

UCH-FC
Biotecnología
P138
C.L

BIOLIXIVIACION BACTERIANA



**EVALUACIÓN DE TRES DIFERENTES MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC**

23270

Seminario de Título

Entregado a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias



Fernando Andrés Pagliai López

2007

Director de Seminario de Título: Dr. Carlos Jerez G.



**“EVALUACIÓN DE TRES DIFERENTES MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC
23270”**

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

FERNANDO ANDRÉS PAGLIAI LÓPEZ

Dr. Carlos Jerez G.

Director Seminario de Título

Comisión Evaluadora Seminario de Título

Dra. Victoria Guixé

Presidenta Comisión



Dr. Ricardo Cabrera

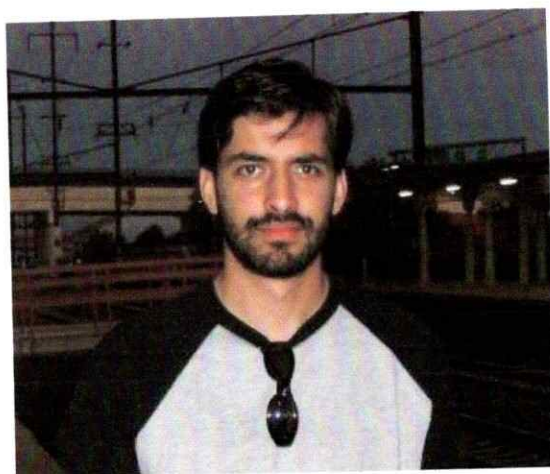
Corrector



Santiago de Chile, _____ de _____

A mis padres, Fernando y María Beatriz





De Santiago toda mi vida, pasando por aquellos hermosos recuerdos de la infancia en el colegio República de Siria, para luego apuntar a lo más alto ingresando al Instituto Nacional. Todo confluyó para llegar a un Campus y una Facultad de mi querida Universidad de Chile, que abre sus puertas en la búsqueda de mejores científicos y personas. En nuestra Facultad comencé a aprender lo que es hacer ciencia, he practicado la discusión con argumentos y conocimientos, junto con entender que cada día se puede aprender un poco más. Destaco lo valioso de la comunidad científica de este lugar, compañeros, profesores y funcionarios.



“La vida es aquello que te sucede mientras tú te ocupas de hacer otros planes”

JOHN LENNON



AGRADECIMIENTOS

Por sobre todo quiero agradecer a mis padres, a quienes está dedicado este Seminario de Título, a mis hermanas Marcela y Valeria, por el apoyo y amor recibido y con quienes conformamos una hermosa familia, algo fundamental para cualquier persona.

Agradezco al Dr. Carlos Jerez por permitirme trabajar en su Laboratorio, por transmitir su espíritu científico y su intención de apuntar siempre a lo mejor.

A Juan Araos por hacernos más simple el trabajo en el Laboratorio y por compartir sus años de experiencia con cada uno de nosotros.

A mis compañeros de Laboratorio, en especial a Felipe, Mauricio y Claudio por la disposición a comentar y discutir resultados que hicieron avanzar mi investigación y ahondar en mis conocimientos.

A Francisco Chávez por compartir la pasión por la ciencia y por el deporte, y todo el grupo del Laboratorio de Microbiología molecular y Biotecnología, quienes hicieron muy agradable el trabajo diario y han prestado su ayuda en distintas circunstancias.

A mis amigos de toda la vida Álvaro y Ricardo, a quienes considero mis hermanos.

A mis compañeros de la U, en especial a Mario, Catalina, Matías y Macarena, con quienes compartimos éxitos y desilusiones todos estos años, por apoyarme en todas las instancias y compartir conmigo parte de su conocimiento.

A nuestro equipo "La Pitilla", campeón del Torneo de Futbolito 2004 de la Facultad de Ciencias.

Finalmente agradezco a mis amigos del Instituto Nacional por la alegría que siempre representa reunirnos luego de varios años de egresar.



ÍNDICE



Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
2. Planteamiento de la investigación.....	16
2.1. Hipótesis.....	16
2.2. Objetivo general.....	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	17
3.2. Monitoreo del crecimiento celular.....	17
3.3. Obtención de proteínas extracelulares.....	17
3.4. Obtención de proteínas celulares totales.....	19
3.5. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.....	20
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes....	20
3.5.2. Electroforesis bidimensional de proteínas.....	20
3.5.3. Tinción de los geles de poliacrilamida.....	21
3.6. Determinación cuantitativa de proteínas.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Monitoreo del crecimiento celular.....	24
4.2. Influencia del pH y del porcentaje de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el método TPP.....	25
4.3. Influencia del isómero primario (<i>n</i> -) o secundario (2-) del butanol usado en el procedimiento TPP.....	28

4.4. Elaboración de un método de cuantificación de las proteínas precipitadas mediante el sistema PRMM.....	29
4.5. Comparación del rendimiento de obtención de proteínas usando 3 diferentes métodos de precipitación.....	32
4.6. Comparación de las proteínas extracelulares de <i>A. ferrooxidans</i> versus su extracto crudo.....	34
5. Discusión.....	37
6. Conclusiones.....	41
7. Referencias.....	42



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo propuesto para la oxidación del azufre por <i>A. ferrooxidans</i>	9
Figura 2	Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos.....	10
Figura 3	Curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 en azufre elemental.....	24
Figura 4	Influencia del porcentaje de saturación con sulfato de amonio y del pH en la recuperación de proteínas extracelulares usando TPP.....	26
Figura 5	SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de <i>A. ferrooxidans</i> obtenidas mediante TPP cambiando parámetros del protocolo.....	27
Figura 6	SDS-PAGE de las proteínas extracelulares de <i>A. ferrooxidans</i> obtenidas mediante TPP usando <i>n</i> -butanol o 2-butanol.....	28
Figura 7	Barrido de Absorbancia de la solución PRMM y de una solución de BSA precipitada mediante el sistema PRMM.....	30
Figura 8	Relación entre cantidades de BSA (μg) con su intensidad de pixeles en un gel SDS-PAGE.....	31
Figura 9	Curva de calibración para la estimación semicuantitativa de proteínas precipitadas mediante el sistema PRMM.....	32
Figura 10	Rendimiento promedio de obtención de proteínas desde el sobrenadante de cultivo de <i>A. ferrooxidans</i> usando tres diferentes métodos de precipitación.....	33
Figura 11	SDS-PAGE de las muestras de sobrenadante de cultivo de <i>A. ferrooxidans</i> precipitadas con TCA, con el sistema PRMM y TPP.....	34
Figura 12	2D-NEPHGE de proteínas extracelulares obtenidas mediante la precipitación con el sistema PRMM versus un extracto crudo de proteínas de <i>A. ferrooxidans</i>	35
Figura 13	2D-NEPHGE de proteínas extracelulares obtenidas mediante TPP versus un extracto crudo de proteínas de <i>A. ferrooxidans</i>	36



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición y orden de las soluciones empleadas para la tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata.....	22
Tabla 2	Cantidad de proteína obtenida desde sobrenadante de cultivo de <i>A. ferrooxidans</i> usando <i>n</i> -butanol o 2-butanol en el método TPP.....	28
Tabla 3	Valores de intensidad de pixeles de un gel SDS-PAGE cargado con muestras de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM.....	31



LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	:	Colección americana de cultivos celulares
BSA	:	albúmina de suero bovino
COCHILCO	:	Comisión chilena del cobre
LPS	:	lipopolisacáridos
NEPHGE	:	electroforesis en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio
OMP	:	proteína de membrana externa
PMSF	:	fenil metil sulfonil fluoruro
PRMM	:	solución rojo de pirogalol-molibdato-metanol
RPM	:	revoluciones por minuto
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	:	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes
TCA	:	ácido tricloroacético
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TMF	:	toneladas métricas finas
TPP	:	partición en tres fases



RESUMEN

La minería se ha establecido como el pilar principal en el desarrollo económico de Chile, en donde la producción de cobre se ha situado como la principal fuente de ingresos fiscales. El desarrollo científico asociado a la aplicación de nuevas tecnologías va a permitir una producción más eficiente, segura y con menor riesgo ambiental. Una de estas tecnologías alternativas es la biolixiviación, que se define como el uso de microorganismos en la recuperación de metales desde los minerales que los contienen.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria, Gram-negativa, acidófila y quimiolitotrófica encontrada en faenas de biolixiviación. Sus vías metabólicas y adaptación fisiológica han sido objeto de variados estudios puesto que en su crecimiento es capaz de oxidar aeróbicamente el ion ferroso, azufre elemental, sulfuros metálicos, hidrógeno molecular y ácido fórmico, considerándose como uno de los miembros más importantes del consorcio presente en los procesos de biolixiviación.

Se ha descrito que para disolver sustratos sólidos, *A. ferrooxidans* se une a la superficie del sustrato hidrofóbica e hidrofílicamente y también gracias a productos extracelulares, como proteínas, exopolisacáridos u otros. Sin embargo, se desconocen muchos de los agentes que participan en el mecanismo de la adhesión. El perfil de proteínas de la superficie celular de *A. ferrooxidans* está determinado principalmente por las condiciones de crecimiento.

En la aproximación proteómica del estudio de un compartimento subcelular se requiere de un método simple de obtención de las proteínas, luego una separación eficiente de éstas para finalmente poder identificar y obtener la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas del subproteoma analizado, lo que podrá asociarlas a una función determinada.

Durante este Seminario de Título se propone resolver el primer paso de la aproximación proteómica del estudio del secretoma, que consiste en obtener y optimizar un procedimiento de recuperación y concentración de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cuando la bacteria crece en un sustrato sólido como el azufre elemental.

ABSTRACT

Mining has established as the main pillar in the economical development of Chile, where the copper production has become the principal source of fiscal incomes. The scientific development associated to the use of new technologies will allow a more efficient and safer production with less environmental risk. One of these alternative technologies is bioleaching, which is defined as the use of microorganisms in the recovery of metals from ores.

Acidithiobacillus ferrooxidans is a chemolithoautotrophic, acidophilic and Gram-negative γ -proteobacteria found on bioleaching tasks. Its metabolic pathways and physiological adaptation have been object of several studies, since in its growth the bacteria is able to aerobically oxidate ferrous iron ions, elemental sulfur, metallic sulfides, molecular hydrogen, and formic acid, being considered as one of the most important members of the consortium present in bioleaching processes.

It is well described that in the dissolution of solid substrates, *A. ferrooxidans* binds to the substrate surface hydrophobically and hydrophilically and also due to extracellular products, such as proteins, polysaccharides or others. However, many of the agents that participate in the adhesion mechanism are unknown. The protein profile from the cellular surface of *A. ferrooxidans* is mostly determined by growth conditions.

In the proteomic approach to study a subcellular compartment, a simple method of protein recovery is required to separate them efficiently and finally identify and obtain the aminoacidic sequence of each protein of the analyzed subproteome in order to attempt their association to a specific function.

During this Title Seminary, the goal is to solve the first step of the proteomic approach of the secretome study. This consists in obtaining and optimizing a procedure for the recovery and concentration of the extracellular proteins from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 when the bacteria grows in a solid substrate like elemental sulfur.

