la fecha, el dinamismo alcanzado por este sector ha permitido posicionar al país como un importante productor y exportador de minerales y metales, siendo actualmente el primer productor mundial de cobre.

El lugar de privilegio que ocupa hoy en día la minería chilena, se sostiene en la calidad y diversidad de sus recursos mineros. Como resultado de lo anterior, en la última década se han invertido un promedio anual de US\$ 1.700 millones y se espera que entre el 2004 y 2010 la inversión alcance US\$ 12.000 millones, señalando a Chile como uno de los países más atractivos del mundo para invertir en Minería. Se prevé que la industria minera tenga una rentabilidad sobre patrimonio estimada en 26,1% para el período 2004-2010, siendo la actividad económica productiva más rentable del país (COCHILCO, 2005).

Consiguientemente, en materia minera es necesario generar las capacidades humanas y técnicas para desarrollar procesos más eficientes, económicos y cada vez menos contaminantes.

En este contexto, la biolixiviación aparece como una opción más económica para la refinación de minerales de baja ley. Actualmente, los metales son obtenidos desde el mineral o su concentrado por métodos pirometalúrgicos, donde la obtención y refinación de los metales procede de la utilización del calor. Por esto, es necesario, para la rentabilidad del proceso, una alta concentración de metal en el mineral.

La biolixiviación, en cambio, es una técnica de natural de lixiviación de minerales sulfurados, basada en el metabolismo energético de algunos microorganismos que obtienen la energía necesaria para realizar sus funciones

vitales a partir de la oxidación de compuestos azufrados y ferrosos, presentes generalmente en los concentrados mineros. El hombre históricamente ha sacado provecho de esta actividad bacteriana, recuperando, por ejemplo, el cobre que se encuentra en aguas ácidas generadas naturalmente en depósitos de minerales, siendo el caso más emblemático, la producción de cobre en el Río Tinto, España (Zettler y col., 2002)

El descubrimiento del proceso de oxidación mediante microorganismos observado en el Río Tinto ha proyectado una larga carrera de investigaciones del mecanismo global y específico del fenómeno y concomitante con esto, la búsqueda de estrategias de optimización de su eficiencia.

La biolixiviación de metales involucra, en su mayoría, bacterias quimiolitotróficas, mesófilas, acidófilas y arqueas (Rawlings, 2005).

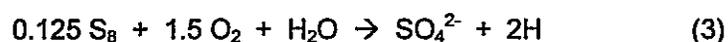
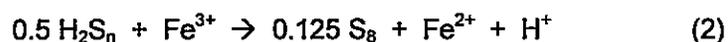
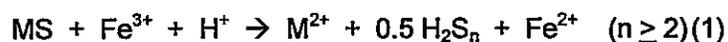
2.1. Lixiviación Bacteriana

La solubilización de metales debido a la acción de microorganismos, y la recuperación de éstos desde la solución en que quedan ha sido extensamente revisada por varios autores (Olson y col., 2003; Rawlings 2005; Sand and Gehrke, 2006).

La lixiviación actualmente se entiende como un proceso químico, en el cual el ión férrico y los protones son responsables de llevarlo a cabo. El rol dilucidado hasta ahora de los microorganismos es generar tanto los productos químicos de lixiviación, como el espacio y las condiciones químicas para realizarla. Para ejecutar su acción se ha descrito que los microorganismos forman una capa de exopolisacáridos cuando se adhieren a la superficie del mineral, formando una biopelícula (Sand y col., 1995). Las bacterias adheridas y no los organismos

planctónicos son los que realizan la biolixiviación (Arredondo y col., 1994; Devasia y col., 1993).

Los mecanismos de la disolución metálica no están del todo claros, aunque existen modelos que los explican (Rohwerder y col., 2003). Por ejemplo para el caso de la calcopirita (CuFeS_2) y otros sulfuros metálicos ácido-solubles (MS), se propone el mecanismo del polisulfito, donde la solubilización ocurre mediante el ataque combinado del ion férrico y los protones, y el intermediario principal corresponde al azufre elemental (ecuación 2). Este elemento puede ser oxidado a sulfato por microorganismos oxidadores de azufre tales como *Acidithiobacillus thiooxidans* o *Acidithiobacillus caldus* (reacción 3)



El ion ferroso (reacciones 1 y 2) puede ser re-oxidado a ion férrico por microorganismos oxidantes de hierro tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, o bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum* o *Sulfobacillus* (4).



El rol de los microorganismos es proporcionar el ácido sulfúrico (reacción 3) para que el protón pueda atacar y mantener al hierro en su forma férrica oxidada (reacción 4) para un ataque oxidativo contra el mineral.

En general los tipos de microorganismos que se encuentran naturalmente en las pilas donde ocurre la biolixiviación varían según las condiciones de éstas, ya sea del pH, de la temperatura, etc. En procesos que ocurren a temperatura

ambiente, hasta los 40 °C, los microorganismos más importantes comprenden un consorcio de bacterias Gram-negativas, donde los principales protagonistas son *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus* y *Leptospirillum sp.* (Goebel y Stackebrandt, 1994; Rawlings, 2005).

Para estas bacterias se ha descrito la capacidad de formar biopelículas, estado fisiológico en que ocurre la biolixiviación (Gehrke y col., 2001). Tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, la formación de biopelículas está regulada por el "Quorum Sensing" (QS) (Davies, 1998; Singh, 2000).

2.2. "Quorum Sensing"

En bacterias, la comunicación del tipo célula-célula se conoce como QS. Los comportamientos controlados por QS son aquellos que ocurren cuando la bacteria se encuentra a altas densidades poblacionales. Estos comportamientos, pese a que pueden darse en instancias en que la difusión de moléculas en el medio es limitada por la resistencia del mismo, son improductivos cuando son realizados individualmente, en cambio toman importancia al ocurrir de forma simultánea por un grupo de células. El QS regula además de la formación de biopelículas, otras funciones tales como la bioluminiscencia, la expresión de factores de virulencia, la esporulación, etc. La detección del quórum se logra con la producción, liberación y detección subsecuente de moléculas llamadas autoinductores. La acumulación de autoinductor en el medio extracelular hasta una concentración umbral ocurre cuando un número suficiente de células está presente en el medio (Bassler, 2002; Winans y Bassler, 2002).

El QS está presente en un gran número de especies y fue descrito por primera vez en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Nealson y col. 1979; Hastings y

col., 1979). El modelo paradigmático de QS presente en bacterias Gram-negativas se denomina QS del tipo AI-1. Lo constituyen un autoinductor (AI), una sintasa del autoinductor, un regulador transcripcional que une al autoinductor y un sitio de unión al DNA donde actúa el regulador. El autoinductor corresponde a una molécula de acil homoserina lactona (AHL). Este autoinductor sintetizado por la proteína I en el citoplasma difunde pasivamente a través de la membrana bacteriana y se acumula en el medio externo en proporción a la densidad celular. Cuando la concentración estimuladora umbral de AHL es alcanzada, el regulador transcripcional del tipo R la une dentro de la célula. El complejo R-AHL entonces, se une a los promotores de los genes blanco y regula su transcripción (Kiratisin y col., 2002).

Pese a que se han descrito señales de QS involucradas en etapas de adherencia de bacterias y maduración de biopelículas en diversos microorganismos (Párec y Greenberg, 2005), hasta la fecha la mayoría de los estudios de QS en bacteria se realizan en cultivos planctónicos, dado que simplifica el proceso de señalización. En los cultivos líquidos, las bacterias son fisiológicamente similares, producen las señales a las mismas tasas y están expuestas a un nivel homogéneo de la(s) molécula(s) señal(es). Cualquier grado de heterogeneidad en la población puede ser despreciado, ya que se trabaja con promedios. En la biopelícula, al contrario, se pierde la homogeneidad del cultivo y por ende no es posible trabajar con promedios (Parsek y Greenberg, 2005).

2.3. Proteína R

Varios son los reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia R que han sido identificados y purificados. Además, se ha determinado la estructura

tridimensional de un miembro de esta familia, TraR (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002). La proteína conforma un dímero asimétrico que interactúa con una secuencia palindrómica específica de DNA de 18 pares de bases llamada caja *Tra*. El extremo carboxilo terminal presenta el motivo HTH que permite la unión a DNA. La AHL se encuentra en un bolsillo hidrofóbico en el extremo amino-terminal de la proteína.

Se postula que las proteínas del tipo R se unen al DNA blanco principalmente cuando forman complejo con su correspondiente AHL, como son el caso de los activadores transcripcionales LasR en *Pseudomonas aeruginosa*, TraR en *A. tumefaciens*, LuxR en *V. fischeri* y CarR en *Erwinia carotovora* (Kiratisin y col., 2002; Zhu y Winans, 2001; Eglund y Greenberg, 2000; Welch y col., 2000). También, se ha descrito el caso en que el homólogo R se une a su DNA en ausencia de AHL actuando como represor, interacción revertida por su AHL, como es el caso SpnR en *Serratia marcescens* (Horng y col., 2002). Por último, se han descrito casos híbridos de comportamiento en que el regulador actúa tanto como represor que como activador. RhIR de *P. aeruginosa*, por ejemplo es represor de su propio promotor, pero actúa como activador de otros genes (Medina y col., 2003).

2.4. Proteína I

La proteína I es la enzima responsable de la síntesis de la AHL, molécula conocida como autoinductor del tipo 1 o AI-1, las cuales se describen como moléculas capaces de difundir libremente a través de la membrana (Kaplan y Greenberg, 1985), ó, en el caso de al menos una AHL de larga cadena acil, a través de bombas activas (Evans y col., 1998). A medida que la población bacteriana crece, las AHLs se acumulan en el medio, en proporción a la densidad celular. Para

la síntesis de AHL, la proteína I cataliza la reacción entre sus dos sustratos, el S-adenosyl metionina (SAM) y la Acil-acil carrier protein (acil-ACP), promoviendo la lactonización de la metionina y la unión de la cadena acil al anillo (Watson y col., 2002). El SAM es un intermediario de la vía de síntesis de los aminoácidos metionina, lisina y treonina, mientras que la acil-ACP participa como intermediario intermediario en la biosíntesis de ácidos grasos (Miller y Bassler, 2001). Dependiendo de la disponibilidad de acil-ACPs, en cada bacteria, las proteínas I producen AHLs que difieren en el largo de la cadena acil, la sustitución en el carbono 3 de la misma (Bassler, 2002), y en la presencia de insaturaciones (Llamas y col., 2004).

2.5. Otras Sintetasas

Existen bacterias que presentan mecanismos alternativos para monitorear la densidad de su población. En la bacteria marina *V. harveyi* se ha caracterizado un autoinductor denominado HAI-1 (hidroxibutiril homoserina lactona). Presenta una alta similitud con otros AI-1, pero la sintasa y el receptor de esta molécula no comparten mayor similitud con el sistema QS del tipo AI-1 descrito. Además existe evidencia genética sobre la existencia de un segundo inductor en este microorganismo, el cual se ha denominado HAI-2, y del cual aún se desconoce su estructura. La expresión de los genes *lux* en *V. harveyi*, es dependiente de la densidad celular y puede ser activada por cualquiera de los dos AI. La síntesis de HAI-1 requiere la presencia de una proteína denominada LuxLM (Fuqua y col., 1996).

Por otro lado, existe Hdts, proteína no relacionada con las sintasas de las familias LuxLM y LuxI. Ésta dirige la síntesis de AHLs en *P. fluorescens*. El sustrato requerido por esta enzima para realizar su función aún no está descrito, pero dada la similitud de secuencia que comparte con miembros de familias de acil transferasas, se cree utiliza sustratos similares (Whitehead y col., 2001).

2.6. Detección de AHLs mediante Biosensores

El QS en bacterias ha sido estudiado en gran parte mediante la detección de la producción de AHL en el sobrenadante de los microorganismos. El desarrollo de biosensores permite detectar dicha producción.

Los biosensores de moléculas del tipo AI-1 usualmente están compuestos por un promotor controlado por el complejo R/AI-1 fusionado a un gen reportero como por ejemplo el gen *lacZ* (Shaw y col., 1997). Detectan AHLs de largo de cadenas variable en su gran mayoría, aunque recientemente se han desarrollado algunos para AHLs de cadena larga (Llamas y col., 2004). El principio de estos biosensores se sostiene en la ausencia de la AHL sintasa, por lo que la actividad del promotor sólo puede ser inducida con AI-1 exógeno. Uno de los biosensores frecuentemente utilizado es *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Este biosensor tiene la capacidad de detectar AHLs variables en su sustitución en el C3 de la cadena acil y en el largo de la cadena, en un rango entre C4 y C12 (Shaw y col., 1997).

2.7. "Quorum Sensing" en *A. ferrooxidans*

Recientemente se caracterizó un sistema de comunicación de QS del tipo AI-1 presente en la cepa *A. ferrooxidans* 23270, el cual fue el primer sistema de comunicación descrito en algún tipo de bacteria acidófila, quimiolitotrófica de importancia biominera (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). El sistema está compuesto por el gen *afeI* codificante para la AHL sintasa, una caja *afe* palindrómica, río arriba del gen *afeI*, y divergente a él, el gen *afeR* codificante para el regulador transcripcional AfeR, el cual presenta también una secuencia palindrómica río arriba. La expresión de ambos genes fue determinada mediante PCR en tiempo real, al igual que la del marco abierto de lectura, *orf3*, ubicado en la zona intergénica de ambos genes. *Orf3*, codifica para una proteína cuya función es desconocida. Cabe destacar que aún no existe consenso en cuanto a las moléculas Als presentes en la cepa AF23270. Por un lado se postula la existencia de nueve AHLs diferentes, con todos los tipos de sustitución y cadenas laterales de tamaño medianas y largas (Farah y col. 2005) (Fig. 1). Por otro lado, un segundo reporte informa la presencia de una única AHL sin sustituciones y de 14 C en la cadena acil (Rivas y col., 2005). No existe hasta el momento información sobre el sistema en otras cepas de la especie, por lo que resulta de vital importancia para el posterior desarrollo de nuevas estrategias que involucren este sistema, el precisar el conocimiento sobre el tipo de autoinductores que produce *A. ferrooxidans*.

