



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

“Efecto del cobre en el lipopolisacárido (LPS) de  
*A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993, crecidas  
en la presencia del metal.”

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

**RODRIGO ANDRÉS NORAMBUENA VENEGAS**

Director del seminario de título:  
Dr. Carlos A. Jerez Guevara

Agosto 2018  
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Rodrigo Andrés Norambuena Venegas**.

**“Efecto del cobre en el lipopolisacárido (LPS) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993, crecidas en la presencia del metal.”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Carlos A. Jerez Guevara.

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión** \_\_\_\_\_

**Evaluador** \_\_\_\_\_

## Biografía



Nací en Santiago, el 7 de octubre de 1993. Soy el tercer y último hijo de la familia conformada por mi madre Isabel, mi padre Andrés y mis hermanos Andrés y Cristián. Al año nos trasladamos a Curicó y luego a San Fernando. A los 9 años volvimos a Santiago, donde estudié en el colegio Calasanz y posteriormente en el Instituto Nacional, saliendo de cuarto medio el año 2011.

Mi infancia fue común y corriente, salvo por una meningitis que me afectó a los 5 años y que afortunadamente no trajo secuelas. De pequeño muy interesado en la actividad física, como también en los videojuegos. La adolescencia trajo consigo pérdidas importantes en nuestra familia debido al fallecimiento de mi madre y padre, el año 2008 y 2010, respectivamente. Fue en esta etapa de cambios donde se desarrolló mi apasionado gusto por la música, como también por las diversas ramas de la ciencia, pero principalmente adquirí el gusto a aprender cosas complejas, desde el funcionamiento de una enzima hasta la física cuántica.

Manteniendo todas mis aficiones, opté por estudiar algo relacionado fuertemente con la ciencia, con el fin de aprender y también descubrir yo mismo aquellos misteriosos mecanismos en los que se desenvuelve la vida. Ahora, casi al final de este camino, comprobé empíricamente que uno mientras más aprende, menos sabe. Sin embargo, me gusta ver esto como una invitación a ir más allá, sea en el ámbito que sea. Soy un convencido de que lo importante siempre será ir hacia adelante, nunca hacia atrás.

## Agradecimientos

## Índice de contenidos

Biografía.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de contenidos.....	v
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	ix
2. Abstract .....	3
3. Introducción .....	5
3.1 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y su papel en la biolixiviación .....	5
3.2 El cobre, su función y su toxicidad celular .....	6
3.3 El lipopolisacárido .....	7
3.4 Biosíntesis del LPS .....	9
3.5 Modificaciones y variabilidad en el LPS.....	14
3.6 El LPS de <i>A. ferrooxidans</i> y los metales.....	15
3.7 Objetivos generales.....	16
3.8 Objetivos específicos .....	17
4. Materiales y métodos.....	18
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....	18
4.2 Métodos utilizados para el análisis de los LPS.....	19
4.2.1 Extracción de LPS .....	19
4.2.2 Obtención del LPS por el método de Hitchcock y Brown modificado .....	19
4.2.3 Cuantificación del LPS mediante el ensayo de Purpald. ....	19
4.2.4 Electroforesis en geles de Poliacrilamida SDS-Tricina.....	20

4.2.5 Tinción con nitrato de plata .....	21
4.3 Técnicas de biología molecular .....	22
4.3.1 Extracción del DNA genómico .....	22
4.3.2 Extracción del RNA total .....	22
4.3.3 Cuantificación de ácidos nucleicos .....	23
4.3.4 Electroforesis en geles de agarosa .....	23
4.3.5 Diseño de oligonucleótidos .....	24
4.3.6 PCR convencional .....	24
4.3.7 Transcripción inversa.....	25
4.3.8 PCR en tiempo real.....	25
4.3.9 Cuantificación por PCR en tiempo real .....	26
5. Resultados.....	27
5.1 Análisis transcripcional de genes de <i>A. ferrooxidans</i> posiblemente involucrados en la síntesis del LPS.....	27
5.2 Análisis del perfil electroforeticoLPS de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993.....	30
5.3 Cuantificación del LPS de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 en presencia de cobre.....	31
6. Discusión.....	33
7. Conclusiones .....	411
8. Bibliografía.....	422

## **Índice de tablas**

Tabla 1. Composición del gel de TSDS.....	20
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para evaluar los posibles cambios en los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis del LPS.....	23