1. INTRODUCCIÓN

La minería se ha establecido como un pilar en el desarrollo económico de Chile, situándose en las últimas décadas como la principal fuente de ingresos. Se estima que para el año 2010, Chile tendrá una producción de 6,7 millones de toneladas métricas finas (TMF) de cobre (COCHILCO, 2005). Estos niveles de producción son el resultado de una alta inversión pública y privada, y se espera que esta inversión alcance los US\$ 12.000 millones en el período 2006-2010. Esta inversión va acompañada con el desarrollo científico, que se traduce en la aplicación de nuevas tecnologías que irán en beneficio de una producción más eficiente, segura y con menor riesgo ambiental.

Hoy en día, la mayoría de los metales son obtenidos y refinados desde los minerales mediante la pirometalurgia, proceso que funciona en base a la utilización del calor y requiere altos niveles de metales en los minerales, no siendo rentable el tratamiento de minerales de baja ley. Una tecnología alternativa es la biolixiviación, definida como la utilización de microorganismos en la recuperación de metales a partir de los minerales que lo contienen, y puede ser aplicada en minerales de baja ley. El término biolixiviación se refiere a la conversión de un metal insoluble (sulfuro metálico) a una forma soluble (sulfato metálico) (Rawlings, 2002). Actualmente los procesos de biominería involucran la oxidación de metales pesados presentes en sulfuros metálicos como la pirita (FeS_2) y la calcopirita (CuFeS_2). La mayoría de las operaciones comerciales de biolixiviación se llevan a cabo por consorcios de diversas bacterias acidófilas y quimiolitotróficas entre las cuales se encuentran *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*), otras bacterias acidófilas pertenecientes al género *Acidiphilum* y arqueas (Rawlings y col, 1994).

A. ferrooxidans fue la primera bacteria descubierta capaz de oxidar minerales y es capaz de oxidar tanto hierro como los compuestos reducidos de azufre presentes en los minerales (Rawlings, 2002). *A. ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa, con pH óptimo de crecimiento entre 1,5 y

2,5. Pertenece al subgrupo de las γ -proteobacterias y es capaz de emplear como fuente de energía la oxidación aeróbica del ion ferroso [Fe(II)], azufre elemental, compuestos de azufre parcialmente oxidados (Pronk y col, 1990), hidrógeno molecular (Drobner y col, 1990) y ácido fórmico (Pronk y col, 1991). De este modo, cobra importancia el estudio de las vías metabólicas y energéticas relacionadas con el crecimiento y las adaptaciones fisiológicas de *A. ferrooxidans*, puesto que se le considera como uno de los miembros más importantes del consorcio presente en los procesos de biolixiviación (Rawlings y col, 1994).

En la oxidación del azufre elemental extracelular (S_8) éste es movilizado como persulfuro sulfano hacia el periplasma mediante una proteína especial de membrana externa aún no identificada (OMP) y luego es oxidado por una azufre dioxigenasa periplasmática (SDO). A continuación el sulfito resultante es oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR) que probablemente usa citocromos como aceptores de electrones. El sulfuro libre es oxidado a azufre elemental separadamente por una deshidrogenasa (SQR) que usa quinonas como aceptor de electrones (Fig.1) (Rohwerder y col, 2003).

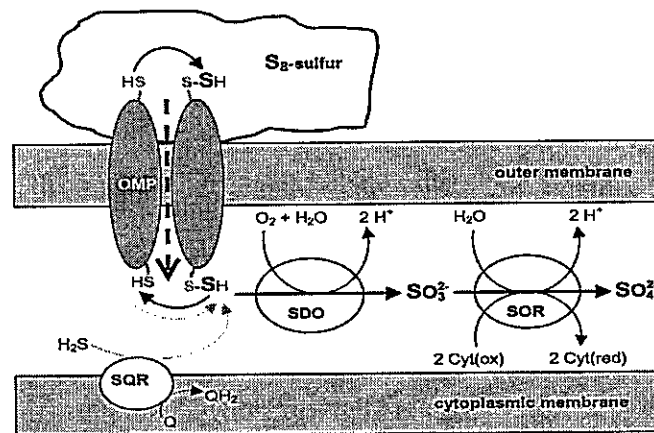


Figura 1. Modelo propuesto para la oxidación del azufre por *A. ferrooxidans* (Rohwerder y col, 2003).

Se han propuesto dos mecanismos para la disolución de sulfuros metálicos mediada por bacterias: el mecanismo indirecto y el directo (Tuovinen, 1990). En el mecanismo indirecto son los iones férricos en solución los que disuelven el mineral. Sin embargo, se han propuesto dos

diferentes vías por las cuales este mecanismo ocurriría: i) la vía del tiosulfato; y, ii) la vía de los polisulfuros (Fig. 2) (Schippers y col, 1999). En la vía del tiosulfato, la solubilización del metal ocurre luego del ataque de los iones férricos al sulfuro metálico, generándose tiosulfato como principal intermediario y sulfato como producto final. Este mecanismo ocurre sobre sulfuros metálicos insolubles en ácido como lo son la pirita (FeS_2) y la molibdenita (MoS_2). El mecanismo de los polisulfuros implica la solubilización del metal gracias al ataque combinado de iones férricos y protones, siendo el intermediario principal el azufre elemental que luego puede ser oxidado a sulfato por microorganismos oxidadores de azufre como *A. thiooxidans* y *Acidithiobacillus caldus*. El ion ferroso generado puede ser reoxidado a ion férrico por microorganismos como *A. ferrooxidans* o bacterias de los géneros *Leptospirillum* o *Sulfobacillus*. Este proceso se asocia a la oxidación de sulfuros metálicos solubles en ácido como la esfalerita (ZnS), calcosina (Cu_2S) o galena (PbS). Otro papel asociado a los microorganismos es proporcionar el ácido sulfúrico de modo que los protones faciliten la oxidación del hierro(II) y lo mantengan en forma férrica a fin de que éste realice el ataque oxidativo en contra del mineral (Schippers y col, 1999; Crundwell, 2003).

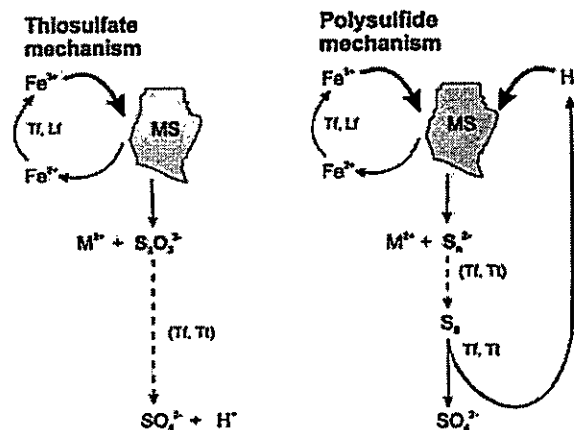


Figura 2. Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos. Atf: *A. ferrooxidans*, Lf: *L. ferrooxidans*, Att: *A. thiooxidans* (Schippers y col, 1999).

En el mecanismo directo, la bacteria debería atacar el mineral enzimáticamente producto de una estrecha interacción y de la adhesión del microorganismo al sustrato sólido, de modo que la

adhesión es un paso previo al proceso de oxidación (Brierley, 1978). Se ha visto que *A. ferrooxidans* se adhiere a la superficie de varios sustratos sólidos como azufre (Espejo y col, 1987; Ceskova y col, 2002) y sulfuros metálicos (Devasia y col, 1993; Myerson y col, 1983).

La transferencia de electrones de las reacciones involucradas en la oxidación del hierro(II) comprende varios intermediarios periplasmáticos (citocromo tipo-*c*, rusticianina, citocromo *c*₅₅₂) siendo el aceptor terminal de los electrones una citocromo oxidasa anclada a la membrana citoplasmática (Yarzabal y col, 2002).

Se ha descrito que la adhesión bacteriana a sustratos sólidos está mediada por interacciones hidrofóbicas (Devasia y col, 1993; Solari y col, 1992) e hidrofílicas (Ohmura y col, 1993). Así mismo, los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas tales como los LPS y proteínas de membrana externa juegan un papel importante en la adhesión. El perfil de proteínas en la superficie celular en *A. ferrooxidans* esta determinado principalmente por la diferencia de los sustratos de medio de cultivo y por otros factores (temperatura, pH, osmolaridad, etc) (Amaro y col, 1993; Arredondo y col, 1994). El cambio de las proteínas superficiales puede ser regulado por un mecanismo elaborado para adaptarse a la utilización del sustrato, sin estar éste bien identificado (Arredondo y col, 1988; Amaro y col, 1992; Ohmura y col, 1996). Tettelin y col del Institute for Genomic Research (TIGR) obtuvieron en 2002 la secuencia completa del genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* mencionando en ese entonces que el análisis de las proteínas secretadas y de superficie es de gran importancia para entender los mecanismos que permiten a la bacteria obtener la energía desde los minerales y sobrevivir en su ambiente.

Se sabe que las proteínas extracelulares de bacterias cumplen funciones trascendentales, como son la provisión de nutrientes, adhesión a sustratos, comunicación célula-célula, detoxificación, virulencia, etc. (Antelmann y col, 2001). El secretoma por definición comprende a las proteínas secretadas y su maquinaria de secreción (Tjalsma y col, 2000), siendo las proteínas secretadas aquellas que son exportadas desde el citoplasma al medio extracelular. Diversos

resultados sustentaron la idea de que la información para el destino subcelular de las proteínas estaba provisto por su composición de aminoácidos (Nakashima *y col*, 1994; Schneider, 1999).

Las proteínas una vez sintetizadas pueden ser destinadas a varios compartimentos subcelulares dependiendo de la presencia o no del péptido señal en el extremo N-terminal y de señales de retención específicas. La mayoría de las proteínas bacterianas destinadas a abandonar el citoplasma se exportan a través del sistema SEC (Secretory), cuyos componentes se encuentran altamente conservados (Tjalsma *y col*, 2000). Muchas de estas preproteínas exportadas se sintetizan como precursores con su péptido señal en el extremo N-terminal, los cuales son reconocidos por factores solubles específicos para su transporte y translocación a través de la membrana. Luego de esta translocación, el péptido señal es removido, lo cual resulta en la liberación de la proteína desde la membrana, adquiriendo inmediatamente después de esto su conformación correcta (Antelmann *y col*, 2001). Se han reportado otros mecanismos para la exportación de algunas proteínas tales como: señales de secreción del sistema TAT (Twin Arginine Translocation) que transporta proteínas ya plegadas (Berks *y col*, 2005), señales de lipoproteínas y transportadores ABC (ATP Binding Cassette), (Fekkes *y col*, 1999). Recientemente se identificó un nuevo sistema para la exportación de proteínas desde el citoplasma y se denominó Sistema de Secreción tipo No Clásico (Bendtsen *y col*, 2005).

Con la información conocida y disponible se han elaborado muchos predictores automatizados de localización subcelular basados principalmente en la secuencia de aminoácidos (*neural network, support vector machines* (SVM), *ProtLock predictor*, etc) (Claros *y col*, 1997; Gardy *y col*, 2003). La mayoría de estos predictores se basan en la identificación de secuencias objetivo en las proteínas exportadas, por ejemplo: la predicción de péptido señal en la posición N-terminal y los correspondientes sitios de clivaje señal-peptidasa en las proteínas precursoras (von Heine *y col*, 1986; Nielsen *y col*, 1997; Schneider *y col*, 1998).