2.8. Planteamiento de la Investigación

Hasta la fecha se ha descrito un sistema de QS del tipo AI-1 funcional en la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005), mas

aún permanece indescifrado la ubicuidad del sistema en la especie. Antecedentes sobre la existencia de estos sistemas de QS del tipo AI-1 en otras especies biolixiviantes como *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* hasta la fecha tampoco han sido reportados.

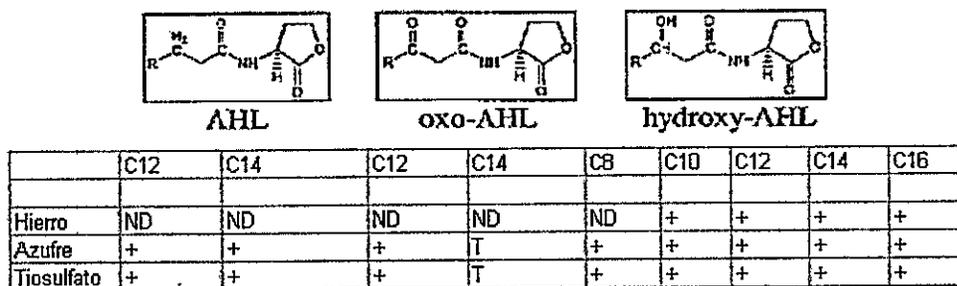


Figura 1. AHLs caracterizadas presentes en el sobrenadante de *A. ferrooxidans* 23270 crecido en diferentes fuentes energéticas (Farah y col., 2005) (C). Los diferentes R de las AHLs corresponden en cada caso a C8, OCH₃(CH₂)₄; C10, OCH₃(CH₂)₆; C12, OCH₃(CH₂)₈; C14, OCH₃(CH₂)₁₂; ND, no detectado; T, traza.

En muchas especies bacterianas, está demostrada la regulación del desarrollo de la biopelícula por el QS. Conjuntamente, estudios recientes reportan la presencia de cultivos mixtos en las biopelículas formadas sobre los minerales y en aguas ácidas, provenientes del drenaje de minas (Tyson, 2004). Asimismo en estos cultivos mixtos entre *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* ocurre la biolixiviación de manera más eficiente que en presencia de una sola especie (Sand y col., 2002). Toda esta información sustenta la hipótesis de que son varios los microorganismos que extraen el mineral, teniendo cada uno un rol particular en el nicho. Actualmente existe evidencia que la comunicación inter-especie ocurre, siendo la molécula AI producida por una especie, reconocida por otra de la misma comunidad y teniendo un efecto biológico sobre ella, como son el caso de *B. cenocepacia* y *P. aeruginosa* (Lewenza y col., 2002). No obstante, la comunicación que existe entre los microorganismos mineros es un fenómeno aún desconocido.

Indagar si es solo una sola bacteria la que logra influir en el comportamiento de otras especies o si lo que sucede es un dialogo abierto en que varias logran enviar y recibir señales, resultando finalmente la biolixiviación, adquiere en este contexto gran relevancia. Caracterizar esta conexión, es fundamental para lograr desarrollar estrategias de optimización de los procesos biomineros, llevados a cabo por estos microorganismos.

En base a estos antecedentes y la necesidad de caracterizar el fenómeno, formulamos la hipótesis que sistemas QS del tipo AI-1 podrían encontrarse en otras cepas de *A. ferrooxidans* y en las especies *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Con el fin de obtener una respuesta fundamentada a la hipótesis planteada, nos propusimos como objetivo general, investigar la existencia de componentes del sistema QS del tipo AI-1 en diferentes bacterias mineras.

Las estrategias a seguir para alcanzar el objetivo general se resumen en los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un biosensor basado en el sistema de QS del tipo AI-1 presente en *A. ferrooxidans*.
2. Realizar una búsqueda de componentes del sistema de QS del tipo AI-1 en bacterias mineras mediante:
 - a. Búsqueda de señales tipo AHL utilizando la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) sobre extractos de AHLs y/o análisis de extractos mediante HPLC acoplada a espectro de masas.
 - b. Identificación de genes *I/R* mediante técnicas de biología molecular.
 - c. Búsqueda bioinformática de genes involucrados en QS a partir de la secuencia de una comunidad biolixivante, presente en aguas ácidas del drenaje de una mina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y condiciones de Cultivo

Se utilizaron diferentes cepas de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Tabla 1). Para el crecimiento se utilizó hierro férrico en medio 9K modificado (Guiliani y Jerez, 2000) para *A. ferrooxidans*, azufre elemental contenido en medio 9K y tiosulfato en medio 71 (DSMZ) contenido en una solución 20 mM junto a los siguientes componentes KH_2PO_4 , 3.0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/l para *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*.

Para trabajos de biología molecular se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 α y BL21 (DE3). Se crecieron en medio LB (Sambrook y col., 1989). Cuando fue requerido, los medios se suplementaron con Ampicilina a una concentración final de 100 mg/l a partir de una solución stock de concentración 100 g/l.

Para el ensayo del biosensor se utilizó la cepa *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (Shaw y col., 1997), la cual fue crecida tanto en medio LB suplementado con gentamicina a 25 $\mu\text{g/ml}$ como en medio ABm, que contiene: K_2HPO_4 , 3g/l; NaH_2PO_4 , 1g/l; NH_4Cl , 1g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/l; KCl , 0.15 g/l; CaCl_2 , 0,01g/l. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/l; Glucosa, 0,5% según la necesidad (Chilton y col., 1974).

Para la preparación de medio sólido en placas, al medio LB se le adicionó agar (DIFCO[®]) a una concentración final de 1.5 % (p/v). Las placas LB-XIA se suplementaron con: X-Gal 50 mg/ml, IPTG 200 mM y Ampicilina 100 mg/l.

Tabla 1. Cepas Bacterianas

Nombre de la Cepa	Designación ^a	Origen del Aislamiento
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	AF23270	Efluente ácido mina de carbón
<i>A. ferrooxidans</i> DSMZ 583	AF583	Desconocido
<i>A. ferrooxidans</i> DSMZ 1927	AF1927	Aguas de drenajes mineros
<i>A. ferrooxidans</i> DSMZ 9464	AF9464	Sulfuros de cobre
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859	AF19859	Aguas de drenajes mineros
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 33020	AF33020	Mina de Uranio, Japón
<i>A. thiooxidans</i> DSMZ 504	AT504	Desconocido
<i>A. thiooxidans</i> DSMZ 9463	AT9463	Reactor de biolixiviación
<i>A. thiooxidans</i> DSMZ 11478	AT11478	Aguas de drenajes mineros
<i>L. ferrooxidans</i> DSMZ 2391	LF2391	Aguas de drenajes mineros
<i>L. ferrooxidans</i> DSMZ 2705	LF2705	Depósitos de Cobre

a, Pese a que las cepas normalmente se denominan con el nombre de la especie seguido por la fuente y el número de catálogo (por Ej. *A. ferrooxidans* ATCC 23270), en esta tesis, con fines prácticos, sólo se utilizarán las iniciales de la especie y el número de catálogo para denominar las diferentes cepas.

3.2. Monitoreo del Crecimiento celular

Para seguir el crecimiento de los diferentes cultivos bacterianos se realizó el conteo celular en una cámara de Petroff-Hausser mediante la visualización con el microscopio óptico OLYMPUS BX50. Para la obtención de la concentración se dividió el promedio de células de cada celda por el volumen que contiene una celda, el cual corresponde a 5×10^{-8} ml.

3.3. Técnicas generales de Biología Molecular

3.3.1. Extracción de DNA genómico.

Para todas las cepas se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del Kit Wizard de purificación de DNA genómico (Promega®). El paso de preparación de las células ha sido modificado y adaptado para las cepas extremófilas de la siguiente manera: 85 ml de cultivo se centrifugaron a 10000 g durante 20 min. El pellet obtenido se lavó una vez con agua ácida. Este paso tiene por objetivo limpiar y eliminar el exceso de sales e iones que presenta el cultivo. Para las cepas crecidas en hierro se agregó un paso de lavado con citrato de sodio para eliminar el hierro unido a la pared celular. Posteriormente, el protocolo se utilizó sin modificación, exceptuando el último paso en que se resuspende el pellet de DNA genómico en 200 µl de agua bidestilada estéril.

3.3.2. Extracción de DNA plasmidial

Se utilizó el Kit Wizard Plus Minipreps DNA purification system (Promega®). Se utilizaron cultivos de *E. coli* recombinantes crecidos en tubos de vidrio con 5 ml de medio LB-Amp.

3.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar los DNA plasmidiales o cromosómicos purificados, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon en

amortiguador TAE 0.5X, con una concentración de 1 o 2% de agarosa ultra pura (BioRad® o Promega®), según se requiriera. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (0.25 % de Azul de Bromofenol, 40 % de Sacarosa).

Para los experimentos de hibridación de DNA la electroforesis se efectuó a 80V durante 4 h.

La tinción se realizó durante 20 min, en una solución de TAE 0.5X con bromuro de etidio a una concentración de 20 µg/ml. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta.

3.3.4. Digestiones de DNA con Enzimas de Restricción

Las digestiones de DNA cromosómico o plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por los proveedores de cada enzima. En el caso de las reacciones de desfosforilación que se realizaron en algunos casos luego de la digestión, se utilizó la fosfatasa alcalina (CIP) (New England Biolabs®).

3.3.5. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Se utilizó el Kit Wizard SV gel and PCR clean up System (Promega®), sin modificaciones.

3.3.6. Clonamiento de productos de PCR

Para el clonamiento de fragmentos amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y CODEHOP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa

con partidores consenso-degenerados), se utilizó como vector el plasmidio pGEM-T Easy (Promega®). Este vector es específicamente diseñado para el clonamiento de productos de PCR ya que posee nucleótidos de timina en sus extremos 5', los cuales se complementan con los nucleótidos de adenina del extremo 3' del amplificado agregados por la *Taq* DNA polimerasa.

Para las reacciones de ligación, se siguieron las instrucciones sugeridas por los proveedores, utilizando 1 µl de T4 DNA ligasa (3 U/µl) (Promega®), 1 µl de amortiguador para ligasa 10X, 1 µl de plasmidio (10 ng) y 7 µl de inserto (10-50 ng). Esta reacción se incubó por 16 h a 4°C. Un volumen de 5 µl de la reacción de ligación se utilizó para transformar 25 µl de células competentes de la cepa de *E. coli* JM109 (Promega®). Al finalizar la transformación, a los tubos se les adicionó 250 µl de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación durante 1 h. Luego se plaquearon 200 µl en placas LB-XIA, las cuales finalmente se incubaron a 37°C durante 16 h.

Las colonias que se obtuvieron, se analizaron mediante PCR en colonias utilizando los partidores SP6 y/o T7, que flanquean el sitio de clonamiento del vector, y otro partidor complementario del fragmento clonado.

3.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Según el tipo de experimento se diseñaron 2 tipos de partidores: partidores consenso degenerados para CODEHOP-PCR ("consensus-degenerate oligonucleotide primers") y partidores no degenerados para experimentos de PCR común.

La técnica de CODEHOP-PCR (Rose y col., 1998) consiste en la utilización de partidores consenso-degenerados diseñados a partir de bloques conservados de

un alineamiento de secuencias aminoacídicas. Cada partidador consiste en una zona 3' de carácter degenerado y una zona 5' de consenso. Solamente se necesitan 3 a 4 aminoácidos conservados para el diseño de la zona 3', la que es estabilizada en los primeros ciclos de amplificación por la zona 5' consenso, que abarca dos tercios del partidador. Para el diseño de los partidadores, se utilizaron 4 secuencias aminoacídicas de la proteína I (*A. ferrooxidans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Ralstonia solanacearum* y *P. aeruginosa*). En estas se identificaron bloques de secuencias conservadas mediante el uso del programa "BLOCK MAKER" (http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html). Los partidadores se diseñaron en el mismo sitio Web.

Los partidadores de carácter no degenerado se diseñaron, a partir de la secuencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponible en el sitio TIGR (www.tigr.org).

Se utilizaron otros partidadores no degenerados, correspondientes a secuencias de los plasmidios utilizados en el clonamiento y expresión de genes utilizados en este estudio. Estos partidadores son SP6, T7 y T7 terminador. Todos los partidadores se compraron a la empresa Prologo de Sigma® (Tabla 2).

3.3.7.1. CODEHOP-PCR

Las reacciones de CODEHOP-PCR se hicieron con partida en caliente ("hot start"). El "hot-start" es utilizado para disminuir el rendimiento de la síntesis de productos inespecíficos. Esto favorece la sensibilidad de la reacción ya que los partidadores no se titulan en sitios del DNA donde no les corresponde hibridar. Antes del programa de ciclos de temperatura, una vez alcanzados los 95°C el DNA se encuentra denaturado por ende no hay ningún apareamiento de DNA genómico que

pueda influir en la síntesis inespecífica, se espera un minuto, se coloca pausa al termociclador y se agrega la *Taq* DNA polimerasa con su respectivo amortiguador.

Tabla 2. Partidores utilizados durante el desarrollo de la tesis.