## Lista de figuras

Figura 1. Modelo del LPS en bacterias.....	9
Figura 2. Ruta de síntesis del lípido A en <i>E. coli</i> .....	10
Figura 3. Modelo de algunas de las proteínas involucradas en la síntesis del antígeno O del LPS en las bacterias.....	12
Figura 4. Modelo de exportación del LPS en <i>E. coli</i> .....	13
Figura 5. Niveles transcripcionales del gen <i>wzy</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	26
Figura 6. Niveles transcripcionales del gen <i>wzz</i> en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	27
Figura 7. Niveles transcripcionales del gen <i>rfaE</i> en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	28
Figura 8. Niveles transcripcionales de los genes <i>wzy</i> , <i>wzz</i> y <i>rfaE</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	29
Figura 9. Comparación del perfil electroforético del LPS de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	30
Figura 10. Concentración relativa de LPS de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 crecidas a distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> .....	31
Figura 11. Comparación de la concentración relativa de LPS en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993 en ausencia de cobre y a 100 mM de CuSO <sub>4</sub> .....	32

Figura 12. Propuesta resumen de la posible respuesta del LPS de *A. ferrooxidans* ATCC  
23270 a altas concentraciones de cobre.....38

## **Lista de Abreviaturas**

**23270:** *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270.

**53993:** *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993.

**2-ME:** 2-mercaptoetanol o  $\beta$ -mercaptoetanol.

**ATCC:** Colección Americana de Cultivos por Tipo, del inglés “American Type Culture Collection”.

**CPS:** Polisacáridos capsulares, del inglés “Capsular Polysaccharides”.

**DO:** Densidad óptica de un cultivo, medida con un espectrofotómetro en unidades arbitrarias.

**EDTA:** Ácido etilendiaminetetraacético. Del inglés “Ethylenediaminetetraacetic acid”

**EPS:** Sustancias poliméricas extracelulares, del inglés “Extracellular polymeric substances”.

**KDO:** 2-ceto-3-desoxioctanato, del inglés “2-keto-3-deoxyoctanate”.

**LPS:** Lipopolisacárido.

**MIC:** Concentración mínima inhibitoria, del inglés “Minimum Inhibitory Concentration”.

**PCR:** Técnica de reacción en cadena de la polimerasa, del inglés “Polymerase Chain Reaction”.

**PSA:** Persulfato de amonio.

**qRT-PCR:** Técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa en tiempo real, del inglés “quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”.

**SDS:** Dodecilsulfato sódico, del inglés “Sodium dodecyl sulfate”.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS, del inglés “SDS Polyacrylamide gel electrophoresis”.

**TBE:** Solución amortiguadora utilizada en electroforesis en geles de agarosa compuesta de Tris, ácido bórico y EDTA.

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina.

**TSDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de Tricina-SDS, del inglés “TSDS Polyacrylamide gel electrophoresis”.

## 1. Resumen

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrofa, acidófila, involucrada en un consorcio bacteriano capaz de biolixiviar metales como el cobre. Este microorganismo posee la capacidad de vivir en ambientes con altas concentraciones de metales. Por ello que esta bacteria es importante en procesos industriales de biolixiviación y por ende, su estudio resulta de utilidad en relación con esta biotecnología. Uno de los componentes más abundantes e importantes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas como *A. ferrooxidans* es el lipopolisacárido (LPS). Esta molécula consta de una parte integral hidrofóbica conocida como lípido A, y una parte hidrofílica dividida en dos, el “core” y el antígeno O. La síntesis de las distintas partes del LPS es catalizada por varias proteínas. Dentro de éstas, se encuentra la proteína RfaE, involucrada en la síntesis del “core” del LPS, la enzima Wzy, que polimeriza al antígeno O y la proteína Wzz, que determina el largo de cadena del antígeno O.

Al ser la molécula más expuesta de la bacteria, el LPS está en contacto directo con el medio donde vive el microorganismo. Por lo tanto, interactúa directamente con eventuales metales presentes en el ambiente como el cobre, el oro, etc. Diversos estudios han revelado que modificaciones del LPS pueden afectar la adherencia de las bacterias a distintas superficies e incluso afectar la viabilidad de la célula.

En base a estos antecedentes, para analizar si el LPS modifica su estructura y/o cantidad, se midieron mediante qRT-PCR los cambios transcripcionales de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE* de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*, que codifican para las proteínas nombradas previamente, cuando la bacteria creció a distintas concentraciones de cobre. También se cuantificó y analizó la estructura del LPS de *A. ferrooxidans*.