En *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram-positiva que se considera uno de los organismos

modelos para el estudio del secretoma, cerca del 50 % del proteoma extracelular es secretado mediante los sistemas SEC y TAT (Antelmann y col, 2001). Se demostró que en esta bacteria existían al menos 4 mecanismos diferentes para la exportación de proteínas e identificaron 90 proteínas extracelulares, de las cuales sólo el 53 % fue predicho a poseer péptido señal. El 47 % restante consistió en proteínas que tenían péptido señal lipoproteicos y potenciales segmentos de transmembrana, pudiendo estas proteínas ser liberadas hacia el medio extracelular por fuga o simple liberación de la membrana, recambio de proteínas de membrana, lisis celular, por la maquinaria de exportación del flagelo, sistema de holinas o bien otros sistemas de exportación aun no conocidos. Dentro de las funciones encontradas en este secretoma destacan las proteínas asociadas al metabolismo de los carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos; transporte y unión de proteínas y lipoproteínas, motilidad y detoxificación, entre otras.

Watt y col. en 2005 afirman que existen dos grupos de proteínas secretadas, luego de analizar el proteoma extracelular de la bacteria fitopatogénica Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100: i) las proteínas activamente secretadas que comprenden enzimas extracelulares y proteínas que unen nutrientes y apéndices celulares, siendo su secreción y síntesis regulada por la densidad celular o el sustrato y, ii) proteínas que cumplen su función en el citoplasma y que no son activamente secretadas pero que son liberadas al espacio extracelular por lisis o bien otro mecanismo desconocido. Junto con esto proponen que la presencia de proteínas de membrana externa en el espacio extracelular puede deberse a que algunas proteínas no se insertan bien en la membrana o que existe una digestión parcial de proteasas. Algunas funciones encontradas en este proteoma extracelular son: adquisición de elementos traza, enzimas degradativas, enzimas metabólicas, chaperonas y proteínas de membrana externa.

La aproximación proteómica del estudio del secretoma incluye disponer de un rápido y simple procedimiento de obtención de las proteínas desde el espacio extracelular, un método sensible de separación de las proteínas donde la electroforesis bidimensional es la herramienta más

poderosa actualmente y finalmente un mecanismo de identificación a gran escala (*high-throughput*) en el cual el MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) es la línea tecnológica más usada (Gevaert *y col*, 2000; Bouchal *y col*, 2006; Valenzuela *y col*, 2006).

Existen muchos procedimientos para la precipitación y concentración de proteínas desde la solución que las contiene entre los cuales destacan: aumento de la fuerza iónica, efecto de solventes orgánicos, efecto del pH, partición en fases, formación de agregados, etc. La solubilidad de las proteínas es consecuencia de las interacciones polares con el solvente acuoso, interacciones iónicas con sales y de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre moléculas cargadas (Polson *y col*, 2003).

La adición de sulfato de amonio a soluciones de proteínas disminuye la solubilidad de las proteínas en solución (fenómeno conocido como *salting-out*) y es el resultado de la competencia por las moléculas de solvatación entre los iones de sal adicionados y los otros solutos disueltos. A altas concentraciones de sal, muchos de los iones adicionados se encuentran rodeados por moléculas de agua por lo que el solvente remanente es insuficiente para disolver otros solutos, resultando en la precipitación de las proteínas. Estos iones, que disminuyen la solubilidad de las proteínas, estabilizan su estructura nativa por lo que las proteínas precipitadas no se desnaturan (Bohinsky, 1978).

Los solventes orgánicos miscibles en agua como la acetona y el etanol son buenos agentes para la precipitación de proteínas porque sus bajas constantes dieléctricas disminuyen el poder de solvatación de las soluciones acuosas por las proteínas. Los procedimientos se llevan a cabo cerca de los 0 ° C porque a mayores temperaturas los solventes orgánicos tienden a desnaturar las proteínas (Bohinsky, 1978).

La solubilidad de las proteínas en función del pH se espera que sea mínima en un valor de pH coincidente con el punto isoeléctrico de la proteína. Sobre éste, las proteínas tienen una carga neta negativa mientras que bajo su punto isoeléctrico tienen una carga neta positiva. Los iones H^+ y

OH⁻ además de afectar la envoltura acuosa también afectan la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria, provocando la precipitación de las proteínas. En la precipitación en condiciones ácidas, el ácido forma sales insolubles con los grupos cargados positivamente de las proteínas a pHs menores del punto isoeléctrico de ellas. Un ejemplo de esto se da en la precipitación usando ácido tricloroacético, el cual es un ácido fuerte y cuya forma predominante en solución es el anión tricloroacetato. La interacción entre este anión y los péptidos inducirían el aumento de la hidrofobicidad de las proteínas que llevaría a su agregación, junto con un cambio brusco del pH. Ambos hechos generan un precipitado que consiste en agregados de proteínas desnaturaladas (Yvon *y col*, 1989; Polson *y col*, 2003).

La partición en tres fases usa un solvente orgánico C₄ o C₅ (preferentemente *t*-butanol) y sulfato de amonio para precipitar proteínas desde soluciones acuosas. El sulfato a altas concentraciones se comporta como un buen cosmotropo puesto que es un promotor aniónico del orden y estructura del agua. La precipitación ocurre por la combinación de los siguientes factores: *salting-out*, cosmotropía, aumento de la tensión superficial, deshidratación, exclusión y compactación. Al añadir suficiente sal, la mezcla se separa en dos fases, quedando en la parte superior la fase orgánica y en la inferior la fase acuosa. Las proteínas separadas mediante esta técnica se sitúan en una tercera fase intermedia (Dennison *y col*, 1997).

Otro sistema empleado en la precipitación de proteínas corresponde al PRMM (Pyrogallol Red-Molybdate-Methanol), una mezcla que contiene rojo de pirogalol, molibdato, oxalato y metanol. En condiciones ácidas y ante la presencia de molibdato, se forma un complejo coloreado entre el rojo de pirogalol y las proteínas. Al centrifugar la mezcla se genera un precipitado de este complejo proteína-colorante, lo cual se ve favorecido por la presencia de metanol que reduce la constante dieléctrica del agua aumentando la eficiencia del proceso (Caldwell *y col*, 2003).

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Sabiendo que en otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas se encuentra ampliamente documentado el proteoma extracelular con sus diversas funcionalidades y que se dispone de múltiples procedimientos para obtener y concentrar las proteínas desde el espacio extracelular, nos propusimos realizar el primer paso en la aproximación proteómica del estudio del secretoma en un acidófilo como es *A. ferrooxidans*, que corresponde al desarrollo y validación de una metodología rápida y sencilla de obtención de las proteínas extracelulares.

Se emplearon tres técnicas de precipitación de proteínas basadas en diferentes principios: i) precipitación en condiciones ácidas usando TCA, que si bien es el procedimiento comúnmente usado para este tipo de análisis, no creemos que dé un buen rendimiento, pero fue incluido como control y porque que es la metodología empleada en el estudio del secretoma de otras bacterias; ii) precipitación usando el sistema PRMM, el cual es un método ya estandarizado de recuperación de proteínas desde soluciones diluidas; y iii) precipitación mediante TPP, el cual requiere la optimización de varios parámetros.

2.1 HIPÓTESIS

Es posible recuperar las proteínas extracelulares del acidófilo *A. ferrooxidans* ATCC 23270 desde el sobrenadante de cultivo con metodologías ya establecidas para otras bacterias.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Adaptar y optimizar un procedimiento para la obtención de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, la cual se creció aeróbicamente a 30 ° C con agitación en el medio 9K modificado según el sustrato a oxidar. Para el crecimiento en azufre elemental, el medio contenía 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,04 g/L de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ y 50 g/L de perlas de azufre esterilizadas previamente, ajustando luego el pH a 2,5 con ácido sulfúrico concentrado (Amaro y col, 1991).

3.2 MONITOREO DEL CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento de *A. ferrooxidans* en las perlas de azufre se siguió mediante el conteo celular del sobrenadante de cultivo en una cámara de Petroff-Hausser mediante la visualización con el microscopio óptico OLYMPUS BX50. La concentración de células se obtuvo dividiendo el promedio de células contadas en cada celda por el volumen que contiene una celda, que corresponde a 5×10^{-8} mL. Se realizó una curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* en las perlas de azufre para establecer la fase del crecimiento en la que se extrajeron las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo. No se determinaron las células adheridas a las perlas de azufre.

3.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES

Las proteínas a estudiar se obtienen desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*, para lo cual éste se creció hasta la fase exponencial tardía. Este sobrenadante de cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 15 min a 4 ° C, luego de lo cual se filtró a través de una membrana GV Durapore PDVF (Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 μm para descartar el resto de las células no separadas durante la centrifugación.

Se analizaron distintos protocolos de obtención de las proteínas extracelulares para lograr

obtener el método que otorga un rendimiento de extracción más alto.

En el primer caso, las proteínas extracelulares se obtuvieron mediante precipitación en condiciones ácidas usando TCA (Sambrook y *col*, 1989). Se agregó TCA frío 100 % al sobrenadante de cultivo para quedar a una concentración final de TCA de 10 %. Se conservó toda la noche a 4 ° C y luego se centrifugó a 12000 rpm durante 1 h a 4 ° C. El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 100 % y luego dos veces con etanol al 70 %, y el etanol remanente en el precipitado de proteínas se eliminó por evaporación a temperatura ambiente. Para solubilizar el precipitado, éste se resuspendió en un volumen de amortiguador de isoelectroenfoque (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 %) para luego cuantificar las proteínas disueltas mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar. Este amortiguador de isoelectroenfoque no contenía anfolitos puesto que éstos interfieren en esta cuantificación y se agregaron posteriormente. Las concentraciones finales de urea, tiourea y CHAPS en la mezcla de reacción para el ensayo de Bradford no interfieren en la cuantificación de las proteínas.

Un segundo protocolo empleado fue el sistema PRMM, cuya solución contenía 0,05 mM rojo de pirogalol, 0,16 mM molibdato de sodio, 1,0 mM oxalato de sodio, 50,0 mM ácido succínico y 20 % (v/v) de metanol ajustado a pH 2 con HCl concentrado (Caldwell y *col*, 2003). Un volumen de esta solución se agregó a un volumen de sobrenadante, luego se ajustó a pH 2,8 con NaOH 5 N. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante dos horas y luego a 4 ° C durante toda la noche para luego centrifugar a 12000 rpm durante 1 h a 4 ° C. El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol al 100 % y luego dos veces con etanol al 70 %, y el etanol fue removido del pellet final de proteínas por evaporación a temperatura ambiente. El precipitado se solubilizó en amortiguador de isoelectroenfoque (urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 %). La cuantificación de las proteínas que unen el rojo de pirogalol se realizó espectrofotométricamente a 540 nm, para lo cual se elaboró previamente una curva de calibración con concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino precipitadas

mediante el sistema PRMM.