Partidor	Secuencia
SP6	5' GATTTAGGTGACACTATAGA 3'
T7-pGEM-T	5' TTGTAATACGACTCACTATAG 3'
T7-Terminador	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGGT 3'
T7-Pet	5' GAAATTAATACGACTCACTATAG 3'
AfeRCOOH	5' CGATCACGACAGCAACCCGAG 3'
AfeRCOOH2	5' CGACAGCAACCCGAGCATCGC 3'
AfeRNH2	5' CATATGGCGTCCGAAATGGCG 3'
IIG1	5' CTGGCCCGGTTATAACCTGC 3'
RIG2	5' GGTAGCCTGTTCTTATCCGA 3'
AfeICOOH	5' CGGTTAGTCCAGATCTATCCAGC 3'
AfeINH2	5' CATATGCAGGTTATAACCGGGCCA 3'
afervNcoI	5' CCTCCATGGCGTCATCCTCATAGAGTT 3'
afefwNdeI	5' GGCAGCATATGGGTCCCGCCATTACA 3'
deg-afel 1 ^a	5' TCAGGTTTTTATTGAACAACCTGgntggsmbt 3'
deg-afel 1,2 ^a	5' TATCGTCATCAGGTTTTTATTGAAmryntngntgg 3'
deg-afel 2 ^a	5' GGTGGTCGGCAGCAGAckngcraacc 3'
deg-afel 3 ^a	5' TGCGGCTGCGCGmgnyntntcc 3'
deg-afel 4 ^a	5' GCGGCAAACGGGACadytccanac 3'

a, partidor consenso degenerado. Alfabeto degenerado: a=A; c=C; g=G; t=T; r=AG; y=CT; m=AC; k=GT; w=AT; s=CG; b=CGT; d=AGT; h=ACT; v=ACG; n=ACGT.

Para las reacciones de CODEHOP-PCR se tomaron 2 μ l de DNA molde (40 ng/ μ l), 4 μ l de partidor directo (D) a una concentración de 100 ng/ μ l, 4 μ l de partidor reverso (R), a una concentración de 100 ng/ μ l, 5 μ l de dNTPs (1 mM), 10 μ l de amortiguador 5X, (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5% Triton X-100 y 12.5 mM MgCl₂), 21.5 μ l de H₂O, 2.5 μ l de DMSO 100 % y 0.2 μ l de *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μ l). El volumen de reacción fue de 50 μ l por cada tubo. Para el mix 1 de reacción se mezclan todos los componentes excepto la *Taq* DNA polimerasa, el amortiguador 5X y la mitad del agua a utilizar por reacción. El segundo mix que tiene estos tres componentes, se alicuota en cada tubo en una segunda instancia, al tener los tubos a 95° C.

El esquema general fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguidos por N ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación (X), con Y min de síntesis a 72°C. Finalizando con 3 min de síntesis final a 72°C. El número de ciclos (N), la temperatura de hibridación (X) y el tiempo de síntesis (Y), son función del tamaño del amplificado a obtener y de la T_m de los partidores utilizados.

3.3.7.2. PCR sobre las colonias recombinantes.

Con el fin de analizar los clones recombinantes obtenidos y comprobar la presencia de inserto, se utilizó la técnica de PCR en colonias (Campbell y Choy, 2001). Esta PCR se realizó sin purificar el DNA plasmidial. Su principio se basa en que este último queda en solución luego de la lisis que sufren las bacterias con el paso N°1 de la PCR, que se realiza a 95°C. Con el fin de chequear al mismo tiempo la presencia y la orientación del inserto, se utilizó un partidor de secuencia complementaria a la del vector y un partidor de secuencia complementaria al

inserto, entonces sólo se obtiene amplificado de las colonias que presentan el inserto en la dirección esperada.

Para realizar esta reacción, se tocó una colonia con una punta estéril y el material extraído se resuspendió en un volumen de 50 µl de agua estéril. Posteriormente se tomaron 2 µl de la suspensión bacteriana y se agregó el mix, que está compuesto de 0.7 µl de partidor D (100 ng/µl), 0.7 µl de partidor R (100 ng/µl), 0.7 µl de dNTPs 1mM, 0.8 µl de DMSO, 3.5 µl de amortiguador 5X (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5% Triton X-100 y 12.5 mM MgCl₂) y 8 µl de H₂O. El volumen final de reacción para cada tubo fue de 15 µl.

El programa de reacción fue el siguiente: (1) 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50°C, 1-2 min a 72°C, para finalizar con 3 min a 72°C.

3.3.8. Experimento de Southern Blot

Para los experimentos de hibridación con sonda heteróloga se utilizó como sonda el gen *afel* de *A. ferrooxidans*. La sonda *afel*, marcada con dCTP^{α32} se sintetizó a partir de DNA genómico de *A. ferrooxidans* 23270 con el kit NEBlot de New England Biolabs® y luego el exceso de nucleótidos se eliminó con columnas Qiagen® para la eliminación de nucleótidos. Para el experimento de hibridación se digirieron cantidades variables de DNA cromosómico de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* con las enzimas de restricción *EcoRI* y/o *HindIII* (New England Biolabs) de acuerdo con las recomendaciones descritas por los proveedores para obtener una digestión total. Los fragmentos de DNA totalmente digeridos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 0.5X. Luego de la electroforesis el DNA fue denaturado con HCl 0.25 M y transferido a una membrana de nylon positivamente cargada (Immobilon-

NY+, Millipore®) mediante el método de transferencia semi-seca (Sambrook y col., 1989).

3.3.9. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Las muestras de células de *E. coli* para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se trataron con amortiguador de muestra que contenía: Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8), SDS al 2%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.001%. Las muestras se denaturaron 10 min a 100°C. Luego se centrifugaron 1 min a 8000 x g, para obtener solamente el sobrenadante con las proteínas solubilizadas, que fue utilizado para las electroforesis.

Para el análisis de las proteínas totales se utilizaron geles de poliacrilamida al 12.5% SDS-PAGE. Las electroforesis se corrieron entre 100 o 200 V, hasta que el frente de migración alcanzó el borde inferior del gel. Los geles se tñeron 30 min con una solución de azul de Coomasie al 0.2%, metanol al 50% y ácido acético al 7%. Se destñeron luego mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 7%.

3.4. Extracción Orgánica de Acil homoserina Lactonas

Para extraer AHL producidas por las cepas en estudio, se inocularon cultivos al 20 % v/v con células crecidas en medio hierro o azufre. En el caso del cultivo en tiosulfato, no es posible inocular v/v puesto que la diferencia de pH entre el medio fresco y el inóculo genera un precipitado de azufre. Para solucionar este problema

se tomó el equivalente al 20% de medio en inóculo. Se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos y se lavó con 1.5 ml de medio fresco. Se repitió el procedimiento 3 veces y luego se resuspenden las células en 1 ml de medio fresco y se inoculan. Se monitoreó el crecimiento del cultivo por conteo celular a diario. Los cultivos fueron extraídos 3 veces utilizando agitación con magneto con 0.5 volúmenes de diclorometano. Cada extracción se efectuó durante 30 minutos, reservando cada vez la fase superior orgánica. Al terminar se eliminaron los restos de agua agregando $MgSO_4$ anhidro y agitando manualmente durante 2 minutos. Se filtró el extracto con algodón hidrofílico para eliminar la sal de magnesio. Se concentró a 50°C en rotavapor hasta un volumen aproximado de 1 ml. Las muestras obtenidas se secaron y saturaron con N_2 . Se resuspendieron en acetato de etilo para los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) o se enviaron a análisis mediante cromatografía líquida de fase reversa acoplada a espectro de masas en el Laboratorio de Biología y Química Marina de la Universidad de Bretaña en Francia.

3.5. Separación de la extracción orgánica por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Para separar los distintos compuestos que puedan haberse obtenido mediante la extracción orgánica se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina utilizando una matriz C18 de fase reversa (Merck®). El procedimiento consistió resuspender el extracto orgánico en acetato de etilo concentrándolo 10000 veces y luego se depositó esta solución en la TLC a 1 cm. del borde inferior. Se esperó la absorción de la muestra para iniciar la cromatografía y se corrió utilizando metanol:agua (60:40) como fase móvil (Bertani y Venturi, 2004).

3.6. Ensayo biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), para la detección de N-acil homoserina lactona

Se utiliza para el ensayo la cepa reportera de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) gentilmente entregada por el Dr. Juan C. González (Tabla 3). Esta cepa no es productora de AHLs dado que carece del gen *traI*. Presenta una fusión del gen *lacZ* con *traG* el cual es regulado mediante autoinducción. Estas características permiten la detección de AHL exógenas mediante la reacción de la β -galactosidasa en presencia de X-Gal (Shaw y col., 1997; Luo y col., 2001).

Tabla 3. Sensibilidad del biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) para diferentes AHLs (Shaw y col., 1997).

AHL	Rf	Cantidad a aplicar requerida (en pmol)	
		Mínimo para detección	Detección rutinaria
3-Oxo-C ₄	0.82	NM	NM
3-Oxo-C ₆	0.68	0.03	0.52
3-Oxo-C ₈	0.41	0.0005	0.03
3-Oxo-C ₁₀	0.18	0.19	3
3-Oxo-C ₁₂	0.07	2	16
C ₄	0.77	ND	ND
C ₆	0.47	300	1200
C ₈	0.23	2.4	38
C ₁₀	0.09	100	400
C ₁₂	0.02	NM	NM

Rf, coeficiente de partición de las distintas AHLs en experimentos de CCF. El valor reportado puede variar levemente de un experimento a otro (Shaw y col., 1997). ND, AHL no detectada por el biosensor. NM, valor no medido.

La cepa reportera se inoculó desde una colonia fresca y se creció en un tubo de 5 ml de LB suplementado con gentamicina a 25 μ g/ml a 30°C durante 48 h. Se

inoculó al 1% en medio fresco ABm, se creció hasta fase exponencial y se mezcló en proporción 1:1 con ABm sólido fundido (1% agar), el cual se mantuvo a 50 °C previo al experimento. Se agregó X-Gal a 80 µg/ml y se mezcló. Se vertió la suspensión sobre la CCF (0.3 ml / cm²). Se incubó a 30°C por 20 h y se fotografió.

3.7. Construcción del Biosensor basado en el sistema de QS del tipo AI-1 de *A. ferrooxidans*

Para la construcción del biosensor se amplificó una región de 1400 pb río arriba del gen *afel* de *A. ferrooxidans*. El fragmento se clonó en el vector pGEM-T easy y posteriormente fue escindido mediante corte con la enzima de restricción *Nco*I. Este fragmento fue subclonado río arriba del gen *luc*, en el vector de fusión *pSP-luc+NF* (Promega®), linearizado con la enzima *Nco*I. El reportero resulta de la fusión transcripcional entre el promotor de *afel* y el gen *luc*. El promotor del gen *afel* incluye una secuencia palindrómica que se postula como región de unión de AfeR (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). Divergente al gen *luc*, el reportero incluye a *afeR*, el cual fue clonado con su propio promotor, esperando una expresión basal. El plasmidio utilizado como control negativo se construyó utilizando la misma estrategia que en el biosensor, pero el fragmento clonado corresponde a la zona promotora de *afel* y carece de *afeR*. Se denominó *pΔRafeluc* (Fig. 2). La orientación de los fragmentos en el vector se verificó mediante PCR en colonias (Fig. 2). La identidad del fragmento del biosensor se confirmó por secuenciación en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, dirigido por el Dr. Victor Cifuentes (ver anexo). Paso siguiente, la cepa DH5α de *E. coli*, no productora de AHL, fue transformada con cada uno de las construcciones

por separado. La cepa recombinante obtenida con el plasmidio sensor fue llamada DH5 α -*pafeluc*.

3.8. Ensayo del biosensor DH5 α -*pafeluc*

Las cepas reporteras fueron crecidas en medio LB-amp hasta el inicio de la fase exponencial ($D.O_{600} = 0.3-0.4$), se diluyeron hasta una D.O de 0.1 y se alicuotaron en porciones de 200 μ l en tubos de 1.5 ml. Se agregaron como inductores estándares de AHLs. Se probaron AHLs sintéticas sin sustituir con largo de cadena variable: C4, C6, C8, C10 y C12. Para el control negativo de inducción se agregó sólo el solvente. La incubación se realizó durante tiempos variables a 37°C con agitación de 140 rpm. Para realizar las mediciones se agrega la cepa reportera inducida a una placa de 96 pocillos y luego, medio LB con luciferina. La actividad luciferasa es medida y registrada por la intensidad de luminiscencia generada con el Luminómetro (Guilliani y col., 2001). Para los ensayos de cultivos mixtos, una vez crecido y diluído el biosensor hasta una $D.O_{600} = 0.2$ y se mezcló en proporción 1:1 con la cepa a co-cultivar. Cada muestra fue analizada en duplicado y cada experimento fue repetido al menos tres veces.

Los controles negativos utilizados fueron el plasmidio sin el gen *afeR* y el plasmidio pSPNF+ con el inserto utilizado de la región génica que contiene desde *afeR* hasta la zona promotora de *afel*, pero clonado en dirección opuesta a la del biosensor.