Los resultados mostraron que la presencia de cobre provoca cambios transcripcionales significativos para los tres genes analizados en la cepa ATCC 23270 y sólo para el gen *wzz* en la cepa ATCC 53993. Tanto la estructura del LPS analizado, como el número de unidades repetidas del antígeno O, no presentaron cambios significativos en ambas cepas. La cantidad de LPS presente en la cepa ATCC 23270 es menor que en la cepa ATCC 53993, sin embargo, se observó un aumento parcial del LPS en la cepa ATCC 23270 cuando la bacteria crece a mayores concentraciones de cobre, mientras que la cepa ATCC 53993 no presentó cambios significativos en esta condición, sugiriendo que la cepa ATCC 23270 utilizaría el LPS como una forma de resistencia contra el cobre y que la cepa ATCC 53993 no aumentaría su cantidad de LPS, ya que de manera basal posee mayores cantidades de esta molécula. Estos resultados son una primera aproximación al posible rol que tendría el LPS en esta bacteria acidófila en la interacción con metales.

## 2. Abstract

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic and acidophilic bacterium, involved in the microbial consortium capable of bioleaching metals such as copper. This microorganism has the ability to live at very high metal concentrations and therefore, plays a pivotal role in bioleaching of minerals. One of the most abundant and important components of the outer membrane of Gram-negative bacteria such as *A. ferrooxidans* is the lipopolysaccharide (LPS). This molecule consists of an integral hydrophobic part known as lipid A, and a hydrophilic portion divided into the “core” and the O-polysaccharide or O-antigen. The synthesis of the different parts of LPS is catalyzed by several proteins. Among these, RfaE protein is involved in the “core” synthesis of LPS. Wzy enzyme polymerizes the O antigen and Wzz protein is the O antigen chain length determinant.

Being the most exposed molecule of the bacterium, LPS is in direct contact with the environment. Therefore, it can directly interact with the metals present in the environment. Some reports indicate that modifications of LPS can affect the attachment of bacteria to different surfaces and even their viability.

Based on this background, to analyze whether the LPS structure and/or its quantity are modified in the presence of copper, transcriptional changes of *wzy*, *wzz* and *rfaE* genes from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and ATCC 53993, were measured in bacteria grown at different copper concentrations. The levels of LPS present in both strains of *A. ferrooxidans* were also quantified and their structure analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gels.

The results showed significant transcriptional changes for the three genes analyzed in strain ATCC 23270 and only for the *wzz* gene in strain ATCC 53993. The LPS structure was analyzed by determining the number of repeated units of O antigen. No significant changes in the electrophoretic banding patterns were seen in both strains. The amounts of LPS present in strain ATCC 23270 was lower than that of strain ATCC 53993. However, the amounts of LPS were partially increased when strain ATCC 23270 was grown in high copper concentrations. On the contrary, strain ATCC 53993 did not show significant changes in the presence of the metal, suggesting that strain ATCC 23270 would use LPS as a way of copper resistance. Strain ATCC 53993 on the other hand, already has a higher basal amount of LPS. These preliminary results are a first approximation to study the possible role of LPS in its interaction with metals in this acidophilic bacteria.

### 3. Introducción

#### 3.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans* y su papel en la biolixiviación

Actualmente, Chile es uno de los principales exponentes de la producción de cobre (Consejo Minero, 2016). El proceso de obtención del metal a partir del mineral a través de su solubilización es denominado lixiviación y emplea diversos agentes químicos. En el último tiempo se han logrado desarrollar nuevas tecnologías que permiten utilizar a los microorganismos como agentes lixiviantes, los cuales son capaces de solubilizar los metales presentes en los minerales. Este proceso se denomina biolixiviación. Las principales ventajas de la biolixiviación son su menor impacto ambiental y su menor inversión de capital, lo que ha rentabilizado la extracción de metales a partir de minerales de baja ley (Coram & Rawlings 2002; Jerez, 2017). Las desventajas de este proceso están relacionadas con una alta producción de ácidos por parte de los microorganismos y con mayores tiempos de recuperación del metal, en comparación con la lixiviación química. Los microorganismos que realizan el proceso de biolixiviación forman parte de un consorcio microbiano que oxida hierro y compuestos reducidos de azufre para obtener energía metabólica (Rawlings, 2005). Estos microorganismos son acidófilos debido a que son capaces de vivir en ambientes donde el pH es muy bajo (Olson y col., 2003).