Un tercer método empleado para concentrar proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* correspondió a la partición en tres fases (TPP). El volumen de sobrenadante se saturó al 75 % agregando sulfato de amonio, a temperatura ambiente. Esta solución se dejó agitando durante 30 min para luego agregar 2/5 del volumen inicial de 2- o *n*-butanol (Dennison y *col*, 1997). La mezcla se agitó durante 2 min y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se recuperó la fase intermedia generada por este procedimiento y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min para separar la fase acuosa y la fase orgánica. El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente para luego ser solubilizado en un volumen de amortiguador Tris 40 mM pH 8,5. Se efectuó pequeños lapsos de sonicación para favorecer la resuspensión de las proteínas precipitadas en el amortiguador, para luego agregar PMSF 100 µg/µL y RNasa 50 µg/mL. Posteriormente se cuantificó las proteínas mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar.

3.4 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES TOTALES

Las células obtenidas luego de centrifugar el sobrenadante de cultivo se lavaron 4 veces con agua ácida (pH 2,5 con H₂SO₄). Para obtener un extracto total de proteínas, las células se resuspendieron en 15 µL de amortiguador de sonicación por miligramo de célula, el cual contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂ y 50 µg/ml de RNasa pancreática. Se agregó cóctel de inhibidor de proteasas (SIGMA®) en proporción de 1 µL de cóctel por cada 4 miligramos de peso húmedo de células y luego éstas se sonicaron con el Homogenizador MISONIX XL-2010 en lapsos de 20 s, dejando las células 40 s en hielo entre cada lapso de sonicación. La concentración de proteínas se obtuvo mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar. Posteriormente se trató la muestra con DNasa 50 µg/ml concentración final, por 10 min en hielo.

3.5 ANALISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes se trataron con amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) que contenía: Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS al 2 %, glicerol al 10 %, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,06 %. Se calentó la mezcla a 100 ° C durante 5 min, luego se centrifugó a 10000 rpm por 5 min para quedarse con las proteínas solubilizadas en este amortiguador.

Las muestras para electroforesis bidimensional sin alcanzar el equilibrio (2D-NEPHGE) se trataron con un amortiguador de rehidratación que contenía urea 9,5 M, nonidet P-40 al 2 %, anfolitos al 2 % (pH 3-10 y 5-7, BioRad®) y β -mercaptoetanol al 5 % (O'Farrel, 1975).

Se prepararon geles para la electroforesis de acuerdo a lo descrito por Laemmli. Se usaron geles con un gel concentrador al 3 % y un separador al 12,5 % en poliacrilamida en presencia de SDS al 0,1 %. La electroforesis se corrió a 50 V hasta que la muestra ingresa completamente al gel concentrador para luego someterla a 150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzara el extremo inferior del gel. Para estimar el peso molecular de las proteínas a analizar, se utilizó el marcador de peso molecular BenchMark™ (Invitrogen).

3.5.2 Electroforesis bidimensional de proteínas

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo según lo descrito por O'Farrel en 1975 y O'Farrel y *col* en 1977. La primera dimensión consistió en una electroforesis en gradiente de pH de 3 a 10, sin alcanzar el equilibrio (NEPHGE). La solución del gel contenía Urea 9,2 M, Nonidet P-40 al 2 %, acrilamida al 3,8 %, bisacrilamida al 0,2 %, anfolitos al 2 % (del rango de pH 3 a 10 BioRad®), persulfato de amonio al 0,02 % y N,N,N',N'-tetrametilendiamina al 0,014 %. La muestra se aplicó en

la parte superior del gel y se cubrió con una solución de urea 9 M y anfolitos al 1 % (0,8 % anfolitos pH 5-7, 0,2 % anfolitos pH 3-10, BioRad®). La electroforesis se realizó de modo que la parte superior de la cámara (ánodo) contuviese la solución de H_3PO_4 10 mM y la inferior (cátodo) tuviera la solución de NaOH 20 mM. Los geles con las muestras de interés se sometieron al isoelectroenfoque durante 5 h a 400 V, luego de lo cual los geles se equilibraron y lavaron en una solución que contenía glicerol al 10 %, β -mercaptoetanol al 5 %, SDS al 2,3 % y Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 durante 90 min, cambiando la solución cada 30 min. Luego se lavó dos veces con agua bidestilada durante 10 min, para luego enjuagar el gel en amortiguador de corrida de Laemmli. La segunda dimensión se llevó a cabo según lo descrito anteriormente en el punto 3.5.2 a excepción de que el voltaje usado fue de 50 V durante toda la electroforesis. Sobre el gel concentrador se colocó el gel de la primera dimensión y se cubrió con solución de agarosa al 1 % con azul de bromofenol al 0,01 %.

3.5.3 Tinción de los geles de poliacrilamida

Tanto los geles monodimensionales como los bidimensionales se tñieron con azul de Coomassie coloidal G-250 o mediante nitrato de plata.

Para el caso de la tinción con azul de Coomassie coloidal G-250, los geles se fijaron durante una hora en una solución que contenía etanol al 50 % y H_3PO_4 al 2 %, luego de lo cual se tñieron toda la noche con una solución que contenía metanol al 34 %, Coomassie G-250 1 g/L, H_3PO_4 al 2 % y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 15 %. Una vez que los geles se tñieron completamente, éstos se destñieron con lavados sucesivos de agua bidestilada (Neuhoff y *col*, 1988).

La tinción con nitrato de plata se efectuó según lo descrito por Rabilloud y *col* (1988) y Shevshenko y *col* (1996). La siguiente tabla muestra las soluciones empleadas en cada etapa:

	<i>solución</i>	<i>tiempo</i>
1	Fijación 10 % ácido acético + 30 % etanol	toda la noche
2	Lavado 30 % etanol	20 min [3 veces]
3	Lavado con agua H ₂ O bidestilada	15 min [2 veces]
4	Sensibilizador ditiocionato de sodio 0,025 %	1 min
5	Lavado con agua H ₂ O bidestilada	1 min [2 veces]
6	Tinción 0,2 % AgNO ₃ + 1 mM formaldehído	30 min
7	Lavado con agua H ₂ O bidestilada	1 min
8	Revelado 6 % NaCO ₃ + 6 mM formaldehído+ 20 μM Na ₂ S ₂ O ₃	2 a 3 min
9	Detención 3,5 % ácido acético	20 min
10	Lavado con agua H ₂ O bidestilada	30 min [4 veces]
11	Guardar 20 % etanol [4 ° C]	

Tabla 1. Composición y orden de las soluciones empleadas para la tinción con nitrato de plata y los tiempos que los geles se someten a estas soluciones.

3.6 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando el Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce®).

Para poder medir la cantidad de proteína precipitada mediante el sistema PRMM, inicialmente hubo que determinar la longitud de onda en la cual existía un máximo de absorbancia de la muestra de proteínas precipitadas con el sistema PRMM. Para esto se hizo un barrido de absorbancia entre 200 nm y 700 nm de la solución PRMM y luego otro barrido de absorbancia entre las mismas longitudes de onda de una muestra que contenía albúmina de suero de bovino (BSA) precipitada mediante el sistema PRMM. Una vez determinada la longitud de onda en la cual medir, se elaboró una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM.

Sin embargo, puesto que ningún método de precipitación de proteínas otorga un 100 % de

eficiencia, fue necesario corregir los valores de concentración de esta curva de calibración. Para esto a partir de la foto de un gel en condiciones desnaturalantes que contenía cada punto de la curva de calibración de BSA precipitada mediante el sistema PRMM se midió la intensidad de los píxeles de cada banda. Se elaboró otra curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA sin ningún tratamiento previo de precipitación versus la intensidad de píxeles de las bandas presentes en la foto de un gel en condiciones desnaturalantes que contenía cada uno de los puntos de esta curva.

Las imágenes de cada gel fueron analizadas mediante el programa *Quantity One*, versión 4.21 (Bio-Rad®).

4. RESULTADOS

4.1 Monitoreo del crecimiento celular.

Las proteínas a estudiar se obtuvieron desde el sobrenadante de cultivo de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, para lo cual fue necesario elaborar previamente una curva de crecimiento del microorganismo sobre este sustrato midiendo la densidad poblacional en el sobrenadante (Fig. 3). Esto se usó como referencia para establecer en que etapa procesar los sobrenadantes de cultivo.

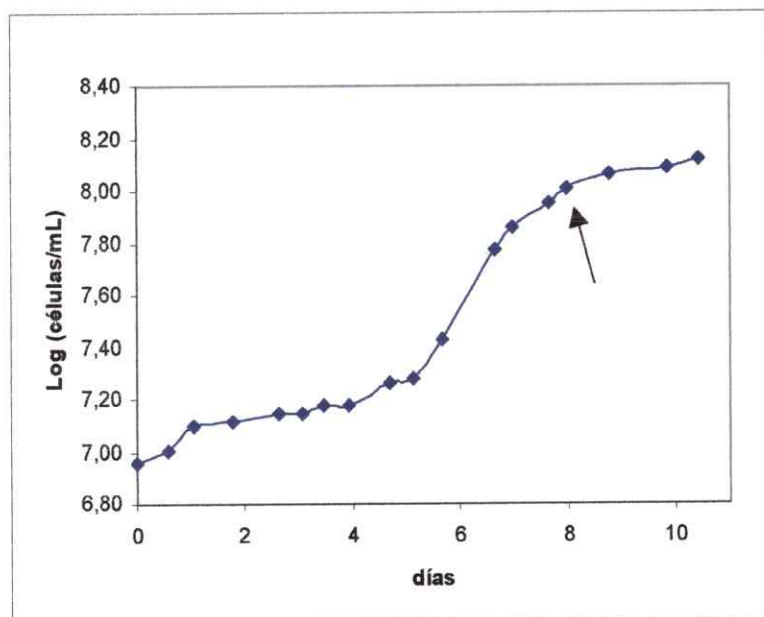


Figura 3. Curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en azufre elemental. La flecha indica el tiempo escogido para obtener y procesar los sobrenadantes de cultivo. La curva se realizó solamente con el conteo de las bacterias planctónicas.

Considerando que en fases tempranas de crecimiento la cantidad de proteínas presente en el sobrenadante de cultivo es muy baja, y que en fase estacionaria existe una mayor tasa de lisis celular, se emplearon cultivos de *A. ferrooxidans* en la fase de crecimiento señalada en la figura 3 para todos los estudios posteriores.

4.2 Influencia del pH y del porcentaje de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el método TPP.

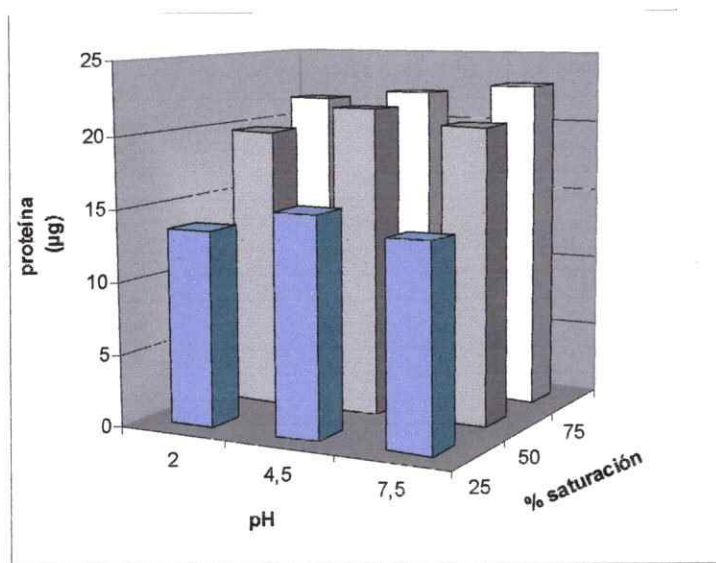
Es conocido que la obtención de proteínas usando el método TPP es dependiente del porcentaje de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sin embargo no se sabe como las variaciones de pH afectan el rendimiento durante este procedimiento. Solamente existe un reporte en donde la variación del pH lleva a la obtención de cantidades y perfiles diferentes de proteínas (Paule y col, 2004).