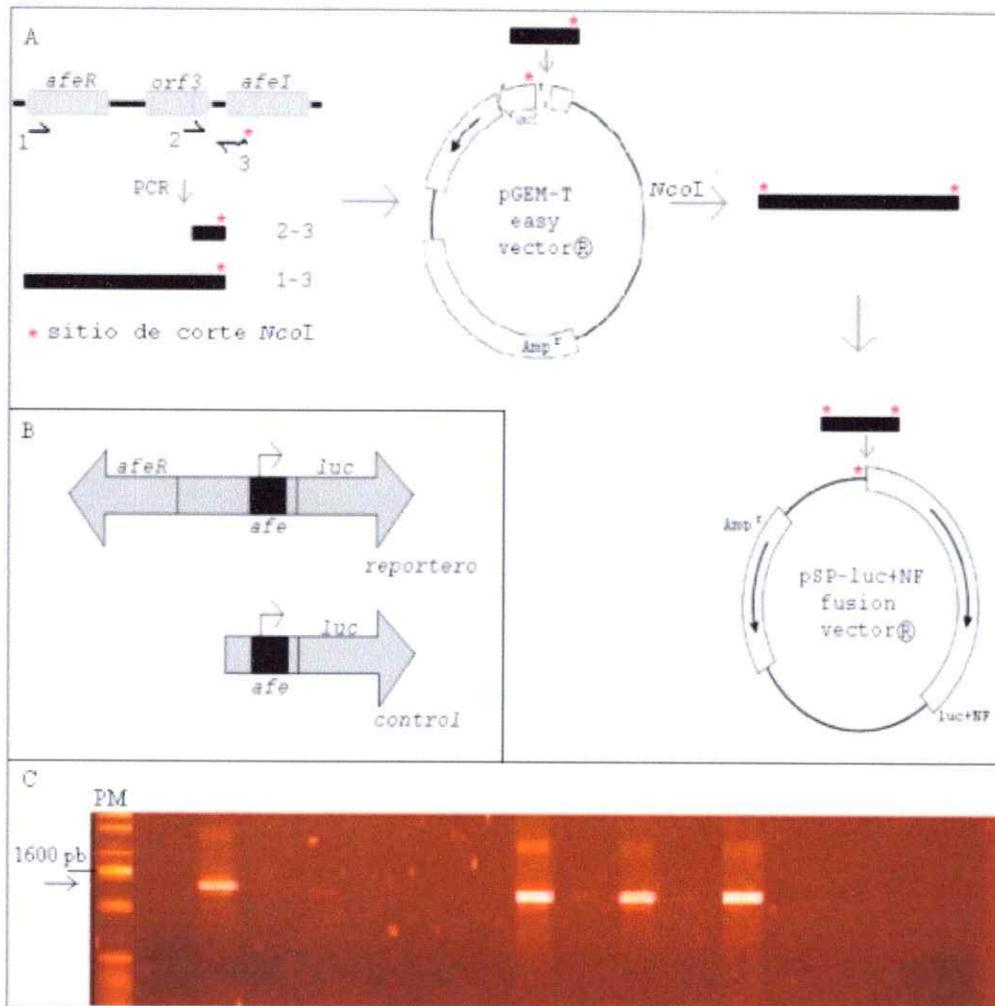


Figura 2. Desarrollo del biosensor DH5 α -*pafeluc*. A, estrategia experimental. Mediante PCR se amplificaron los fragmentos correspondientes a las construcciones control (partidores 2-3) y sensor (partidores 1-3). Estos fragmentos fueron clonados en el vector pGEM-T easy donde adquirieron un segundo sitio de restricción *NcoI* (asterisco rojo) que permitió subclonarlos en el vector pSP-luc+NF. B, Esquema de las fusiones transcripcionales generadas. C, Selección de los clones positivos mediante PCR en colonias. La flecha indica la banda esperada de 1500 pb. PM, estándar de Peso Molecular Invitrogen® 1 kb.

3.9. Análisis *in silico* de secuencias y comparación con bases de datos

Las secuencias aminoacídicas de las distintas proteínas I se obtuvieron de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los alineamientos de secuencias aminoacídicas de las proteínas I se realizaron con el programa CLUSTAL W

(<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu/multi-align/Options/clustalw.htmlbeauty>) y se pintaron posteriormente en cajas de acuerdo a su identidad y similitud mediante el uso del programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

La comparación con bases de datos de las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio se realizó mediante BLAST utilizando el programa BLASTx, que traduce para los 6 marcos de lectura posibles y los comparó con la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Para la búsqueda bioinformática de genes del locus I/R presentes en microorganismos del drenaje ácido de una mina, se utilizó la secuencia disponible de la comunidad ubicada en el sitio http://www.ncbi.nih.gov/sutils/blast_table.cgi?taxid=256318&taxidinf=environ_info, desde el cual se puede realizar directamente el alineamiento (Tyson y col., 2004)

4. RESULTADOS

4.1. Desarrollo de un biosensor de homoserina lactonas basado en el sistema de "Quorum Sensing" tipo AI-1 de *A. ferrooxidans*

Con el fin de obtener una herramienta rutinaria de detección de moléculas de AHLs en sobrenadantes de bacterias mineras, nos propusimos desarrollar un biosensor de alta sensibilidad para AHLs producidas por *A. ferrooxidans*. El biosensor hasta ahora utilizado, *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), presenta una baja sensibilidad para AHLs hidroxiladas, las cuales son las más abundantes en AF23270.

El nuevo sistema se diseñó en base a la regulación de la expresión del gen reportero *luc* codificante para la luciferasa de luciérnaga, por los componentes del sistema de QS *afel/afeR* del mismo *A. ferrooxidans*. Escogimos el gen *luc* como gen reportero, ya que permite analizar la regulación del gen en tiempo real y de manera cuantitativa, utilizando el luminómetro como instrumento medidor.

El biosensor construido no produce AHLs, por lo que la actividad del promotor sólo puede ser inducida con AI-1 exógeno.

4.1.1. Bioensayos

Para los ensayos efectuados con el biosensor se cuantificó la expresión del gen *luc* codificante para la luciferasa de luciérnaga en respuesta a diferentes inductores del sistema.

4.1.1.1. Validación experimental de las construcciones

Para validar nuestro biosensor, se realizó un ensayo con un cultivo mixto. La cepa biosensora DH5 α -*pafeluc* se inoculó a una D.O.₆₀₀ = 0.1 y en proporción 1:1 con la cepa BL21 (DE3) *pafel*, la cual expresa de manera heteróloga la sintasa AfeI y es sobreproductora de AHLs. Como control negativo se realizó un co-cultivo del biosensor con la cepa BL21 (DE3) *p15*, quien expresa una proteína rodanasa de manera heteróloga, la cual no está involucrada en procesos de QS.

La señal obtenida para el cultivo mixto con la cepa productora de AHL superó por aproximadamente 5 veces el control negativo, lo cual establece una diferencia significativa entre ambos cultivos (Fig. 3).

El cultivo mixto del biosensor junto con la cepa productora de AHLs comprueba el rol activador de AfeR sobre el promotor de *pafel*, tal cual lo esperado según otros homólogos (Egland y Greenberg, 2000; Fuqua y col., 1996) y el mismo AfeR (Rivas y col., 2005).

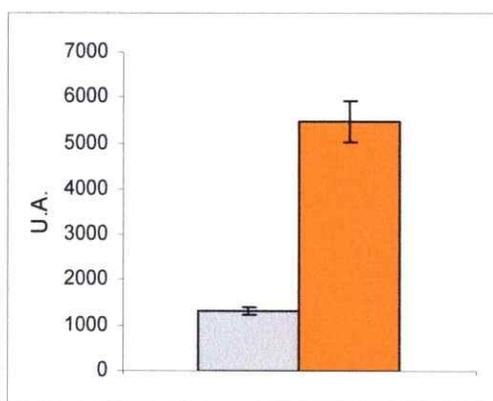


Figura 3. Efecto del crecimiento en cultivo mixto de la cepa biosensora DH5 α -*pafeluc* junto a las cepas *E. coli* BL21 (DE3) *p15* (barra gris) y *E. coli* BL21 (DE3) *pafel* (barra naranja), luego de 180 min de incubación.

Este ensayo del cultivo mixto resulta sencillo y rápido al probar la producción de AHL por potenciales proteínas sintetas expresadas heterológamente en *E. coli*.

4.1.1.2. Estudio de la especificidad y sensibilidad de DH5 α -*pafeluc*.

El estudio de especificidad del biosensor se determinó mediante la utilización de estándares sintéticos de AHL sin sustituir en un rango del largo de la cadena acil entre 4 y 12 carbonos (materiales y métodos). El biosensor logró detectar todas las AHL analizadas a concentraciones de 1 μ M (Fig. 4) y 5 μ M (resultado no mostrado).

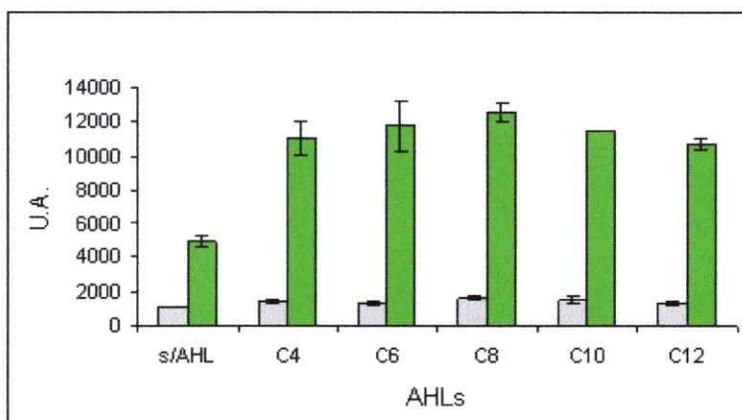


Figura 4. Estudio de la especificidad del biosensor DH5 α -*pafeluc*. Se cuantificó la actividad luciferasa en la cepa biosensora DH5 α -*pafeluc* (barras verdes) y en su control negativo DH5 α -*p* Δ *Rafeluc* (barras grises), luego de la adición de AHLs de largos de cadena variables, luego de 180 min de incubación. Las AHLs se utilizaron a una concentración final de 1 μ M.

Determinamos también la respuesta del biosensor ante la adición de concentraciones variables de dos AHLs diferentes: la C8-AHL, quien mostró en experimentos previos una mayor afinidad por el biosensor, y la C12-AHL, la cual corresponde a una de las AHLs producidas por la proteína Afel. Para ambos casos,

el biosensor logró detección en un amplio rango de concentración. La respuesta, sin embargo, mostró una curva de saturación a concentraciones de AHL sobre 5 μM . Al agregar cantidades superiores a esta concentración se observó una inhibición en la producción de luz. Este fenómeno se ha observado en otros biosensores que utilizan genes dependientes del complejo AHL-R para su activación, pero no se sabe su causa (Wagner-Dobler y col., 2005) (Fig. 5).

Para el caso del control negativo con el inserto al revés no se obtuvo señal de luminiscencia significativa en ningún caso (resultados no mostrados). El control negativo $p\Delta\text{Rafeluc}$ emite una cantidad de luz menor, atribuible a la expresión basal del promotor de *afel*.

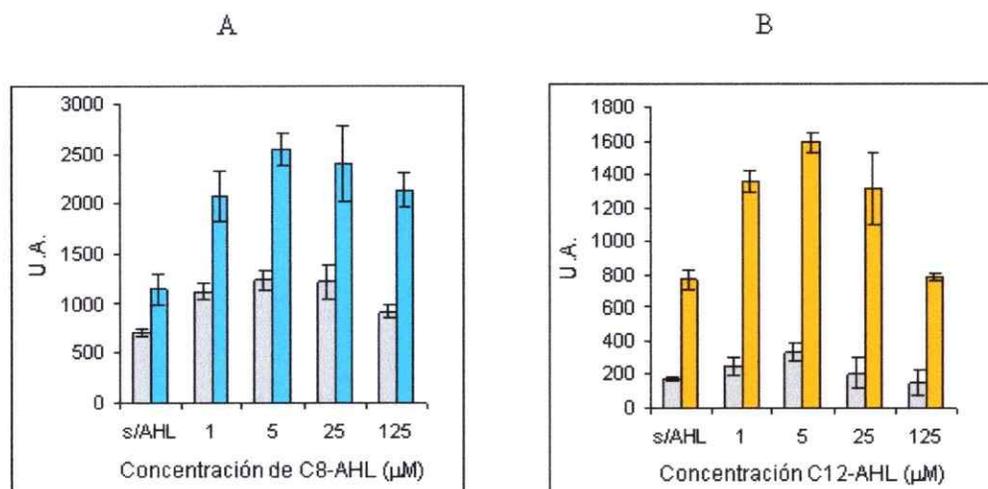


Figura 5. Análisis de la sensibilidad del biosensor $\text{DH5}\alpha\text{-pafeluc}$. Se cuantificó la actividad luciferasa en la cepa biosensora $\text{DH5}\alpha\text{-pafeluc}$ (barras de color) y en su control negativo $\text{DH5}\alpha\text{-p}\Delta\text{Rafeluc}$ (barras grises), ante la adición de C8-AHL (A) y C12-AHL (B) en un rango de concentraciones desde 1 a 125 μM , luego de 240 min

Finalmente, se realizaron ensayos del biosensor inducido con extractos de AHLs de sobrenadante de *A. ferrooxidans*, sin embargo, en estos ensayos no se lograron detectar las AHLs presentes. Este resultado impidió la utilización de esta herramienta como biosensora de posibles AHLs presentes tanto en sobrenadantes de *A. ferrooxidans* como en sobrenadantes de diferentes bacterias mineras.

No se pudieron realizar ensayos con AHLs hidroxiladas, Als predominantes en *A. ferrooxidans*, ya que no están disponibles comercialmente, además la bacteria presenta una concentración muy baja de estas moléculas en su sobrenadante, aproximadamente 100 pM (Guiliani, comunicación personal), lo cual dificulta la acumulación de cantidades suficientes.