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa que forma parte del consorcio microbiano utilizado en la biolixiviación de diversos metales (Devasia y col., 1993, Martínez-Bussenius y cols., 2017). Esta bacteria quimiolitotrofa obtiene su energía a partir de la oxidación de ion ferroso y de compuestos reducidos de azufre. Además, es una bacteria acidófila que crece óptimamente a pH 2 (Valdés y cols., 2008).

Existen variadas cepas de *A. ferrooxidans*. Entre ellas, se encuentran dos modelos de estudio que poseen sus genomas secuenciados: las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993. La cepa 53993 posee una isla genómica exclusiva de 160 kb aproximadamente, que está ausente en la cepa 23270. Esta isla genómica posee determinantes de resistencia a cobre adicionales a los que poseen ambas cepas en su genoma, lo que podría explicar la mayor resistencia a cobre de la cepa 53993 en comparación con la cepa 23270 (MIC > 100 mM versus MIC = 50 mM, respectivamente) (Orellana y Jerez, 2011).

En el proceso de biolixiviación, la adhesión de los microorganismos al sustrato inorgánico del cual obtienen energía es crítica (Devasia y col., 1993). Es por esto que las estructuras superficiales de los microorganismos cumplen un papel fundamental en este proceso (Sand y col., 2001). Diversos estudios indican que la adherencia de *A. ferrooxidans* a sustratos sólidos está mediada por las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que produce la bacteria (Gehrke, y col., 2001). Incluso, se ha descrito que *A. ferrooxidans* varía la composición de su EPS según las condiciones de crecimiento en las que se encuentre, lo cual sugiere que la bacteria tiene la capacidad de modificar sus estructuras superficiales en función de las condiciones ambientales en las que se desarrolle (Rohwerder y col., 2003). Se ha descrito también que la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* sobre los sustratos inorgánicos depende en gran medida de los EPS que produce (Harrison, y col., 2007; Yang y col., 2015).

### **3.2 El cobre, su función y su toxicidad celular**

El cobre es un metal esencial para todos los organismos debido a su participación en diversos procesos celulares como la respiración, fotosíntesis, coagulación de la sangre, pigmentación, etc. Este metal está presente en la célula en dos estados redox, ya sea su forma reducida ( $\text{Cu}^{+1}$ ) o su forma oxidada ( $\text{Cu}^{+2}$ ), participando como cofactor