De esta manera, para optimizar el protocolo de obtención de proteínas desde el sobrenadante de cultivo usando TPP se variaron estos dos parámetros para encontrar aquella combinación que otorgara un rendimiento más alto de extracción de proteínas. Se utilizó 25 %, 50 % y 75 % de saturación con sulfato de amonio (agregando 144, 313 y 516 g/L de la sal respectivamente) y se ajustó el pH a valores de 2,5, 4,5 y 7,5 agregando NaOH 5 N. Con esto se obtuvieron 9 posibles combinaciones (Fig. 4) con las cuales se procedió a precipitar las proteínas de acuerdo a lo descrito anteriormente, para lo cual el sobrenadante de cultivo se dividió en 9 volúmenes de 70 mL.

Todas las muestras se trataron de la misma manera una vez recuperadas desde la fase intermedia generada entre la solución acuosa y la solución orgánica. Las muestras una vez secas a temperatura ambiente se resuspendieron en 50 μL de amortiguador de isoelectroenfoco y posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas de cada muestra mediante el ensayo de Bradford. Luego se comparó el patrón de migración a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

Los resultados de la figura 4 confirman que la recuperación de proteínas desde el sobrenadante es fuertemente dependiente de la cantidad de sulfato de amonio agregado. Se observó un aumento significativo en el rendimiento de la obtención de proteínas al aumentar de 25 % a 50

% la saturación del sobrenadante de cultivo con la sal. Sin embargo, pese a que se observó un aumento leve en el rendimiento de obtención de las proteínas al aumentar la saturación desde 50 % a 75 %, este aumento no fue significativo. Con respecto al pH, podemos decir que no se observaron cambios significativos en el rendimiento de la obtención de proteínas desde el sobrenadante de cultivo al variar este parámetro.



pH solución	% saturación (NH ₄) ₂ SO ₄	proteína (µg)	desv est (+/-)
2	25	13,6	3,2
2	50	19,7	1,9
2	75	21,6	3,4
4,5	25	15,2	3,7
4,5	50	21,5	3,1
4,5	75	22,2	5,3
7,5	25	14,0	0,9
7,5	50	20,5	1,3
7,5	75	22,8	4,6

Figura 4. Influencia del porcentaje de saturación con sulfato de amonio y del pH sobre el rendimiento de recuperación de proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* usando la técnica TPP. Los datos corresponden al promedio de la cantidad de proteína recuperada desde 70 mL de sobrenadante de cultivo de 3 replicas biológicas.

Posteriormente analizamos el perfil de migración de las proteínas de cada una de estas muestras en un gel SDS-PAGE, el cual se tiñó con nitrato de plata (Fig. 5). Se decidió emplear esta técnica de tinción de geles debido a la baja cantidad de proteína disponible. En cada carril del gel SDS-PAGE se cargó la misma cantidad de proteína para analizar variaciones en el perfil de proteínas de cada muestra.

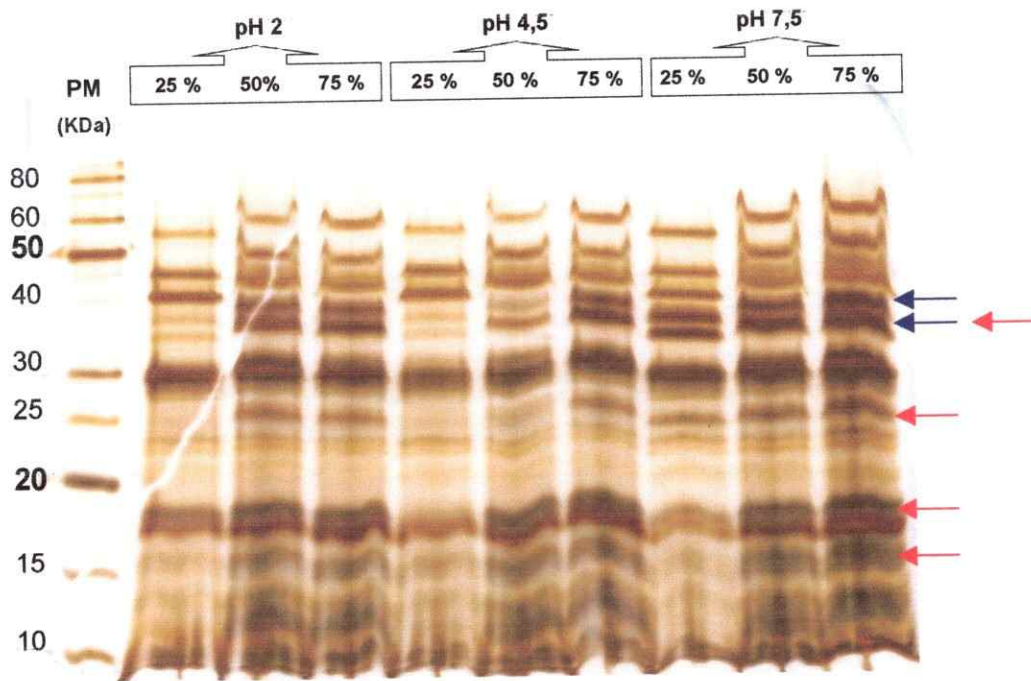


Figura 5. Perfil de migración de proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans*. Las proteínas se obtuvieron desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* usando la técnica TPP a los porcentajes de saturación con sulfato de amonio y valores de pH indicados. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con nitrato de plata. En cada carril se aplicó 1,5 µg de proteínas. Las flechas rojas indican las proteínas que aumentan su intensidad al aumentar el porcentaje de saturación, mientras que las flechas azules muestran las proteínas que aumentan su intensidad al subir el pH.

Observamos que algunas proteínas aumentaron su intensidad en la medida que incrementamos el porcentaje de saturación con sulfato de amonio. Las mayores diferencias se observaron al aumentar de 25 % a 50 % de saturación. En algunos casos existió enriquecimiento de proteínas al usar 75 % de saturación con respecto al 50 %. No se observaron cambios en el perfil de proteínas al variar el pH, a excepción de un grupo situado entre los 30 y 40 KDa (Fig. 5).

Con los resultados obtenidos se consideró que la mejor combinación de parámetros en el protocolo TPP para recuperar las proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental corresponde a 75 % de saturación con sulfato de amonio y pH 7,5, puesto que fue en este caso cuando se obtuvo la mayor cantidad de proteínas, sumado al hecho de que un grupo de proteínas ven aumentada su intensidad con respecto a los otros valores de pH estudiados.

4.3 Influencia del isómero primario (*n*-) o secundario (2-) del butanol usado en el procedimiento TPP.

Originalmente el procedimiento descrito para TPP incluye el uso del isómero terciario del butanol (*t*-butanol). Por otro lado, Paule y *col.* demostraron en su estudio de las proteínas secretadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* que el uso del isómero terciario (*t*-) o primario (*n*-) del butanol no genera diferencias en la cantidad ni perfil de las proteínas obtenidas mediante TPP. Debido a que no se pudo contar con el reactivo *t*-butanol, analizamos si los otros isómeros del butanol (*n*- y 2-) tenían influencia sobre la cantidad y perfil de proteínas obtenidas con el método TPP, para lo cual, a partir de un mismo sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental separado en dos volúmenes iguales, se efectuó el procedimiento antes descrito de partición en tres fases usando *n*-butanol o 2-butanol como solvente orgánico (Tabla 2).

solvente	µg	desv est (+/-)
<i>n</i> -butanol	30,6	0,1
2-butanol	33,2	0,6

Tabla 2. Cantidad de proteína (µg) obtenida a partir de 100 mL de sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental, usando *n*-butanol o 2-butanol en el procedimiento TPP.

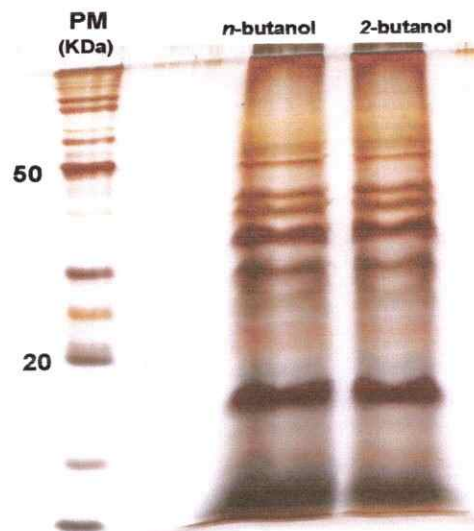


Figura 6. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* obtenidas mediante TPP usando *n*-butanol (*n*-) o 2-butanol (2-).

La cantidad de proteína recuperada con cada variante orgánica fue muy similar y el perfil de estas proteínas en un SDS-PAGE fue prácticamente idéntico para ambos solventes. De esta manera se pudo afirmar que el uso de *n*-butanol o 2-butanol en TPP no generó diferencia alguna en nuestro procedimiento. Luego de esta etapa se decidió seguir utilizando para los experimentos siguientes el butanol primario (*n*-butanol) puesto que este era el isómero que se encontraba disponible en nuestro laboratorio.

4.4 Elaboración de un método de cuantificación de las proteínas precipitadas mediante el sistema PRMM.

Una vez precipitadas las proteínas mediante el sistema PRMM, lo siguiente fue resolubilizarlas en el amortiguador adecuado y medir su concentración. Dado que las proteínas obtenidas con este método forman una solución coloreada, no fue posible emplear el ensayo tradicional de Bradford para medir la concentración de proteínas. Debido a esto entonces se aprovechó uno de los principios de este procedimiento que consiste en que el colorante rojo de pirogalol en condiciones ácidas y en presencia de molibdato forma un complejo coloreado con las proteínas facilitando su precipitación. Luego este precipitado fue resolubilizado en amortiguador de isoelectroenfoque sin anfolitos y esta mezcla coloreada pudo ser medida espectrofotométricamente.

A continuación se determinó la longitud de onda en la cual existe un máximo de absorción del complejo proteína-colorante. Para esto se efectuó un barrido de absorbancia entre 300 nm y 700 nm (en intervalos de 1 nm) de la solución PRMM y luego otro barrido entre las mismas longitudes de onda de una muestra que contenía albúmina de suero bovino precipitada mediante el sistema PRMM y solubilizada en amortiguador de isoelectroenfoque sin anfolitos.