Fundamentalmente, la limitación del biosensor construido radicó en la interferencia causada por la emisión basal de luz que manifiesta el biosensor, aun en ausencia de inductor. En el caso de la medición de C12, a una concentración de 1 μ M, el biosensor superó a la barra control sin inductor en una proporción variable entre 1.3 y 2.2 veces. Para el caso de la medición de la misma C12 a una concentración final de 5 μ M la proporción varió entre 1.3 a 5.3 veces. El hecho que en algunos ensayos, la proporción entre la medición de alguna AHL y el control sin inductor fuera tan cercana a 1 hizo muy complicada la medición de manera rutinaria. En nuestro caso, las concentraciones de AHL con que se trabajó, variaron desde 0.2 μ M hasta 125 μ M, lo que equivale en cantidades de moléculas de AHL a un rango entre 40 pmoles hasta 25 nmoles. Para el caso del biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4), el rango de cantidades mínimas de AHL detectadas de manera rutinaria, varía de acuerdo a la afinidad que tenga la proteína R por cada una, por lo que es específico para cada molécula. Esta variación oscila en un rango entre 0.03 pmoles y 1.2 nmoles para las AHL que los autores lograron detectar (Shaw y col., 1997). En el caso de otro biosensor similar a estas construcciones pero basado en *P. putida*, llamado *P. putida* F117 (pRK-C12) (Wagner-Dobler y col., 2005), los límites inferiores de detección determinados varían entre 23.5 nmoles y 2.9 nmoles, según la afinidad que tenga éste mismo por la AHL. Por ende, los niveles de sensibilidad de nuestro biosensor son similares o mejores a los de otras construcciones descritas. Sin embargo, la reproducibilidad de la proporción que

existe entre la emisión de luz por parte del reportero inducido con respecto al control negativo sin inducir, no nos permitió considerar los resultados desde un punto de vista cuantitativo. Además, al trabajar a concentraciones sobre 25 μM , la interferencia es aún más crítica, ya que como se comentó anteriormente, a cantidades elevadas de AHL a detectar, la señal disminuye.

La presencia en *E. coli* del gen *sdiA* es un elemento que puede dar cuenta de la elevada emisión basal de luz del biosensor sin inducir. Aunque varios son los reporteros de QS construidos en *E. coli*, por ser no productora de AHLs, la presencia del gen *sdiA* ha sido descrita recientemente en esta bacteria y en *Salmonella sp.* (Lindsay y Ahmer, 2005) y se reporta que afecta mediciones de ciertos biosensores basados sistemas de QS del tipo AI-1. El gen *sdiA*, codifica para SdiA, proteína homóloga a AfeR. SdiA es capaz de activar, por ejemplo, el biosensor basado en RhIR e interfiere en las mediciones efectuadas. La presencia de un gen *sdiA* en la cepa huésped activa fuertemente al promotor de *rhlI*, y la adición de AHLs exógenas sólo logra incrementar la expresión del reportero en el doble o triple de la expresión basal. SdiA estaría activando al promotor de *rhlI* a un nivel tan alto que sólo en presencia de C4 a una concentración mínima de 100 μM , se lograría activar el biosensor, sobre el nivel basal. Basado en los estudios realizados, se cree que la inducción del reportero en *E. coli*, es muy elevada, incluso en ausencia de AHLs, debido a la presencia del gen *sdiA*. Es así como en la cepa mutante *sdiA-*, el sistema reportero logra ser mucho más efectivo, obteniendo una señal de 53 veces sobre la expresión basal con C4 a 1 μM y 913 veces con C4 a 100 μM , por consecuencia, la presencia de este gen en el biosensor puede afectar negativamente nuestras mediciones y se hace necesario evaluar el comportamiento del mismo en ausencia de éste.

4.2. Caracterización del sistema de QS del tipo AI-1 en otras bacteria mineras

Hasta la fecha, se ha descrito un sistema de QS del tipo AI-1, solamente en la cepa AF23270 (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). Sin embargo los microorganismos involucrados en biolixiviación conforman un consorcio bastante más amplio.

Dado la importancia que pueden tener estos mecanismos de comunicación en el desarrollo de biopelículas, se pretende dilucidar si otras bacterias mineras cuentan con sistemas de QS. Los microorganismos sujetos a estudio comprenden cepas de colección de las especies *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* (Tabla1). Las tres especies a estudiar son bacterias Gram-negativas, por lo que la búsqueda se enfocará en caracterizar componentes del sistema QS del tipo AI-1, el cual está descrito como el mecanismo fundamental de comunicación en esta clase de bacterias (Bassler, 2002).

4.2.1. Análisis de la producción de AHLs

Con el fin de caracterizar las posibles AHLs que puedan encontrarse en sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* se utilizó el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) y/o la técnica de HPLC acoplado a espectro de masas (Morin y col., 2003).

Los ensayos ejecutados con el biosensor, se realizaron mediante la adición de una capa de cultivo de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) sobre una CCF que previamente había separado una muestra de extracto de sobrenadante. La cepa biosensora consta de un plasmidio que cuenta con una fusión *traG::lacZ*, el cual

requiere para su activación tanto a TraR como a moléculas de AHLs activas. La cepa utilizada no sintetiza sus propios AIs, pero puede ser inducida con AHLs exógenas. Las locaciones a las cuales migra un compuesto activo en la CCF mostraron una zona azul, resultado de la hidrólisis del X-Gal en el medio por la β -galactosidasa expresada desde la fusión reportera *traG::lacZ*.

La espectrometría de masas, se utilizó para conocer la identidad de señales obtenidas. Esta técnica analítica instrumental presenta una alta sensibilidad y es capaz de identificar cuali y cuantitativamente, y de forma inequívoca, cualquier tipo de sustancia. Asimismo permite también determinar la masa molecular de un compuesto, así como de los diversos fragmentos que resultan de la rotura controlada del mismo dándonos una información muy valiosa sobre la estructura de la molécula.

En los extractos de las cepas 2391 y 2705 de *L. ferrooxidans* analizadas no logramos detectar ninguna señal del tipo AHL, ya sea mediante el ensayo con *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) o por la técnica de HPLC acoplado a espectro de masas.

Para la caracterización de AHLs en las cepas 504, 9463 y 11478 de *A. thiooxidans* se lograron detectar 2 señales inductoras del sistema biosensor de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en cultivos de tiosulfato y azufre crecidos hasta la fase estacionaria (Fig. 6). La primera señal observada presenta un Rf de 0.39 (Fig. 6) y se encuentra presente en extractos pertenecientes a las tres cepas analizadas. Esta señal apareció en cantidades similares para las cepas AT504 y AT9463. La cepa AT11478 fue productora de mayores cantidades. Según el Rf calculado, esta señal, corresponde a una 3-Oxo-C8-AHL, cuyo Rf teórico es 0.41. La segunda señal presenta un Rf de 0.65 y sólo esta presente en la cepa AT11478 (Fig. 6). Esta señal probablemente corresponde a una 3-Oxo-C6-AHL la cual tiene un Rf teórico

de 0.68. Importante es destacar que ambas señales muestran un perfil de migración de gota invertida, el cual está descrito para moléculas de AHL con sustitución tipo Oxo-C3 (Shaw y col., 1997), a diferencia del perfil de migración redondo que presentan las AHLs sin sustituir, lo que sustenta la hipótesis de la identidad Oxo-AHL de las moléculas detectadas.

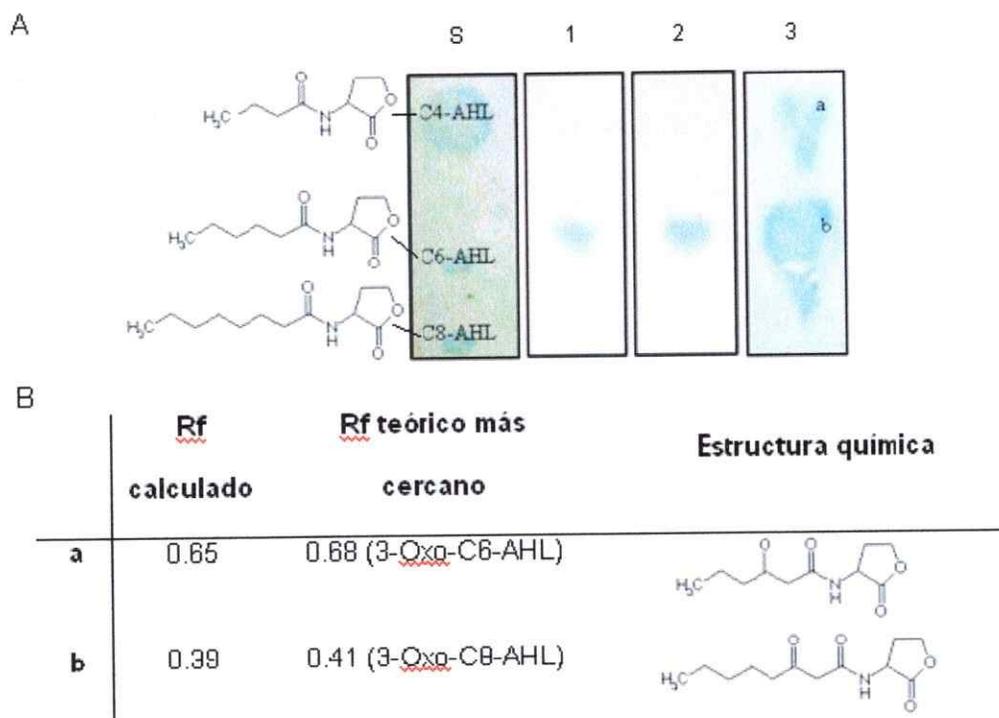


Figura 6. A, Análisis de las AHLs producidas por las diferentes cepas de *A. thiooxidans* en fase exponencial tardía. Se extrajeron AHLs desde el sobrenadante de cultivos de las cepas AT504 (1), AT9463 (2) y AT11478 (3). Estos extractos fueron analizados por CCF y revelados por el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en presencia de un estándar de AHLs (S) que contenía C4, C6 y C8 AHL. Se identificaron dos señales. Una exclusiva de la cepa AT11478 de Rf = 0.65 (a) y una común a las tres cepas analizadas de Rf = 0.39 (b). B, Comparación de Rf experimental con Rf teóricos de las moléculas identificadas y su posible estructura química.

Con el fin de precisar con exactitud la estructura de las señales identificadas en extractos de *A. thiooxidans*, se analizaron extractos de sobrenadantes de cultivo mediante HPLC acoplado a espectro de masas. Este ensayo no arrojó resultados positivos, por ende no permitió determinar con precisión las estructuras de las

moléculas caracterizadas por el reportero. Este resultado fue el mismo independiente de la fase de crecimiento y del volumen de cultivo de *A. thiooxidans* utilizado para producir los extractos, el cual osciló entre 200 y 600 ml.

Para la búsqueda de la producción de AHLs por otras cepas de *A. ferrooxidans* diferentes a la cepa modelo AF23270 se lograron caracterizar AHLs en el sobrenadante de cultivo de todas las cepas examinadas. El análisis se efectuó mediante HPLC acoplado a espectro de masas. Este ensayo permitió identificar cada una de las AHLs producidas y definir la proporción de cada una dentro de un mismo grupo de sustitución. Los resultados revelaron un patrón diferente de AHLs para cada bacteria (Tabla 4). En todas las cepas predominaron las AHLs hidroxiladas, al igual que en la cepa AF23270 (Farah y col., 2005), y la OH-C14 fue la más abundante. Además, se lograron caracterizar AHL sin sustituir en 2 cepas. No se detectaron Oxo-AHLs al contrario de lo obtenido en la cepa AF23270.

4.2.2. Búsqueda de los genes *I* y *R*

Para la búsqueda de los genes *I* y *R* en cepas biomineras se desarrollaron diferentes estrategias con el fin de ampliar las posibilidades de éxito. Las técnicas desplegadas incluyen reacciones de PCR, CODEHOP-PCR y Southern Blot. Finalmente, se realizó una búsqueda bioinformática en la base de datos de secuencias nucleotídicas de microorganismos biolixivantes aislados desde una comunidad presente en aguas ácidas del drenaje minero (Tyson y col., 2004). Para la comparación de secuencias mediante bioinformática, además de la búsqueda de genes codificantes para proteínas homologas a proteínas tipo *I* y *R*, se buscaron marcos de lecturas abiertos codificantes para las proteínas HdtS y LuxLM con el fin de extender la búsqueda de posibles sintasas de AHLs presentes en la comunidad biominera.

Tabla 4. Caracterización de las AHLs presentes en el sobrenadante de cultivo de diferentes cepas de *A. ferrooxidans*.

Cepas	AHL ^a		OH – AHL ^a				
	C12	C14	C8	C10	C12	C14	C16
AF583	1	2.3	1	4.7	12.7	60.6	8.3
AF1927	ND	ND	ND	T	1	6.1	T
AF9464	ND	ND	1	6.5	10.9	87.4	5
AF19859	1.6	1	1	2.4	7.3	31.1	1.8
AF33020	ND	ND	ND	ND	1	14.4	2

a, se expresan en valores relativos tomando como 1 el valor más bajo para cada familia de AHL y cada cepa. T, trazas; ND, no detectada.

4.2.2.1. Extracción de DNA genómico de diferentes bacterias involucradas en procesos de biolixiviación.

Se realizó la extracción de DNA cromosómico de todas las cepas (Tabla 1). Luego de la extracción se cuantificó el DNA y se ajustó a una concentración de trabajo de 40 ng/μl para los ensayos de PCR.

La calidad de los diferentes DNA genómicos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 7). La obtención de una banda de tamaño superior a 12 Kb comprobó la integridad del DNA genómico.

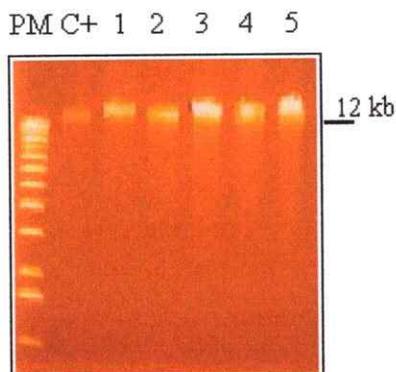


Figura 7. Análisis de la integridad física de los diferentes DNA genómicos purificados. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% cargando 2 μ l de cada solución de DNA genómico de AF23270 (C+), AT504 (1), AT9463 (2), AT11478(3), LF2391 (4) y LF2705 (5). PM, estándar de Peso Molecular Invitrogen® 1 kb.