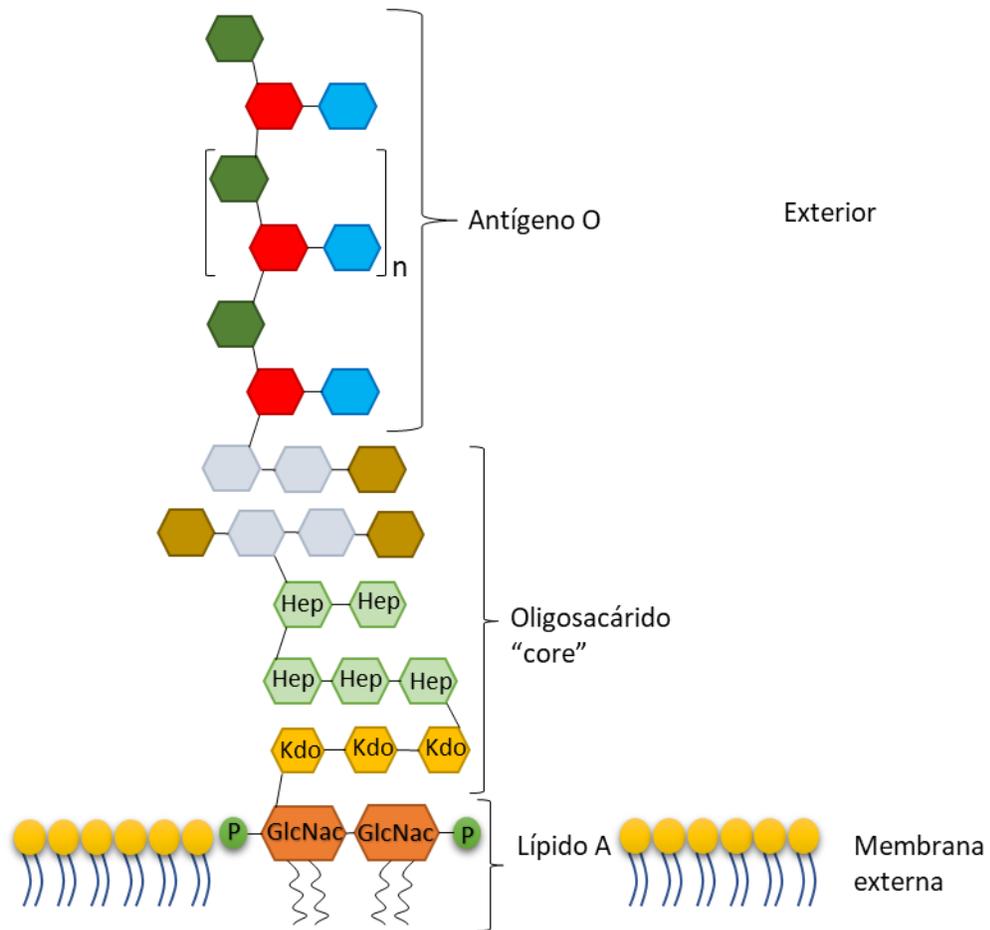
de distintas proteínas involucradas en los procesos descritos (Puig & Thiele, 2002; Arguello, 2013). A concentraciones superiores a las fisiológicas, el cobre se puede tornar muy dañino para las bacterias por diversos motivos. Uno de ellos, es el alto estrés oxidativo producido por la reacción de Fenton, que genera radicales libres, los cuales pueden ocasionar daño a las membranas celulares, oxidar proteínas, peroxidar lípidos y alterar las funciones celulares (Lloyd & Phillips, 1999; Solioz & Stoyanov, 2003). Por estas razones, para la célula es esencial mantener las concentraciones intracelulares de cobre en un rango que no sea tóxico. Para esto, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia y tolerancia que permiten mantener la homeostasis intracelular del cobre (Martínez-Bussenius y cols., 2017). Estos mecanismos consisten en el secuestro intracelular del metal y su transporte hacia el exterior, evitar su entrada a la célula o generar un eflujo activo del metal mediado por transportadores de membrana. *A. ferrooxidans* presenta diversos mecanismos de resistencia a cobre, como las ATPasas de eflujo CopA, sistema de eflujo Cus y chaperonas de cobre (Navarro y col., 2009). La mayor resistencia a cobre de la cepa 53993 se puede explicar en parte, por la presencia adicional de genes en su isla genómica que codifican para alguno de estos mecanismos de resistencia. (Orellana y Jerez, 2011).

### **3.3 El lipopolisacárido**

El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal y más expuesto de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Por esta razón, está en contacto directo con el ambiente y podría participar en el proceso de adherencia de la bacteria al sustrato inorgánico mediando la interacción inicial con su superficie.

El LPS, es una molécula anfipática, constituida por una parte hidrofóbica y una hidrofílica. La parte hidrofóbica corresponde al lípido A y se encuentra integrada en la

membrana externa (fig. 1). Está formado por dos disacáridos normalmente fosforilados con cadenas de ácidos grasos unidas, los que pueden o no estar hidroxiladas (Raetz y col., 2009). La parte hidrofílica se subdivide en dos, el oligosacárido central o “core” y el antígeno O. El “core” es un oligosacárido relativamente conservado que puede o no presentar fosforilaciones. En el “core” se ubican azúcares característicos de esta molécula como heptosas y KDO (del inglés 2-keto-3-deoxyoctonate) (Raetz & Whitfield, 2002). La función principal del “core” es mantener la integridad e impermeabilidad de la membrana externa a través de grupos con carga negativa presentes en la molécula (fig. 1). Estos grupos cargados interactuarían con moléculas adyacentes del LPS que poseen cationes divalentes o poliaminas. Adicionalmente, los grupos cargados negativamente mediarían la interacción entre el LPS y las cargas positivas de diversas proteínas de la membrana externa (Firdich & Whitfield, 2005). En la zona más externa del LPS se encuentra el antígeno O, que corresponde a la región más expuesta de la molécula. Consiste en un oligosacárido formado generalmente por residuos de cuatro a seis azúcares. Se ha reportado que la unidad de oligosacáridos puede presentar hasta 100 repeticiones (Raetz & Whitfield, 2002). El número de unidades repetidas de antígeno O es preferencial para cada especie.