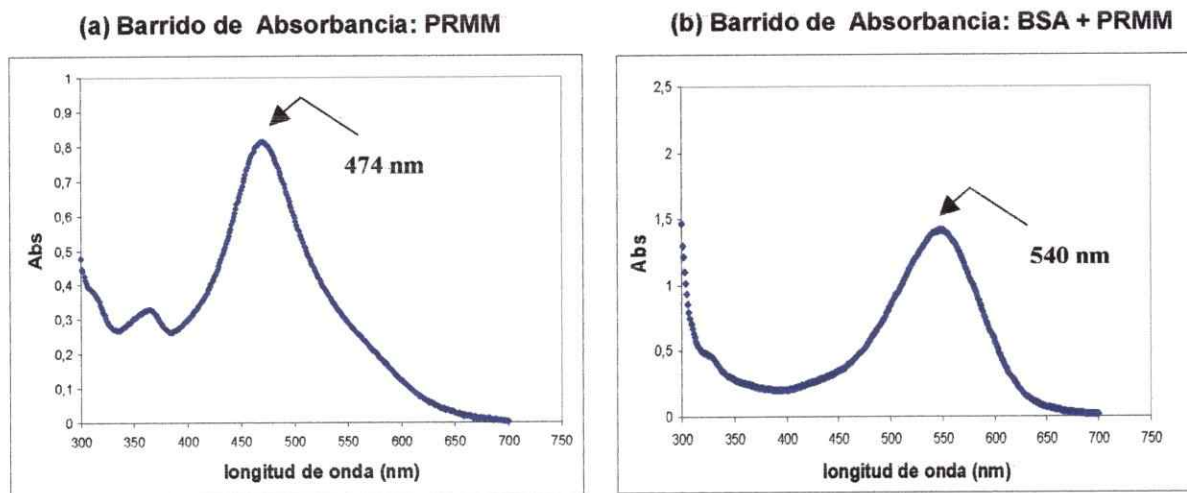


Figura 7. Barrido de Absorbancia de la solución PRMM (a) y de una solución que contiene 32,7 µg de BSA precipitada mediante el sistema PRMM (b).

El máximo de absorbancia de la solución PRMM apareció a los 474 nm, mientras que al estar formando un complejo con proteínas este máximo se desplazó a 540 nm (Fig. 7).

A continuación, una vez conocida la longitud de onda de máxima absorbancia se elaboró una curva de calibración con cantidades conocidas de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM. En esta etapa surgió un inconveniente de gran consideración puesto que ningún método de precipitación tiene eficiencia del 100 % y el sistema PRMM no fue una excepción. Es por esto que en la curva de calibración fue necesario corregir los valores de la cantidad de proteína precipitada con PRMM (BSA-PRMM) para poder asociarlos adecuadamente con las absorbancias medidas.

Para esta corrección se corrieron dos geles SDS-PAGE, el primero con cantidades crecientes conocidas de BSA (0,5 -16 µg) que sirvió de estándar, y el segundo cargado con 8 µL de cada una de las muestras de BSA precipitadas con el sistema PRMM, solubilizadas previamente en 100 µL de amortiguador de isoelectroenfoque sin anfólitos, empleadas para elaborar la curva de calibración. Ambos geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250 (datos no mostrados). Se empleó el programa *Quantity One* (Bio-Rad) para medir la intensidad de los píxeles de las bandas presentes en cada uno de los carriles de ambos geles. Con los valores de intensidad de píxeles de cada una de las bandas del gel que contenía cantidades conocidas de BSA se elaboró una

curva que asocia intensidad de pixeles con cantidad de proteínas (Fig. 8).

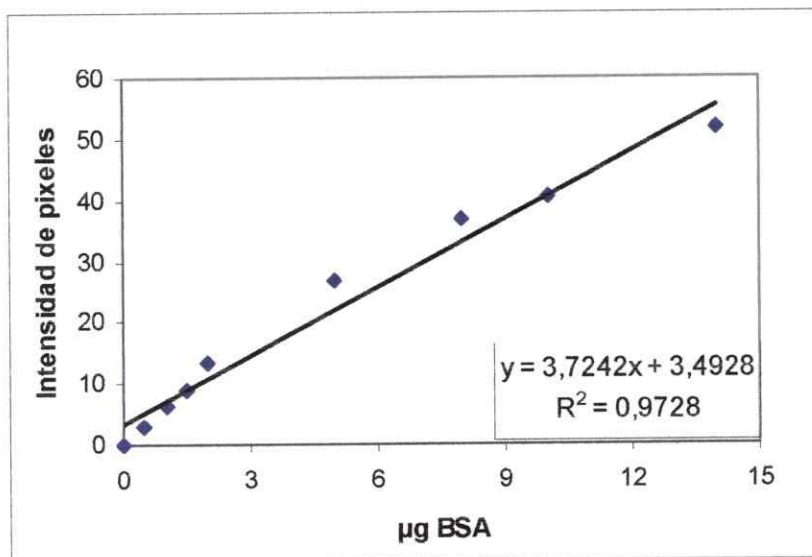


Figura 8. Gráfico que relaciona cantidades conocidas de BSA (μg) con su intensidad de pixeles en un gel SDS-PAGE.

Usando la ecuación generada a partir del gráfico de la figura 8, fue posible interpolar los valores medidos de intensidad de pixeles de cada banda del segundo gel (columna (b), Tabla 3), que contenía las muestras de BSA precipitadas con el sistema PRMM solubilizadas en amortiguador de isoelectroenfoque usadas para construir la curva de calibración y asociar una cantidad de proteínas a esos valores.

(a) carril gel	(b) Intensidad de pixeles	(c) BSA-PRMM (μg)	(d) BSA-PRMM sin corregir (μg)
1	3,501	0,00	0,0
2	5,146	0,44	0,8
3	9,232	1,54	1,6
4	13,623	2,72	3,2
5	15,700	3,28	4,8
6	25,924	6,02	8,0
7	33,618	8,09	12,0
8	38,736	9,46	16,0

Tabla 3. Valores de intensidad de pixeles de cada carril del gel SDS-PAGE que contenía 8 μL (de los 100 μL totales) de las muestras de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM (columna b), a partir de los cuales y usando la ecuación generada en el gráfico de la figura 8 se obtuvo un valor estimado de la cantidad de proteína (μg) adicionada en cada carril del gel (columna c). La columna de BSA-PRMM sin corregir (d) corresponde a los μg adicionados en cada carril del gel SDS-PAGE si la eficiencia de precipitación fuera 100 %.

Disponiendo entonces de valores más exactos de la cantidad de BSA precipitada mediante el sistema PRMM que fue cargada en cada carril del gel SDS-PAGE y sabiendo el volumen aplicado, fue posible determinar la concentración de proteínas de cada una de esas muestras. Luego, conociendo entonces la concentración de proteínas de cada muestra (con cantidades crecientes de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM), fue posible construir una curva de calibración para cuantificar proteínas precipitadas mediante este sistema.

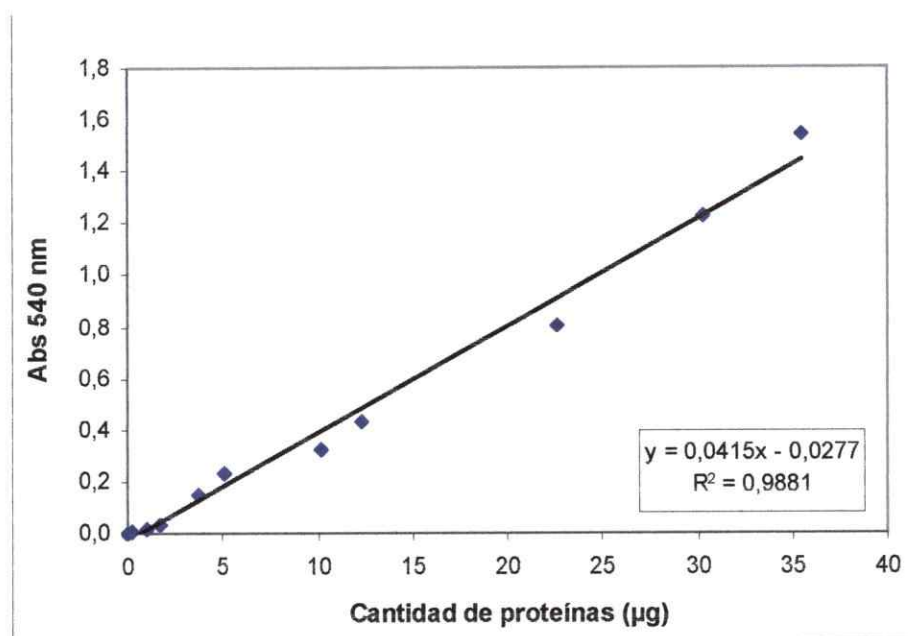


Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación de las proteínas precipitadas mediante el sistema PRMM. En la medición espectrofotométrica a 540 nm se agregan 5 o 30 µL de cada muestra de BSA precipitada mediante el sistema PRMM dependiendo de cada punto, en 500 µL de volumen final. Los valores de la cantidad de proteínas ya están corregidos

4.5 Comparación del rendimiento de obtención de proteínas usando 3 diferentes métodos de precipitación.

Se estudiaron 3 diferentes métodos de obtención y concentración de proteínas, a fin de determinar cual método es el más efectivo en la obtención de las proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental. Se efectuaron 3 réplicas

biológicas para tener mayor seguridad en los resultados. En cada réplica, el sobrenadante de cultivo se dividió en tres fracciones de igual volumen y se efectuó el tratamiento descrito anteriormente para cada método.

Los resultados de la figura 10 mostraron que la precipitación de proteínas mediante el sistema PRMM fue el método que nos dio mayor cantidad de proteína. Destacamos que el comúnmente usado método de precipitación con TCA no precipitó más de un 3 % del total de proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo.

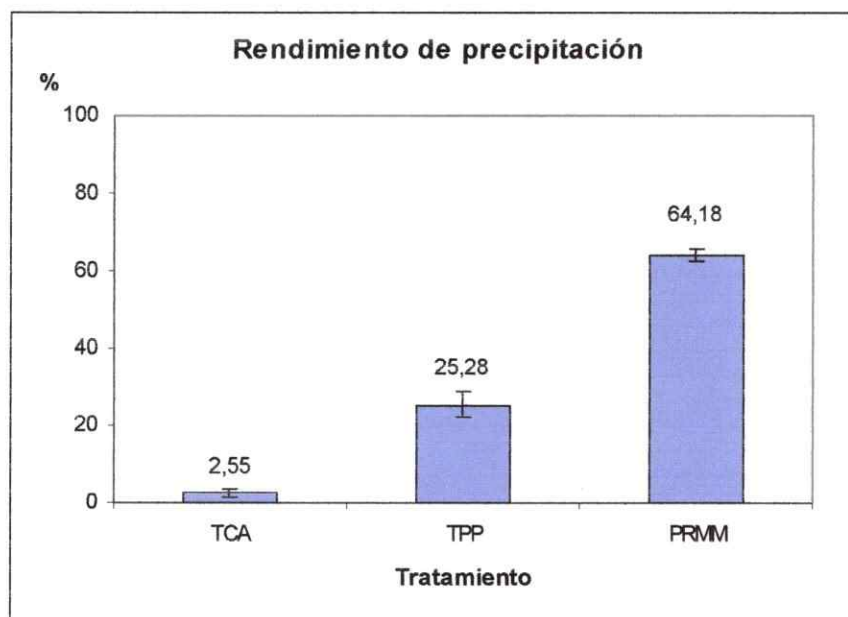


Figura 10. Gráfico del rendimiento promedio de la obtención de proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental usando tres diferentes métodos de precipitación.