4.2.2.2. Búsqueda de genes homólogos a *afeI* y *afeR* mediante PCR en cepas biomineras.

Como primera estrategia para identificar algún gen involucrado en el sistema de QS en bacterias mineras, se intentó amplificar homólogos de los genes *afeI*, *afeR* y *orf3*, de la cepa AF23270. Para este fin se utilizaron los partidores diseñados en base a la secuencia del DNA genómico de la cepa AF23270, para amplificar dichos genes (Tabla 2). Esta estrategia fue descrita anteriormente para evaluar la conservación del operón *ars* en microorganismos pertenecientes a la comunidad biominera (Bronwyn y col., 2000). Las reacciones de PCR se realizaron con una T_m menor que la utilizada en AF23270, con el fin de disminuir la especificidad de unión de los partidores. Se inició con una T_m de 45°C, la cual se incrementó consecutivamente, hasta llegar a 55°C.

En las cepas AT9463 y AF19859, se amplificaron fragmentos de tamaños similares al obtenido con la cepa AF23270 para el gen *afeI* y para el gen *afeR*, respectivamente (Fig. 8). Se secuenciaron ambos productos de PCR y se analizaron los resultados por tBlastx y Blastx. La secuencia del fragmento

amplificado desde la cepa AT9463, no coincidió con ninguna proteína bacteriana conocida. Para el caso de la amplificación desde el DNA genómico de la cepa AF19859, la secuencia obtenida fue 100% idéntica al gen *afeR* presente en AF23270.

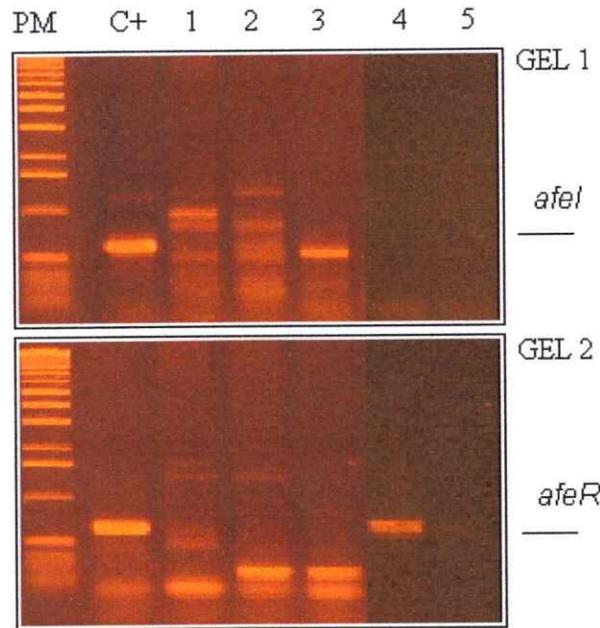


Figura 8. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos durante la búsqueda de los genes homólogos a genes *afeI* y *afeR* en diferentes bacteria mineras. Se analizaron 10 μ l de cada reacción de PCR efectuado con los DNA genómicos de las cepas, AT504 (1), AT11478 (2), AT9463 (3), AF19859 (4) y AF33020 (5). El DNA genómico de la cepa AF23270 fue utilizado como control positivo (C+). PM, estándar de Peso Molecular Invitrogen® 1 kb.

4.2.2.3. Búsqueda de genes codificantes para la proteína I, mediante CODEHOP-PCR

Los resultados obtenidos en el experimento anterior, sugieren que las secuencias nucleotídicas no están tan conservadas. Por lo tanto, como segunda estrategia para identificar genes del tipo I se utilizó la técnica de CODEHOP-PCR,

la cual se emplea para identificar genes entre especies no estrechamente relacionadas (Rose y col., 1998). Utilizar partidores de carácter degenerado aumenta la probabilidad de éxito, debido a que el pool de partidores con que se intenta la amplificación presenta una mayor cantidad de moléculas diferentes. Cabe destacar que este ensayo se realizó sólo con el gen I ya que la proteína I presenta un mayor grado de conservación con respecto a la proteína R en su secuencia aminoacídica (Fuqua y col., 1996).

Para el diseño de los partidores se realizó un alineamiento múltiple de Afel de la cepa de *A. ferrooxidans* 23270 con secuencias aminoacídicas de las proteínas I pertenecientes a *B. pseudomallei*, *R. solanacearum* y *P. aeruginosa* (Fig. 9).

Estas tres bacterias corresponden a las especies que presentan mayor similitud a nivel aminoacídico al comparar la secuencia de la proteína Afel con todos los homólogos conocidos existentes en otras bacterias. Esta similitud, dista de la que pueda existir entre genomas completos, ya que la subdivisión a la que pertenece cada una no es coincidente. *B. pseudomallei* y *R. solanacearum* pertenecen al subgrupo Beta de proteobacterias y *P. aeruginosa* al igual que *A. ferrooxidans* al subgrupo Gamma. Se descartaron para el análisis las especies pertenecientes al mismo género, para aumentar la representatividad del análisis. De todas formas, el bajo grado de similitud de las proteínas I en el reino Bacteria no permitió utilizar secuencias de más microorganismos para el alineamiento, dado que al hacerlo no se obtenían bloques conservados con los cuales poder realizar el diseño de los partidores. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW y los bloques de secuencia conservados se ubicaron con el programa Block Maker (materiales y métodos).

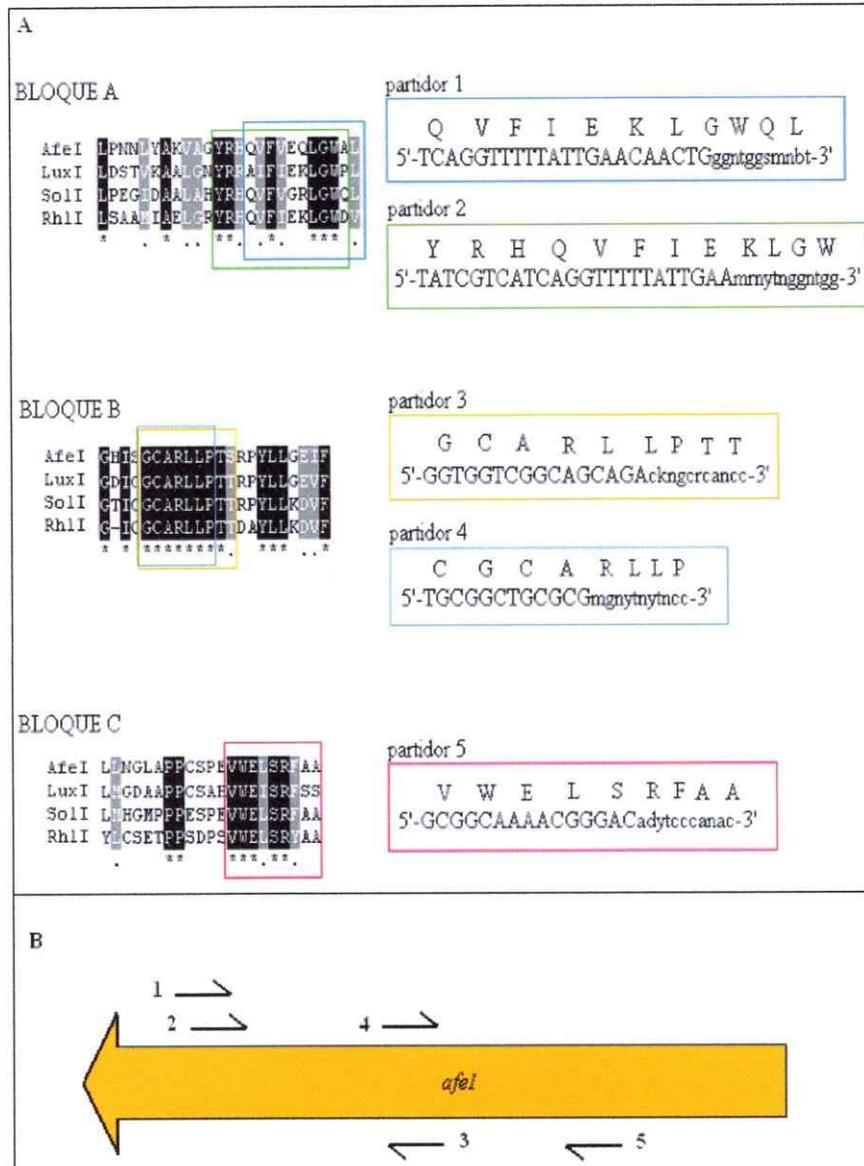
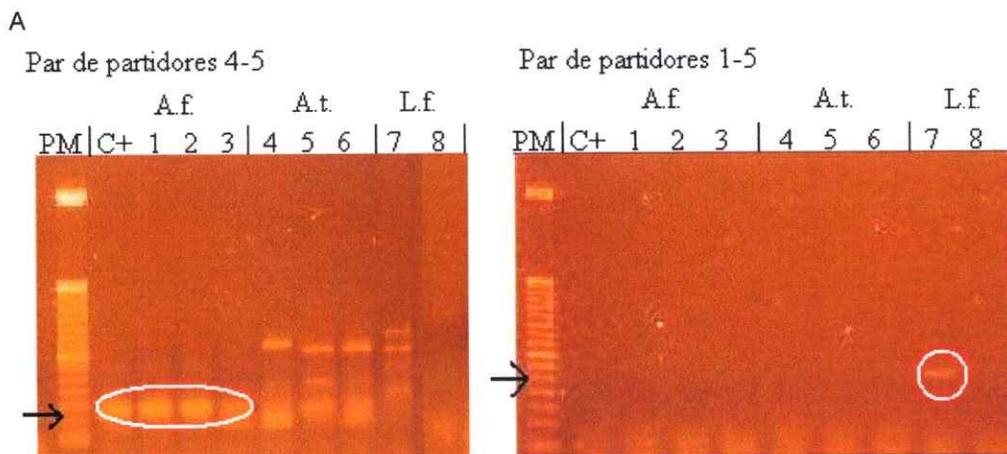


Figura 10. A, Bloques conservados de las secuencias aminoácidas de las proteínas I utilizados en el diseño de partidores CODEHOP-PCR. Los diferentes colores ilustran la ubicación de los partidores directos (morado, verde y azul) y reversos (amarillo rojo). B, Esquema del gen *afeI* de AF23270 y representación de las combinaciones posibles empleadas con los partidores CODEHOP diseñados.

De las cinco combinaciones utilizadas, se obtuvo amplificación solamente con tres pares: 4-5, 1-5 y 2-5 (Fig. 11). Los fragmentos de DNA fueron purificados, clonados en el vector pGEM-T easy y luego secuenciados.



B

Cepa	Identidad con Afel de AT23270
AF 1927	65%
AF 9464	100%
AF 19859	97%
AF 33020	48%
LF 2391	No presenta identidad

Figura 11. A, Electroforesis de los productos de CODEHOP-PCR obtenidos durante la búsqueda de los genes homólogos a genes *afel* en diferentes bacterias mineras. Se analizaron 10 μ l de cada reacción de CODEHOP-PCR efectuado con los pares de partidores 4-5 y 1-5. Como molde se utilizó el DNA genómico de las cepas AF23270 (C+), AF9464 (1), AF19859 (2), AF33020 (3), AT504 (4), AT9463 (5), AT11478 (6), LF2391 (7) y LF2705 (8). Las flechas indican el tamaño esperado en la cepa AF23270. Se encierran en círculos blancos los fragmentos clonados y secuenciados. PM, estándar de Peso Molecular Invitrogen® 1 kb. B, resumen de los resultados obtenidos en las secuenciaciones del CODEHOP-PCR.

El par 4-5 logró amplificar un fragmento interno del gen *afel* en la cepa control AF23270. Este par, utilizado con los DNA genómicos de las otras cepas de *A. ferrooxidans* logró amplificar fragmentos 250 pb correspondientes al tamaño obtenido con la cepa AF23270. El análisis de las secuencias de los productos generados mediante tblastx arrojó la presencia del gen *l* en las cepas AF1927, AF9464, AF19859 y AF33020 con identidades a su homólogo en AF23270 de 65%,

100%, 97% y 48% respectivamente (Fig. 11). Este resultado sustenta la ubicuidad del sistema QS del tipo AI-1 en las diferentes cepas de *A. ferrooxidans*.

Tanto el par 1-5 como el 2-5 lograron amplificar un fragmento al utilizar el DNA genómico de la cepa LF2391. No se relacionó la secuencia con ningún gen homólogo a *l*.

4.2.2.4. Búsqueda de la presencia de proteínas tipo I mediante Southern Blot con sonda radioactiva de *afeI*

Se analizaron los DNA genómicos de las cepas de AF9464, AF19859 AF33020, AT504, AT9463, AT11478, LF2371 y LF2705. Los diferentes DNA genómicos fueron digeridos por las enzimas *EcoRI* y/o *HindIII*. Como control positivo se utilizó el DNA de la cepa AF23270 y el fragmento amplificado por PCR utilizado para generar la sonda. Los productos de digestión y el control de hibridación de sonda fueron separados mediante electroforesis y transferidos a una membrana de nylon, cargada positivamente. Luego se realizó la hibridación con la sonda marcada radiactivamente.

Inicialmente, se obtuvo una banda sólo para los controles positivos al utilizar 1 µg de DNA. Se aumentó la cantidad de DNA, primero a 3 µg y luego a 10 µg. Si bien se lograban ver bandas al utilizar 3 µg, los resultados fueron mas claros al digerir una mayor cantidad de DNA.

Con las cepas bacterianas de *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* no se obtuvo ninguna hibridación específica con la sonda (Resultados no mostrados).