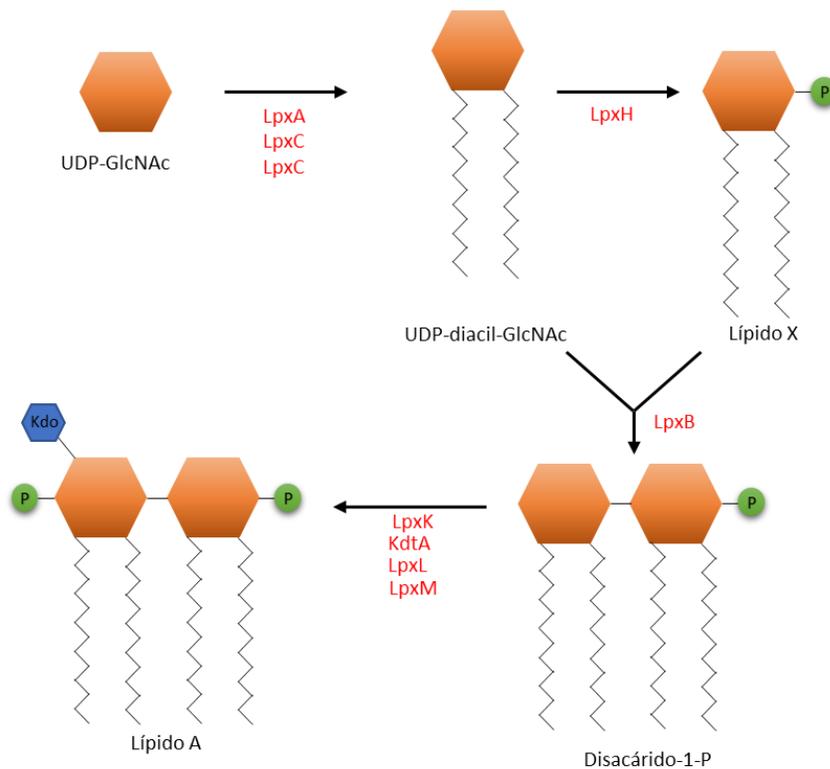


**Figura 1. Modelo del LPS en bacterias.** Se detalla la estructura del LPS en bacterias Gram-negativas. El lípido A se encuentra embebido en la membrana externa. Hacia el exterior, se encuentra ligado con el oligosacárido "core". A su vez, el "core" está ligado con la zona más exterior del LPS, el antígeno O. Este sector puede poseer distintas unidades repetidas de antígeno O, dependiendo de la especie de LPS.

### 3.4 Biosíntesis del LPS

En la biosíntesis de las distintas partes del LPS participan diversas enzimas presentes en el citoplasma, en el lado interno y externo de la membrana interna y en el periplasma. Los genes que codifican para estas enzimas están altamente conservados (Raetz & Whitfield, 2002). Se ha descrito que en la mayoría de las enterobacterias la síntesis comienza con la formación del lípido A, donde el grupo de enzimas Lpx utiliza uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) como precursor. A través de varias

reacciones catalizadas por las enzimas citoplasmáticas LpxA, LpxC y LpxD se forma uridina difosfato diacil D-glucosamina (UDP-diacil-GlcN) (fig. 2). Esta molécula es hidroxilada por la enzima LpxH para generar el lípido X. Posteriormente, la enzima LpxB condensa el lípido X con su precursor (UDP-diacil-GlcN) para formar un disacárido-1-P. Tanto LpxH como LpxB son proteínas periféricas de membrana. El disacárido fosfatado es fosforilado nuevamente por la enzima LpxK para obtener el lípido IV<sub>A</sub>. La enzima KdtA incorpora el azúcar KDO al lípido IV<sub>A</sub> y tras un par de reacciones catalizadas por las enzimas LpxL y LpxM se forma finalmente el lípido A. Las enzimas KdtA, LpxK, LpxL y LpxM son proteínas integrales de membrana interna. Es importante destacar que la estructura del lípido A es la más conservada en comparación a las estructuras del “core” y del antígeno O (Raetz & Whitfield, 2002; Wang & Quinn, 2010).