Esto quiere decir que por cada mg de proteínas presentes en un sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*, el sistema PRMM hizo precipitar 0,65 mg, en tanto que usando el tratamiento con TCA la cantidad obtenida fue insignificante.

Se analizó el patrón de migración electroforética de las proteínas obtenidas con cada procedimiento mediante un gel SDS-PAGE (Fig. 11).

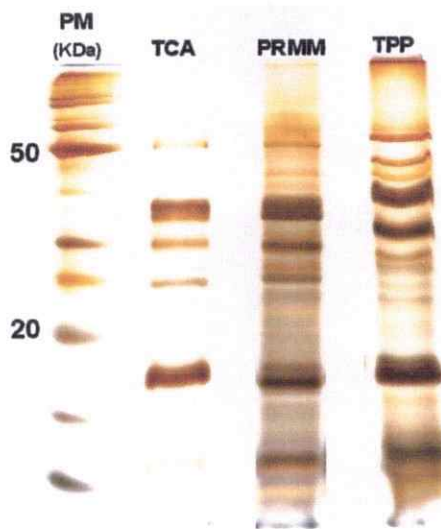


Figura 11. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de las muestras de sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* precipitadas con TCA, con el sistema PRMM y mediante el procedimiento TPP. En cada carril se cargó 1,5 μ g de proteína.

Se observó que el perfil de proteínas fue prácticamente idéntico entre los tratamientos TPP y PRMM, mientras que para el caso del TCA, sólo aparecieron las bandas más intensas. Posiblemente en las muestras de proteínas precipitadas con TCA los lavados con etanol no removieron completamente el ácido, y éste debe interferir con la medición del ensayo de Bradford, por lo que de la figura 11 se dedujo que la cantidad de proteínas obtenida mediante esta precipitación pudiera ser menor a lo informado en la figura 10. La sola aparición de las bandas más intensas en el carril de las proteínas precipitadas con TCA se pudo deber a que no se aplicó la misma cantidad de proteínas con respecto a los otros dos carriles, debido al inconveniente antes mencionado de la cuantificación. Para resolver este inconveniente sería necesario efectuar más lavados del precipitado de proteínas con etanol y posteriormente desalar las muestras empleando membranas de diálisis de corte de peso molecular bajo.

4.6 Comparación de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* versus su extracto crudo.

Disponiendo de dos procedimientos para recuperar las proteínas extracelulares de *A.*

ferrooxidans crecido en azufre elemental, decidimos pasar a la segunda etapa de la aproximación proteómica en el estudio del secretoma de este acidófilo, en donde comparamos estas proteínas frente a un extracto crudo del microorganismo crecido en el mismo sustrato (extracto de proteínas celulares totales). Las muestras se sometieron a electroforesis bidimensional para obtener una separación eficiente de las proteínas de cada extracto. La primera dimensión consistió en una electroforesis en gradiente de pH de 3 a 10 sin alcanzar el equilibrio (O' Farrell, 1975).

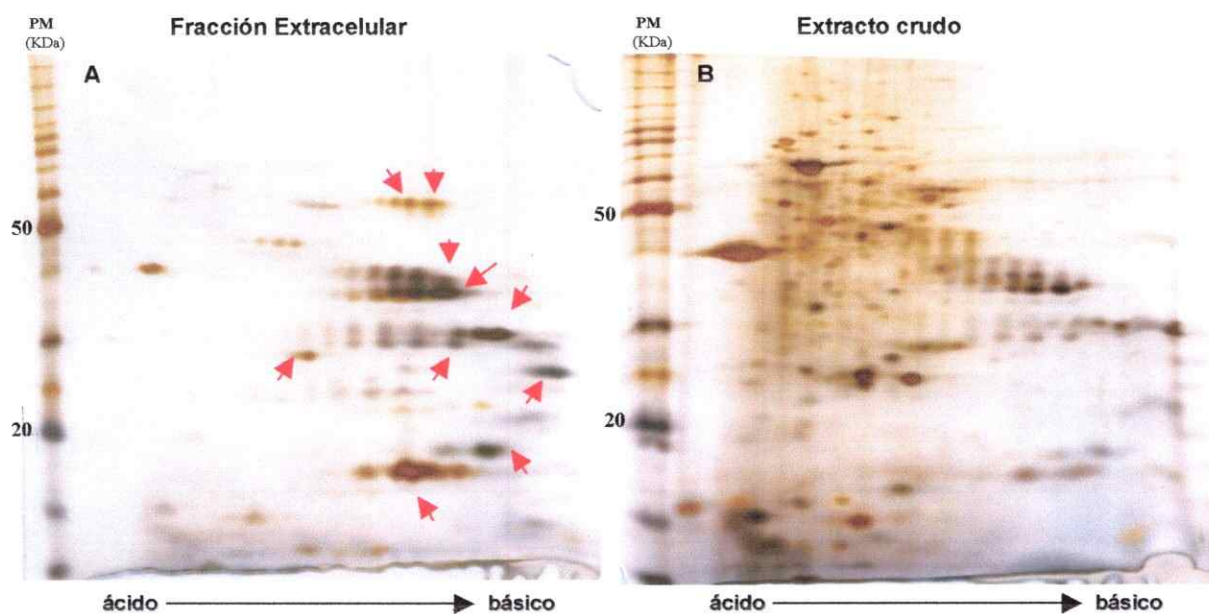


Figura 12. 2D-NEPHGE de proteínas extracelulares (A) obtenidas mediante la precipitación con el sistema PRMM versus las proteínas de un extracto crudo (B) de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental. Las flechas rojas indican proteínas que aumentan su intensidad en la fracción extracelular.

Usando esta metodología de separación de proteínas, fue posible visualizar una serie de proteínas que cambian su nivel de intensidad, aumentando en la fracción extracelular con respecto a las proteínas del extracto crudo (Fig. 12). La misma comparación se hizo con una muestra obtenida mediante el método TPP (Fig. 13).

Se pudo apreciar que con ambos procedimientos de precipitación, los resultados son cualitativamente similares (Fig. 12 A vs Fig. 13 A).

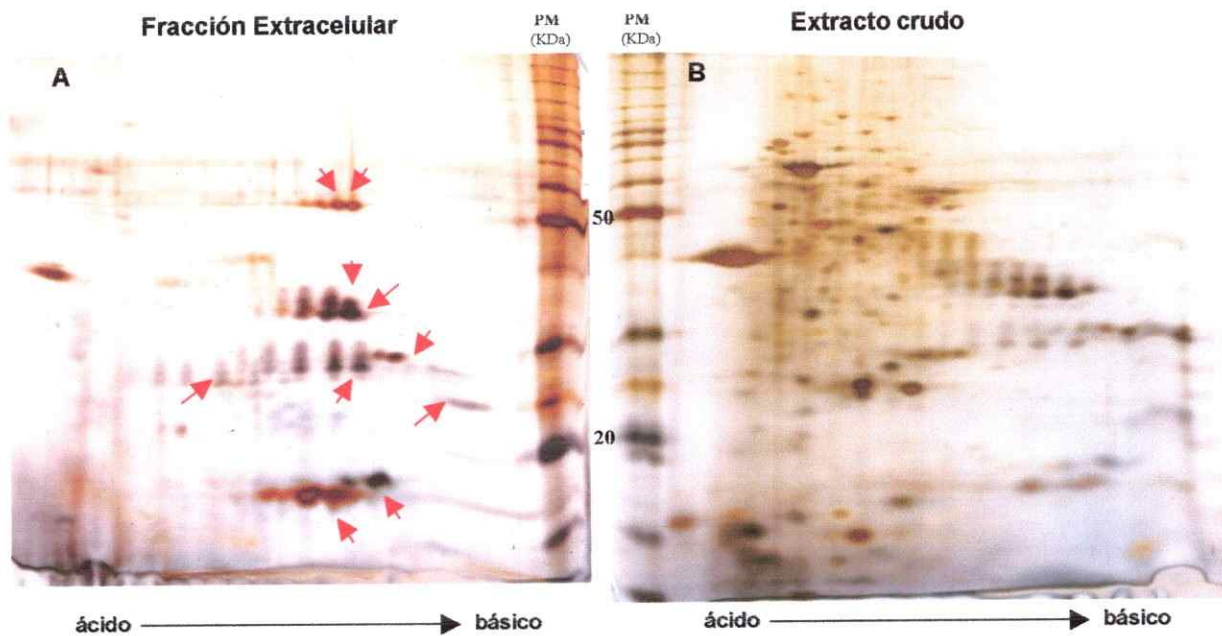


Figura 13. 2D-NEPHGE de proteínas extracelulares (A) obtenidas mediante el método TPP versus las proteínas de un extracto crudo (B) de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental. Las flechas rojas indican proteínas que aumentan su intensidad en la fracción extracelular.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este Seminario de Título constituyen la primera etapa de la aproximación proteómica del estudio del secretoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*.

Para esto se compararon tres diferentes procedimientos de obtención y concentración de proteínas, encontrando que el protocolo más eficiente para concentrar y recuperar las proteínas extracelulares correspondió a la precipitación mediante el sistema PRMM. Este procedimiento logró en promedio hacer precipitar alrededor del 65 % de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*, el más alto de los tres métodos evaluados. Se pudo confirmar que la condición ácida del sobrenadante de cultivo (pH alrededor de 1,9) no ocasionó problemas en este procedimiento, ya que precisamente fue escogido porque funciona a pH 2,8, valor muy cercano al del sobrenadante de cultivo. El colorante rojo de pirogalol en condiciones ácidas y en presencia de molibdato se une a las proteínas y forma un complejo coloreado, que gracias a la acción del metanol que baja la constante dieléctrica de la solución, logra precipitar las proteínas luego de someter la mezcla a centrifugación.

Al intentar cuantificar la concentración de proteínas obtenida con este procedimiento se advirtió que como los métodos de precipitación no son 100 % eficientes, una curva clásica de cuantificación que relaciona linealmente absorbancia con cantidades conocidas de proteínas no nos sirve, puesto que estaríamos subestimando la concentración de proteínas del extracto. Junto con esto, al formarse una solución coloreada, no nos fue posible emplear los métodos tradicionales de estimación de la concentración de proteínas usando el ensayo de Bradford o mediante otros ensayos que usan tintes orgánicos. Debido a esto, en un principio tuvimos que determinar el máximo de absorbancia de la mezcla proteína-colorante para lo cual se hizo un barrido de absorbancia de la mezcla determinando que este máximo se desplazó desde 474 nm para la solución PRMM a 540 nm para la mezcla PRMM-proteína. Luego elaboramos una curva con las

concentraciones corregidas de proteína precipitada mediante el sistema PRMM versus su absorbancia a 540 nm. En la corrección se debió analizar la intensidad de los píxeles de las bandas de un gel SDS-PAGE que contenía cantidades conocidas de BSA sin previo tratamiento, que luego sirvió para estimar la cantidad de proteína presente en otro gel SDS-PAGE cargado con cantidades desconocidas de BSA precipitadas mediante el sistema PRMM usadas para elaborar la curva de calibración.