Se logró obtener hibridación específica de la sonda con DNAs digeridos en las diferentes cepas de *A. ferrooxidans* (Fig. 12). El experimento de Southern Blot reveló la existencia de un fragmento de restricción *EcoRI* de 1300 pb y uno *HindIII*

cercano a las 12 kb. Ambos fragmentos corresponden a los tamaños esperados de a 1341 y 11676 pb respectivamente, determinado por los sitios de restricción presentes en el genoma secuenciado y anotado de la cepa AF23270. Las bandas obtenidas con *EcoRI* en las diferentes cepas de *A. ferrooxidans* presentan hibridación a la misma altura que el resultado obtenido para la cepa AF23270. La banda *HindIII* presenta pequeñas variaciones en la altura observada entre las diferentes cepas, lo cual es esperable, dado que el fragmento abarca una mayor cantidad de DNA y por ende tiene mayor probabilidad de incluir diferencias en la secuencia. El resultado obtenido sugiere que la organización física del locus QS del tipo AI-1 se encuentra conservada en las diferentes cepas de *A. ferrooxidans*, independiente del lugar de aislamiento.

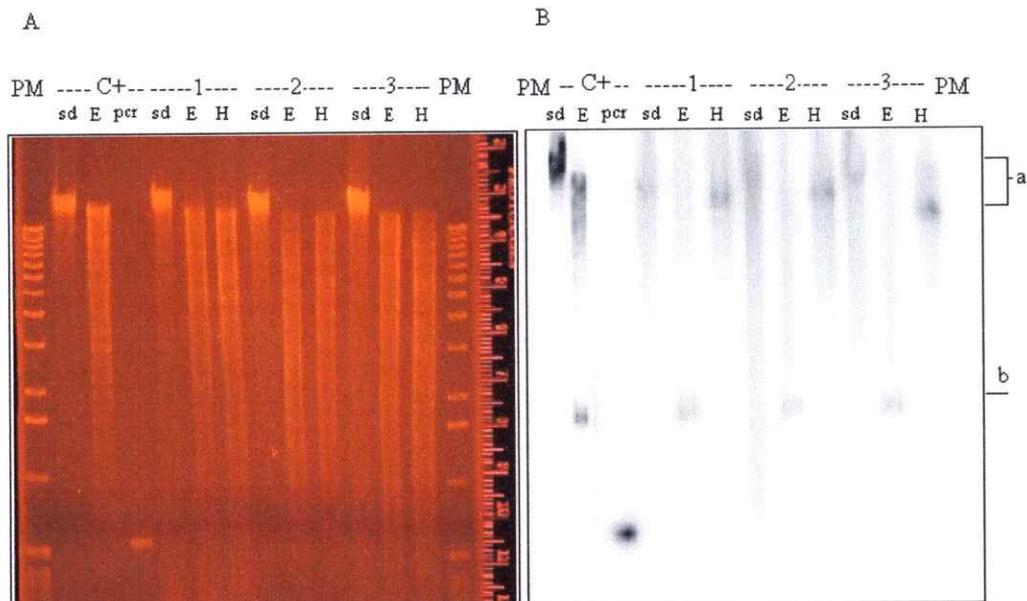


Figura 12. Experimento de Southern Blot utilizando la sonda heteróloga *afel* marcada con dCTP^{α32}. Se analiza la presencia de un gen *l* en los genomas de las cepas AF23270 (C+), AF9464 (1), AF19859 (2) y AF33020 (3). Los carriles contienen los DNA genómicos sin digerir (sd) y digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* (E) y *HindIII* (H). Como control positivo se utilizó el fragmento amplificado por PCR utilizado para generar la sonda marcada. Se identificó un fragmento *EcoRI* de 1300 pb y 2 fragmentos *HindIII*. PM, estándar de Peso Molecular Invitrogen® 1 kb.

4.2.2.5. Búsqueda bioinformática de genes involucrados en el QS en una comunidad presente en el drenaje de una mina.

Con el fin de ampliar la visión de la existencia de sistemas de QS del tipo AI-1 en microorganismos biomineros, se efectuó un análisis de la presencia de marcos abiertos de lectura codificantes para las proteínas I y R en una base de datos que de secuencias genómicas de microorganismos identificados en aguas ácidas del drenaje minero (Tyson y col., 2004). Esta base de datos contiene las secuencias completas del genoma de *Leptospirillum sp.* grupo II y de la arquea *Ferroplasma* tipo II y las secuencias parciales de los genomas de 4 microorganismos más, correspondientes al género *Sulfobacillus*, *Acidimicrobium*, *Leptospirillum sp.* grupo III y a un miembro de las archeas thermoplasmatales.

Nuestra búsqueda reveló la presencia de un locus QS del tipo AI-1, el cual contiene un homólogo al gen *R* y uno al gen *I*, en el microorganismo biominero *Leptospirillum sp.* grupo III, *IstR* y *IstI* respectivamente. Los genes *IstI* y *IstR* se encuentran separados por 1615 pb y orientados de manera convergente. En la región intergénica de estos genes se encuentra *orf2*, marco de lectura abierto, ubicado en la misma orientación que el gen *IstI* y que codifica para una proteína putativa que presenta un 21% de similitud con una transposasa identificada en *Bacillus halodurans* (Fig. 13). Río arriba de los genes *IstI* y *IstR*, encontramos dos marcos de lectura abiertos, *orf1* y *orf3*, (Fig. 13) que codifican para proteínas que presentan similitud con una fago integrasa y una proteína de la familia citocromo p450, respectivamente (Tabla 5).

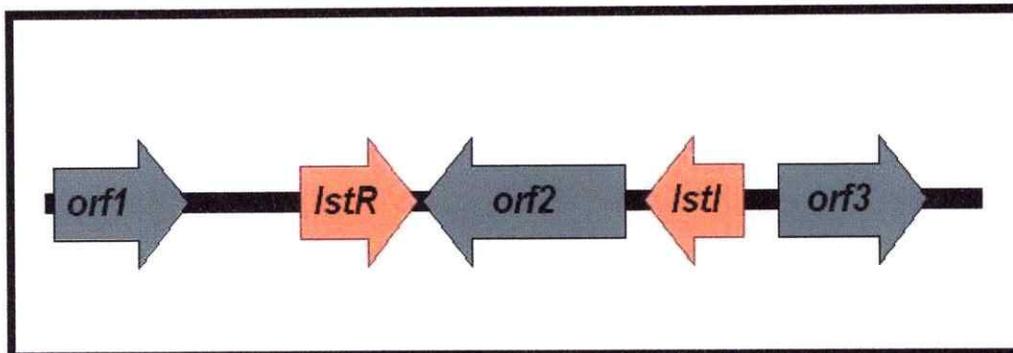


Figura 13. Representación del locus QS del tipo AI-1 identificado en *Leptospirillum sp.* grupo III encontrado mediante búsqueda bioinformática en secuencias de genomas presentes en el drenaje ácido de una mina.

Se realizó además la búsqueda de representantes de las otras dos familias de sintasas descritas, HdtS y LuxLM, pero no se encontró ninguno con una similitud significativa.

Tabla 5. Resumen del resultado obtenido en la búsqueda bioinformática de genes involucrados en el QS del tipo AI-1 en la base de secuencias de microorganismos presentes en biopelículas de drenajes ácidos mineros.

Marco de lectura abierto	Homólogo encontrado	Similitud (%)	Valor E
LstR	LuxR de <i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	50	3e-19
LstI	N-acil-L-homoserina lactona sintasa de <i>Geobacter uraniumreducens</i> Rf4	59	2e-42
Orf1	Fago integrasa de <i>Burkholderia vietnamiensis</i> G4	58	4e-52
Orf2	Transposasa de <i>Bacillus halodurans</i> C-125	42	9e-16
Orf3	Proteína familia citocromo P450 <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3	47	9e-23

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis sugieren que distintas bacterias involucradas en los procesos de biolixiviación poseen sistemas de QS del tipo AI-1. Mediante las diferentes técnicas empleadas se lograron identificar componentes del sistema de QS del tipo AI-1 en dos de las tres especies sujetas a estudio experimental, *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, y a una tercera especie, mediante técnicas bioinformáticas, *Leptospirillum* sp. grupo III.

Para *L. ferrooxidans* no se detectaron AHLs en su sobrenadante, ni la presencia del gen codificante para la sintasa del tipo I en su genoma, mediante las técnicas utilizadas. En el presente estudio se trabajó con las cepas LF2391 y LF2705, ambas actualmente clasificadas en el grupo I de *Leptospirillum* (Moreno-Paz y Parro, 2006). Bajo condiciones normales de crecimiento, estos cultivos alcanzan bajas densidades celulares, aproximadamente 10^7 cel/ml como máximo, además acumulan hierro (III) en forma de precipitado durante su crecimiento. Ambos hechos pueden ser determinantes en la búsqueda de AHLs. La presencia de un bajo número de individuos en el cultivo, impide suficiente acumulación de AHLs en el medio (Bassler, 2002). Para todos nuestros experimentos se utilizaron cultivos planctónicos. Estas condiciones de crecimiento, sin duda, son lejanas a las condiciones naturales de crecimiento en forma de biopelícula (Parsek y Greenberg, 2005). Por lo tanto es posible que nuestras condiciones experimentales no permiten la acumulación de un gran número de células en el medio, lo que puede desencadenar que la retroalimentación positiva a la que está sujeta la regulación de la expresión de la proteína I en otros microorganismos, incluyendo *A. ferrooxidans*, no se manifieste y por ende la síntesis de AHL no estaría siendo activada (Henke y Bassler, 2004). Cabe recordar que los cultivos de *Leptospirillum* sp. crecen hasta al

menos un orden de magnitud por debajo que otras cepas utilizadas como modelos del sistema QS como son *A. tumefaciens* o *P. aeruginosa*.

Por otro lado, se ha visto que en los cultivos crecidos en hierro de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 la acumulación de AHL es substancialmente menor que en cultivos equivalentes de azufre o tiosulfato (Farah y col., 2005). Existe evidencia que podría formarse un complejo entre el hierro (III) y la AHL, que inactivaría su función biológica y daría cuenta de la baja cantidad de AI encontrada en este tipo de cultivos (Kaufmann y col., 2005).

En las cepas analizadas de *A. thiooxidans*, se lograron identificar dos moléculas diferentes capaces de activar al biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). Estas señales probablemente corresponden a Oxo-AHLs, dada la cercanía del Rf calculado con el Rf teórico de las dos moléculas. Asimismo, la forma típica de migración de Oxo-AHLs en gota invertida (Shaw y col., 1997) se observó en ambos casos. Las moléculas no pudieron ser identificadas con la exactitud que otorga la técnica de HPLC acoplado a espectro de masas, posiblemente por la baja concentración de moléculas que se logra obtener de una extracción. El biosensor utilizado tiene una alta afinidad a Oxo-AHLs (Tabla 3) por ende para estos casos presenta una sensibilidad del orden de 0.03 y 0.0005 picomoles, mayor que la sensibilidad de la HPLC-MS, la cual detecta como mínimo picomoles. En ocasiones, los ensayos de HPLC acoplados a espectro de masas han vislumbrado trazas de AHLs, pero en cantidades muy bajas, por lo que no se pudo comprobar la identidad de las señales.

Tampoco se puede descartar la presencia de otro tipo de activador o regulador del sistema, lo cual podría dar cuenta de la activación de la transcripción del gen *lacZ* en el bioreportero. Los estudios de QS son incipientes en muchos aspectos y aun se describen nuevos componentes del sistema periódicamente. En *V. harveyi*, por ejemplo, se han descrito tres moléculas AI, que convergen en la regulación de

la bioluminiscencia. Uno de estos AI aún no está caracterizado (Waters y Bassler, 2006), por lo que encontrar moléculas nuevas participantes en el sistema parece un hecho absolutamente factible. Por ende podría ser que la molécula activadora no corresponda a una AHL "clásica".

En el caso de la identificación de genes codificantes para proteínas involucradas en QS del tipo AI-1, se optó por buscar homólogos a marcos abiertos de lectura codificantes para la sintasa de AHL del tipo I. Esta proteína presenta una mayor conservación entre sus residuos aminoacídicos que las proteínas de la familia R. Pese a esto, su grado de conservación oscila sólo entre un mínimo de 28% y un máximo de 34% (Fuqua y col., 1996). No obstante, la proteína presenta aminoácidos conservados a lo largo de toda su secuencia, lo cual permitió diseñar los partidores de carácter consenso degenerados (Fig. 12). La existencia de 3 o 4 aminoácidos conservados logra darle estabilidad a la unión del partidor con el DNA molde y por ende, mayores probabilidades de éxito en la amplificación. Con estos partidores se logró amplificar un fragmento del gen *I* en las cuatro cepas analizadas de *A. ferrooxidans* (Fig. 11). Este resultado coincide con lo obtenido al determinar el grado de conservación del operón *ars* en microorganismos presentes en la comunidad biominera, donde se utilizaron DNAs genómicos de cuatro cepas de *A. ferrooxidans*, una de *L. ferrooxidans*, una de *A. thiooxidans* y una de *A. caldus* (Butcher y col., 2000). En este estudio, al igual que en el nuestro se confirmó la ubicuidad de los genes en las cepas de *A. ferrooxidans*, pero no se encontraron los genes en las otras especies.

El resultado del experimento de la hibridación del DNA con una sonda heteróloga, se correlaciona con lo obtenido en las reacciones de PCR. Se identificó un fragmento de restricción *EcoRI* y uno *HindIII*, en las diferentes cepas de *A. ferrooxidans*, que además sugieren la conservación física del locus QS del tipo AI-1 en la especie.

Finalmente, con la búsqueda bioinformática de genes *I* y *R* en las secuencias completas y parciales de microorganismos presentes en aguas ácidas del drenaje de una mina, se encontraron homólogos de ambos genes en el genoma del microorganismo *Leptospirillum sp.* grupo III, *IstI* y *IstR*. La organización génica que presenta el locus QS identificado, comprendida por los genes *IstI* y *IstR* ubicados de manera convergente, y cercanos a genes codificantes para proteínas tipo transposasas ha sido descrita para otros locus QS presentes en diferentes bacterias (Williamson y col., 2005). Las proteínas *IstI* y *IstR*, además de presentar alta identidad con homólogos de *G. uraniumreducens*, mostraron también una alta identidad con homólogos de la beta proteobacteria, *Chromobacterium violaceum* (valor de $E = 2 \times 10^{-42}$ y $E = 4 \times 10^{-17}$ para *IstI* y *IstR*, respectivamente), quienes sintetizan y utilizan AHLs de cadena corta (McClellan y col., 1997). *A. ferrooxidans*, en cambio, produce AHLs de cadena medias o largas (Farah y col., 2005).