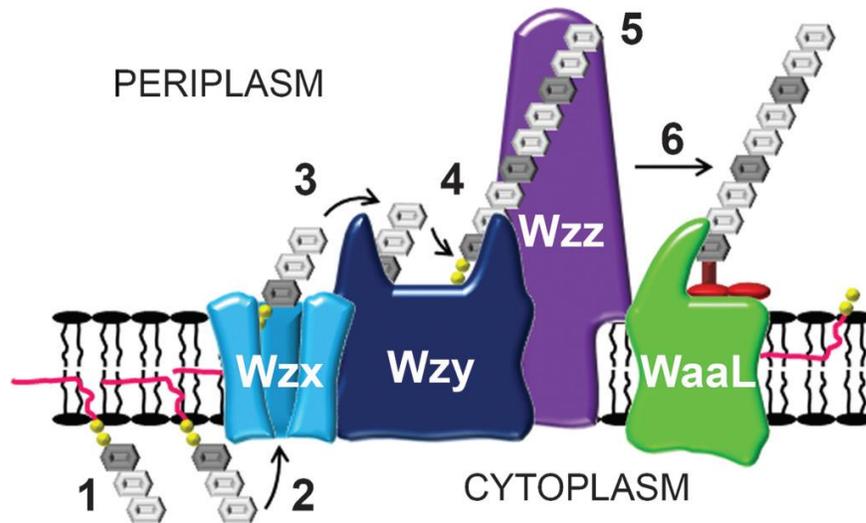


**Figura 2. Ruta de síntesis del lípido A en *E. coli*.** Los nombres de las enzimas involucradas se muestran en rojo y los nombres de los sustratos en negro. Las moléculas han sido simplificadas.

La biosíntesis del “core” del LPS se realiza por numerosas glicosiltransferasas asociadas a la membrana interna. Esta síntesis es eficiente y rápida, lo que sugiere que las enzimas funcionan como un complejo coordinado. Los oligosacáridos del “core” pueden dividirse en dos regiones estructurales distintas: el “core” interno que se conecta con el lípido A y donde se encuentran los azúcares más conservados y característicos de esta molécula como el KDO y L-*glicerol-D-manno*-Heptosa (Hep) (Wang & Quinn, 2010), y el “core” externo, conectado con el antígeno O y que presenta mayor diversidad estructural. Al respecto, se ha reportado que las estructuras oligosacáridicas del “core” externo de las cepas R1, R2, R3, R4 y K-12 de *E. coli* presentan muy poca similitud entre sí (Muller-Loennies y col., 2002; 2003). Tanto en *Salmonella* como en *E. coli* algunos de los genes requeridos para la síntesis del “core” se codifican en dos operones distintos: *gmhD* y *waaQ* para la síntesis del “core” interno y externo, respectivamente (Roncero & Casabanan, 1992; Whitfield y col., 1997). Adicionalmente, el gen *rfaE* también está involucrado en la síntesis del “core” interno del LPS puesto que codifica para una enzima bifuncional que cataliza la biosíntesis de ADP-L-*glicerol-manno*-Heptosa, el precursor de L-*glicerol-D-manno*-Heptosa (Valvano y col., 2000).

El antígeno O se sintetiza en el lado citoplasmático de la membrana interna a partir de undecaprenil fosfato, molécula que también es precursora de los polisacáridos capsulares (CPS) y del peptidoglicano (fig. 3). En *E. coli* y *S. enterica*, las glicosiltransferasas y polimerasas involucradas en la síntesis del antígeno O y/o peptidoglicano están codificadas en el clúster de genes *rfb*. Luego de la síntesis citoplasmática, el antígeno O es transportado al lado periplasmático de la membrana interna por la flipasa del antígeno O (Wzx) (Liu y col., 1996) (fig. 3). Antes de ser ligado al lípido A, el antígeno O se polimeriza entre sí formando enlaces glicosídicos por la