Sin embargo este método, aún cuando fue el más eficiente al obtener la mayor cantidad de proteínas desde el sobrenadante de cultivo, no necesariamente será el más útil si el objetivo del estudio va más allá de un análisis proteómico, puesto que las proteínas obtenidas mediante este procedimiento no se encuentran en condiciones nativas, por lo que ensayos enzimáticos o de alguna actividad específica no pueden llevarse a cabo con proteínas provenientes de este tratamiento.

Sobre este último punto, destacamos que si bien el procedimiento TPP fue menos eficiente que el anterior, precipitando cerca del 25 % de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo, puede permitir el análisis de alguna actividad específica o ensayos enzimáticos puesto que no desnatura las proteínas. Esto puede ser interesante para tener en cuenta dependiendo del estudio que se desee realizar. Se confirmó que el aumento del porcentaje de saturación con sulfato de amonio tuvo como consecuencia una mejora del rendimiento de obtención de proteínas desde el sobrenadante de cultivo usando este protocolo. Las variaciones de pH pudieran tener efectos importantes al momento de analizar la cantidad de proteína obtenida, no obstante, estas variaciones no mostraron cambios significativos en el rendimiento. Sin embargo, pudimos ver que variaciones en estos dos parámetros generan diferencias en el perfil de proteínas obtenidas, aumentando la intensidad de algunas proteínas a 75 % de saturación y pH 7,5.

La técnica TPP funciona gracias a la combinación de varios factores, como son la saturación del sistema con sulfato de amonio ("*salting-out*"), cosmotropía, aumento de la tensión

superficial, deshidratación, exclusión y compactación, en donde la fracción de proteínas es precipitada en la interfase generada entre la fracción acuosa y la fase orgánica (butanol).

Se confirmó que el uso de diversos isómeros del butanol no tienen efectos significativos durante el procedimiento TPP debido probablemente a que las propiedades fisicoquímicas de los isómeros *n*- y *2*- son prácticamente idénticas para el propósito del método. Otro isómero del butanol presenta características muy similares por lo que creemos que la adición de cualquiera de éstos isómeros no debiera generar diferencias en la recuperación de las proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*.

El fracaso del protocolo de precipitación usando TCA pudiera deberse a que este procedimiento, que precipita las proteínas debido al aumento de la hidrofobicidad de éstas y su posterior agregación generada por la interacción entre ellas y el anión tricloroacetato, ve despotenciado el efecto del cambio brusco de pH dada las condiciones ya ácidas del sobrenadante. Sobre esto hay que considerar que las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* son ácido-estables, por lo que posiblemente esta sea la principal razón para explicar la baja cantidad de proteínas obtenidas mediante la precipitación con TCA. Otra razón para la tan baja cantidad de proteína total obtenida es que el método no es sensible ante concentraciones bajas de proteínas, como ocurre en el caso del sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* en la fase de crecimiento escogida (aproximadamente 1,4 mg/L), es decir, el procedimiento no es eficiente en soluciones muy diluidas. Fue así como se confirmaron las sospechas de que este procedimiento no sería eficiente para obtener las proteínas extracelulares de un microorganismo acidófilo como es *A. ferrooxidans*, pese a ser una de las técnicas más tradicionales y empleadas para concentrar proteínas.

Finalmente, se pudo ver que el perfil de proteínas en geles bidimensionales fue muy diferente al momento de analizar las proteínas obtenidas desde el sobrenadante de cultivo obtenidas

ya sea mediante precipitación por el sistema PRMM o por TPP, en comparación con las proteínas totales de un extracto crudo originado por la sonicación de células de *A. ferrooxidans*. Varios estudios de secretomas en otros microorganismos plantean la interrogante sobre la presencia de un número importante de proteínas descritas como citoplasmáticas en la fracción extracelular, sin llegar a una respuesta clara para esta inquietud (Antelmann *y col*, 2001; Tjalsma *y col*, 2004). Nuestros resultados nos dieron indicios de que las proteínas recuperadas no provienen solamente de la lisis celular, sino posiblemente a otros mecanismos más sofisticados en la exportación de proteínas desde el espacio citoplasmático (Tjalsma *y col*, 2004).

Se vio que los perfiles de proteínas del sobrenadante de cultivo de la bacteria empleando estos dos protocolos no mostraron diferencias considerables, entendiéndose por esto que la aplicación de uno u otro método no tiene incidencia al momento de un análisis cualitativo de las proteínas extracelulares. Adquiere gran relevancia la recuperación cuantitativa de las proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* puesto que la cantidad de proteína presente en el medio extracelular es muy baja.

Es recomendable para completar la segunda etapa de esta aproximación proteómica, someter las muestras a electroforesis bidimensional empleando distintos rangos de pH en la 1ra dimensión, de modo de ampliar el rango del isoelectroenfoco y así obtener una separación más eficiente de cada una de las proteínas de este compartimento.

Para completar la aproximación proteómica del estudio del secretoma será necesario determinar las secuencias aminoacídicas mediante espectrometría de masas de cada una de las manchas presentes en los geles bidimensionales de las proteínas extracelulares para poder identificarlas. Esto ayudará a predecir los posibles tipos de sistemas involucrados en la exportación de las proteínas e indicios de las funciones que éstas pudieran cumplir en dicho espacio extracelular.

6. CONCLUSIONES

- 1- Durante este seminario de Título se inició el estudio del secretoma en un microorganismo acidófilo como es *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Se desarrolló y validó un procedimiento de recuperación, obtención y concentración de las proteínas extracelulares cuando el microorganismo fue crecido en un sustrato sólido como el azufre elemental.
- 2- Se determinó que de los tres procedimientos escogidos y evaluados, la precipitación en condiciones ácidas mediante el sistema PRMM fue el protocolo más eficiente, obteniendo en promedio casi el 65 % de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo.
- 3- Se estandarizó y optimizó un segundo protocolo de extracción de proteínas (TPP) a partir del sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*. Este procedimiento tiene la ventaja de no provocar la desnaturalización de las proteínas, lo cual puede ser de gran utilidad a la hora de estudiar procesos enzimáticos o analizar alguna funcionalidad de proteínas en particular de este subgrupo.
- 4- Finalmente se logró separar las proteínas pertenecientes al proteoma extracelular mediante electroforesis bidimensional para una futura identificación y asociación a una función de las proteínas presentes en el secretoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*.

7. REFERENCIAS

- Amaro A, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I, Jerez CA.** (1991). Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173:910-915.
- Amaro AM, Seeger M, Jerez CA.** (1992). Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:29-33.
- Amaro AM, Seeger M, Arredondo R, Moreno M, Jerez CA.** (1993). The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids. In: Torma AE, Apel ML, Brierley CL (Eds.), *Biohydrometallurgical Technologies II*. TMS, Warrendale, 577-585.
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijk JM, Hecker M.** (2001). A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Res.* 11:1484-1502.
- Arredondo R, Toledo H, Peirano I, Chamorro D, Jerez CA.** (1988). Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Biochem. Int.* 17:989-999.
- Arredondo R, García A, Jerez CA.** (1994). The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2846-2851.
- Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, Brunak S.** (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology.* 5:58.
- Berks B, Palmer T, Sargent F.** (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:174-181.
- Bohinsky R.** (1978). Proteínas. *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano S.A. Estados Unidos de América. 111-152.
- Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brierley JA.** (1978). Thermophilic iron-oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 523-525.
- Bouchal P, Zdráhal Z, Helánová S, Janiczek O, Hallberg K, Mandl M.** (2006). Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics.* 6: 4278-4285.
- Caldwell RB, Lattemann CT.** (2004). Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:610-612.
- Ceskova P, Mandl M, Helanova S, Kasparovska J.** (2001). Kinetics studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 24-30.

Claros MG, Brunak S, von Heijne G. (1997). Prediction of N-terminal sorting signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 394-398.

Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO. (2005). Política Minera del Bicentenario. www.mch.cl/documentos/pdf/Politca_Minera.pdf

Crundwell FK. (2003). How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy.* 71: 75-81.

Dennison C, Lovrien R. (1997). Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr. Purif.* 11: 149-161.

Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN, Rao GR. (1993). Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4051-4055.

Drobner E, Huber H, Stetter KO. (1990). *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2922-2923.

Espejo RT, Romero P. (1987) Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1907-1912.

Fekkes P, Driessen AJ. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:161-173.

Gardy JL, Spencer C, Wang K, Ester M, Tusnady GE, Simon I, Hua S, deFays K, Lambert C, Nakai K, Brinkman FS. (2003). PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31: 3613-3617.

Gevaert K, Vandekerckhove J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis.* 21: 1145-1154.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Myerson AS, Kline, P. (1983). The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid particles. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1669-1676.

Nakashima H, Nishikawa K. (1994). Discrimination of intracellular and extracellular proteins using amino acid composition and residue-pair frequencies. *J. Mol. Biol.* 238: 54-61.

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrilamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9: 255-262.

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. (1997). Identification of prokaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.

O'Farrell PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*. 12:1133-1141.

Ohmura N, Kitamura K, Saiki H. (1993). Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4044-4050.

Ohmura N, Tsugita K, Koizumi JI, Saiki H. (1996). Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 178:5776-5780.

Paule BJA, Meyer R, Moura-Costa LF, Bahia RC, Carminati R, Regis LF, Vale VLC, Freire SM, Nascimento I, Schaer R, Azevedo V. (2004). Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted-secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Protein Expr Purif.* 34:311-316.

Polson C, Sarkar P, Incedon B, Raguvaran V, Grant R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 785:263-275.

Pronk JT, Meulenber R, Hazeu Z, Bos P, Kuenen JG. (1990). Oxidation of inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306.

Pronk JT, Meijer W, Hazeu W, van Dijken JP, Bos P, Kuenen JG. (1991). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2057-2062.

Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P. (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* 9:288-291.

Rawlings DE, Kusano T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58:39-55.

Rawlings DE. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 6:65-91.

Rawlings DE. (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, Sand W. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology.* 149:1699-1709.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schippers A, Sand W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms: via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:319-321.

Schenider G, Sjöling S, Wallin E, Wrede P, Glauser E, von Heine G. (1998). Feature extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targetinh peptides. *Proteins.* 30: 49-60.

Schneider G. (1999). How many potentially secreted proteins are contained in a bacterial genome? *Gene.* 237: 113-121.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrilamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.

Solari JA, Huerta G, Escobar B, Vargas T, Badilla-Ohlbaum R, Rubio J. (1992). Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulfide minerals surfaces. *Colloids Surf.* 69: 159-166.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt D, Jerez CA. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotech. Adv.* 24: 197-211.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S, van Dijk JM. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 515-547.

Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun P, Darmon E, Dorenbos R, Buboys JY, Weesters H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 207-233.

Tuovinen O. (1990). Biological fundamentals of mineral leaching processes. Microbial mineral recovery, McGraw-Hill Book Co., New York, NY 55-77.

von Heine G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690.

Watt SA, Wilke A, Patschkowski T, Niehaus K. (2005). Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics.* 5: 153-167.

Yarzabal A, Brasseur G, Ratouchniak J, Lund K, Lemesle-Meunier D, DeMoss JA, Bonnefoy V. (2002). The high-molecular-weight cytochrome c *Cyc2* of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* 184:313-317.

Yvon M, Chabanet C, Pelissier JP. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solution. Hypothesis on the precipitation mechanism. *Int. J. Pept. Protein Res.* 34:166-176.