El genoma disponible de este *Leptospirillum sp.* tipo III se encuentra incompleto, sin embargo, la de otro miembro del género, *Leptospirillum sp.* grupo II, presenta su genoma completo secuenciado. En este microorganismo, no fue posible identificar genes del tipo *I* o *R*, ni siquiera al realizar el alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína *I* identificada para *Leptospirillum sp.* grupo III (Fig. 13). Tampoco, se identificaron homólogos en el genoma completo analizado de la arquea *Ferroplasma* tipo II. Hasta la fecha existe un único reporte de presencia de componentes de QS en arqueas, y corresponde al microorganismo *Natronococcus occultus* (Paggi y col., 2003). En el laboratorio, se han hecho búsquedas en el genoma de otras arqueas biomineras, como *Sulfolobus sp.*, obteniendo el mismo resultado negativo (Resultados no publicados).

La presencia de las proteínas del tipo *I* y *R* no se relaciona con la cercanía filogenética existente entre microorganismos. Proteínas con elevada similitud aparecen en grupos filogenéticos diferentes. Ejemplo de ello es el caso de las

proteínas I que se utilizaron para realizar el alineamiento múltiple, las cuales pertenecen a los subgrupos Beta y Gamma. Es así también como el marco abierto de lectura codificante para un homólogo de proteína I en *Leptospirillum sp.* grupo III, perteneciente al grupo Nitrospira, presenta un alto grado de similitud con una proteína I de *G. uraniumreducens*, perteneciente al grupo de proteobacterias y no se encontró, en cambio, una proteína I en *Leptospirillum* grupo II.

Los estudios sobre el rol que pueda tener el QS en las biopelículas es un tema incipiente en la investigación actual. Aún existen numerosos procesos de los cuales no se tiene información en relación con la asociación de estos fenómenos. Por ejemplo la determinación de los parámetros de una biopelícula que influyen en procesos de QS y por ende en los patrones de expresión génica que presenten los individuos embebidos en la comunidad. Tampoco tenemos claro si el rol del QS en la comunidad afectará la tasa de biolixiviación que muestren los individuos o su rol fisiológico en sí. Recién comienza también el estudio del área del QS en cultivos mixtos y si la comunicación inter-especie tiene realmente relevancia biológica. Existen especies bacterianas como *E. coli* y *Salmonella sp.* que pueden tener sólo el regulador transcripcional R, pero no la sintasa I (Lindsay y Ahmer, 2005), a los cuales se les atribuye un rol de receptores de señales AI producidas por otros individuos. El no haber encontrado sintasa en los *L. ferrooxidans* ni señales de AHL en su sobrenadante, por ende no puede cerrarnos a la posibilidad de que el tipo de combinación de componentes que presente este microorganismo es diferente y de todas maneras contenga el sistema. La combinación sobre los elementos de comunicación que puede existir en la comunidad puede ser múltiple y los resultados obtenidos en este estudio dan indicios fuertes que el fenómeno de comunicación está presente. Sin duda el camino hacia estas respuestas recién comienza y aún los fenómenos de comunicación bacteriana permanecen indescifrados.

6. CONCLUSIONES

Con la tesis realizada se lograron identificar señales o componentes involucrados en el sistema de QS del tipo AI-1 descrito fundamentalmente para bacterias Gram-negativas, en *A. thiooxidans* y *Leptospirillum sp.* grupo III. Además se determinó que el sistema QS del tipo AI-1 era ubicuo en *A. ferrooxidans* (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen resultados obtenidos para el presente estudio.

Microorganismo		AHL	I	R
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 23270	+ ^{a, b}	+ ^{c, d}	+
	DSMZ 583	+ ^b	ND	ND
	DSMZ 1927	+ ^b	+ ^{c, d}	ND
	DSMZ 9464	+ ^b	+ ^{c, d}	ND
	ATCC 19859	+ ^b	+ ^{c, d}	+ ^c
	ATCC 33020	+ ^b	+ ^{c, d}	-
<i>A. thiooxidans</i>	DSMZ 504	+ ^a	-	ND
	DSMZ 9463	+ ^a	-	ND
	DSMZ 11478	+ ^a	-	ND
<i>L. ferrooxidans</i>	DSMZ 2391	- ^{a, b}	-	ND
	DSMZ 2705	- ^{a, b}	-	ND
<i>Leptospirillum sp.</i>	Grupo III	ND	+ ^e	+ ^e

+, resultado positivo. -, resultado negativo. ND, no determinado. Pruebas realizadas mediante: a, ensayo en CCF. b, Espectro de masas. c, PCR. d, Southern Blot. e, bioinformática.

En *L. ferrooxidans* no fue posible identificar ningún componente del sistema experimentalmente, ni en *Leptospirillum sp.* grupo II, ni en *Ferroplasma sp.* tipo II mediante técnicas bioinformáticas. Tampoco se encontró la presencia de marcos abiertos de lecturas codificantes para HdtS o LuxLM en los genomas completos o

parciales de los microorganismos que conforman la biopelícula del drenaje ácido de una mina.

Nuestros resultados sugieren que una comunicación multidireccional entre las diferentes bacterias que conforman la comunidad biolixivante puede ocurrir.

Es necesario continuar la caracterización de los fenómenos fisiológicos que están regulados por el QS en la especie minera. Si bien el desarrollo de la biopelícula está regulado por el QS en otros microorganismos, aún no sabemos nada de la relación entre ambos en las bacterias biolixivantes.

El desarrollo de una estrategia de optimización del proceso de biolixiviación mediante el control del desarrollo de la biopelícula debe considerar la complejidad del fenómeno de comunicación que puede ocurrir en el consorcio bacteriano. Si existe la relación QS-biopelícula, la manipulación de los elementos de autoinducción abrirá una amplia gama de posibilidades de estudio para incrementar la eficiencia de la biolixiviación.

7. REFERENCIAS

- Arredondo R., García A. and Jerez C. A. (1994).** The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2846-2851.
- Bassler B. (2002).** Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell.* 109: 421-424.
- Bertani I. and Venturi V. (2004).** Regulation of the *N*-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing System in Rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5493-5502.
- Butcher B. G., Deane S. M. and Rawlings D. E. (2000)** The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1826-33.
- Campbell T. N. and Choy F. Y. (2001)** Large scale Colony Screening and Insert Orientation Determination using PCR. *Biotechniques.* 30: 32-34.
- Chilton M. D., Currier T. C., Farrand S. K., Bendich A. J., Gordon M. P. and Nester E. W. (1974).** *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 71: 3672-3676.
- Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO. (2005).** Política Minera del Bicentenario. www.mch.cl/documentos/pdf/Politca_Minera.pdf
- Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W. and Greenberg E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280: 295-98.
- Devasia P., Natarajan K. A., Sathyanarayana D. N. and Rao G. R. (1993).** Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4051-4055
- Egland K. and Greenberg P. (2000).** Conversión of the *Vibrio fischeri* Transcriptional Activator, LuxR to a Represor. *J. Bacteriol.* 182: 805-811.
- Evans, K., Passador L., Srikumar R., Tsang E., Nezezon J. and Poole K. (1998).** Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180: 5443-5447.
- Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez C. A. and Guilian N. (2005).** Evidence for a functional Quorum-Sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7033-7040.
- Fuqua C., Winans S. And Greenberg P. (1996).** CENSUS AND CONSENSUS IN BACTERIAL ECOSYSTEMS: The LuxR-LuxI Family of Quorum-Sensing Transcriptional Regulators *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 727-51.

- Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K. and Sand W. (2001).** The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water. Sci. Technol.* 43: 159-167.
- Goebel B. M. and Stackebrandt E. (1994).** Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1614-1621.
- Guiliani N., Casanova A., Demergasso C. y Jerez C. A. (2000).** Biosensor bacteriano para detectar el arsénico. Aplicación en el Norte de Chile. *Biol. Res.* 34: 3-4 RA26.
- Guiliani N. and Jerez C. A. (2000).** Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2318-2324.
- Henke J. and Bassler B. (2004)** Bacterial social engagements. *TRENDS Cell Biol.* 14: 648-656.
- Horng Y. T., Deng S. C., Daykin M., Soo P. C., Wei J. R., Luh K. T., Ho S. W., Swift S., Lai H. C. and Williams P. (2002).** The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent Quorum Sensing in *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* 45: 1655-1671.
- Kaplan, H. B. and Greenberg E. P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163:1210-1214.
- Kaufmann G., Sartorio R., Lee S., Rogers C., Meijler M., Moss J., Clapham B., Brogan A., Dickerson T. And Janda K. (2005).** Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-Oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 102: 309-314.
- Kiratisin P., Tucker K. and Passador L. (2002).** LasR, a Transcriptional Activator of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes, Functions as a Multimer. *J. Bacteriol.* 184: 4912-4919.
- Lewenza S., Visser M. B. and Sokol P. A. (2002)** Interspecies communication between *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 48: 707-716.
- Lindsay A. And Ahmer B. (2005)** Effect of *sdia* on Biosensor of N-acylhomoserine lactones. *J. Bacteriol.* 187: 5054-5058.
- Llamas I., Keshavan N. and Gonzalez J. (2004).** Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of Long-Chain N-Acyl homoserine lactones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3715-3723.
- Luo Z. Q., Clemente T. E. and Farrand S. K. (2001).** Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 14: 98-103.

McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. and Williams P. (1997). Quorum Sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*.143: 3703-11.

Medina G., Juárez K., Valderrama B. and Soberón-Chavez G. (2003). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional Regulation of the *rhlAB* Promoter. *J. Bacteriol.* 185: 5976-5983.

Miller M. B. and Bassler B. L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annu Rev. Microbiology.* 55: 165-199.

Moreno-Paz M. and Parro V. (2006) Amplification of low quantity bacterial RNA for microarray studies: time course analysis of *Leptospirillum ferrooxidans* under nitrogen-fixing conditions. *Environ. Microbiol.* 8: 1064-1073.

Morin D., Grasland B., Valle-Rehel K., Dufau C and Haras D. (2003). On-line high performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr.* 1002: 79-92.

Nealson K. and Hastings J. (1979) Bacterial luminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43: 496-518.

Olson G. J., Brierley J. A. and Brierley C. L. (2003). Bioleaching review partB: Progress in bioleaching: applications of the microbial processes by the mineral industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 249-257.

Paggi R., Martone C., Fuqua C., and De Castro R. (2003). Detection of Quorum Sensing in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 49-52.

Parsek M. and Greenberg E. P. (2005). Sociomicrobiology: The connections between Quorum Sensing and biofilms. *TRENDS in Microbiol.* 13: 27-33.

Rivas M., Seeger M., Holmes D. S. and Jedlicki E. (2005). A Lux-like Quorum Sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 38: 283-97.

Rawlings D. E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates *Microb. Cell. Fact.* 4: 13.

Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. and Sand W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 239-248.

Rose T., Schultz E., Henikoff J., Pietrovovski S., McCallum C. and Henikoff S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Acid. Res.* 26: 1628-1635.

Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis F. (1989) Molecular cloning: a laboratory handbook. Cold Spring Harbour, N.Y.: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Sand W. and Gehrke T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157: 49-56

Sand W., Gehrke T., Hallmann R. and Schippers A. (1995). Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism – critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 961–966.

Sand W., Rohde K., Sobotke B., and Zenneck C. (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for Leaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 85-92.

Shaw P., Ping S., Daly C., Cronan Jr., Rinehart K. and Farrand K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 94: 6036-6041.

Singh P. K., Schaefer A. L., Parsek M. R., Moninger T. O., Welsh M. J., and Greenberg E. P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature.* 407: 762–64.

Tyson G. W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E. E., Ram R. J., Richardson P. M., Solovyev V. V., Rubin E. M., Rokhsar D. S. and Banfield J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature.* 428: 37-43.

Vannini A., Volpari C., Gargioli C., Muraglia E., Cortese R., De Francesco R., Neddermann P. and Marco S. D. (2002). The crystal structure of the Quorum Sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO Journal.* 21: 4393-4401.

Wagner-Dobler I., Thiel V., Eberl L., Allgaier M., Bodor A., Meyer S., Ebner S., Hennig A., Pukall R. and Schulz S. (2005) Discovery of complex mixtures of novel long-chain Quorum Sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem.* 6: 2195-206.

Waters C. and Bassler B. (2006) The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev.* 1; 20: 2754-2767.

Watson W., Minogue T., Val D., Von Bodman S. and Churchill M. (2002). Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Signal Production in Bacterial Quorum Sensing. *Molecular Cell.* 9: 685-694.

Welch M., Todd D., Whitehead N., McGowan S., Bycroft B. and Salmond G. (2000). N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *EMBO Journal.* 19: 631-641.

Whitehead N., Barnard A., Slater H., Simpson N. and Salmond G. (2001). Quorum Sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404

Williamson L. L., Borlee B. R., Schloss P. D., Guan C., Allen H.K. and Handelsman J. (2005) Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum-sensing biosensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6335-44.

Winans S. and Bassler B. (2002). Meeting Review: Mob Psychology. *J. Bacteriol.* 184: 873-883.

Zettler A., Gomez F., Zettler E., Keenan B. G., Amils R. and Sogin M. L.. (2002) Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature.* 417:137.

Zhang R. G., Pappas T., Brace J. L., Miller P. C., Oulmassov T., Molyneaux J. M., Anderson J. C., Bashkin J. K., Winans S. C. and Joachimiak A. (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature.* 27: 971-974.

Zhu J. and Winans S. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 1507-1512.