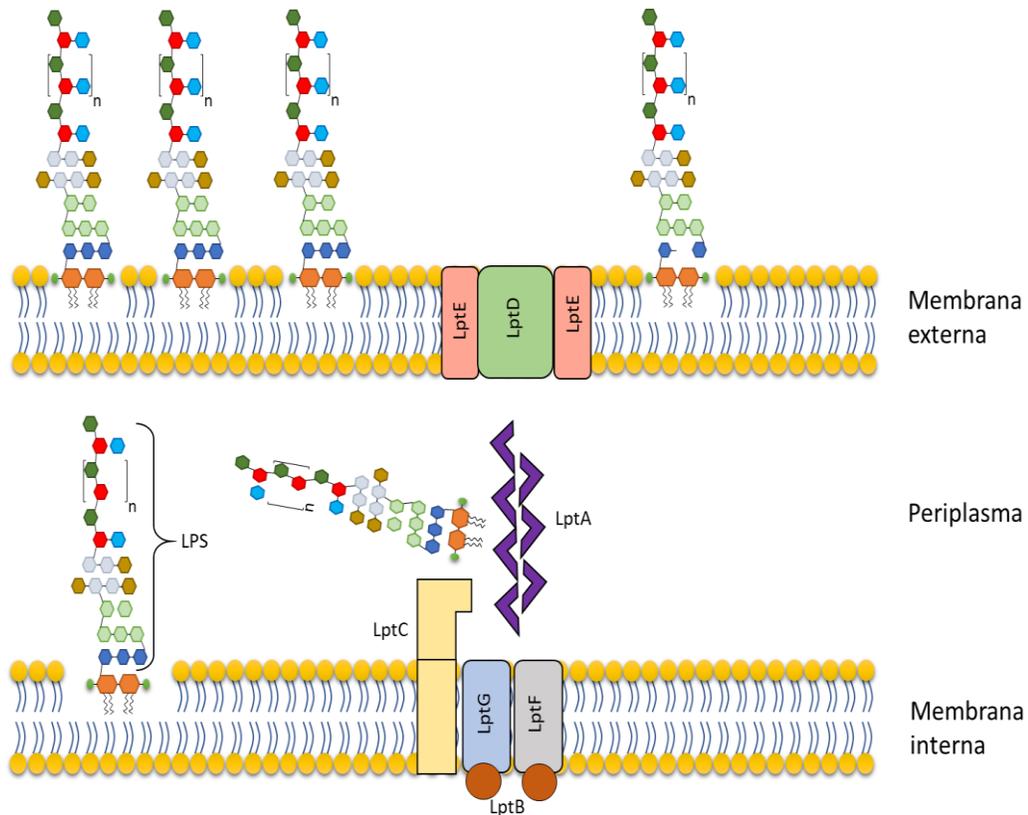
antígeno O polimerasa (Wzy) con lo que se forman cadenas de varias unidades repetidas de antígeno O. El número de unidades repetidas adecuado se determina por la proteína Wzz (Franco y col., 1996). Finalmente, la ligasa del antígeno O (WaaL) cataliza la unión de la cadena de unidades repetidas de antígeno O con el complejo lípido A-“core” (fig. 3) (Abeyrathne y col., 2005; Islam & Lam, 2014).



**Figura 3. Modelo de algunas de las proteínas involucradas en la síntesis del antígeno O del LPS en las bacterias.** El antígeno O es translocado al periplasma por la proteína Wzx y polimerizado en una cadena de unidades repetidas de antígeno O por la proteína Wzy. La proteína Wzz es la que determina el largo de cadenas de antígeno O y la proteína WaaL liga la cadena creciente de antígeno O al lípido A. Los pasos de la síntesis de la cadena de antígeno O están indicados en los números 1-6 (Islam & Lam, 2014).

Una vez que el LPS se sintetiza, se transporta desde el lado periplasmático de la membrana interna hasta el lado exterior de la membrana externa. Las proteínas encargadas de esta función son la proteína periplasmática LptA, la proteína citoplasmática LptB, las proteínas de membrana interna LptC, LptF y LptG y las proteínas de membrana externa LptD y LptE (Sperandeo y col., 2007, 2008; Ruiz y col., 2008) (fig. 4). Existen evidencias que indican que varias de estas proteínas podrían formar un complejo (Wu y col., 2006). En base a esto, el mecanismo propuesto para el transporte del LPS consiste en la acción del complejo LptBFG en conjunto con LptA y LptC que

translocaría el LPS al lado periplasmático de la membrana externa. Finalmente, se exporta por LptD y LptE al lado externo de la membrana externa (ver fig. 4) (Ma y col., 2008).



**Figura 4. Modelo de exportación del LPS en *E. coli*.** El LPS es extraído de la membrana interna por el complejo LptBFG y es transportado a la membrana externa a través de otro complejo formado por LptA y LptC. El LPS es reconocido en la membrana externa por LptD y LptE, las cuales transfieren la molécula a la superficie (Kalynysh y cols., 2014).

En *A. ferrooxidans* la mayoría de estas proteínas no están caracterizadas, por lo que en nuestro laboratorio se realizó una búsqueda bioinformática de las proteínas Wzy, Wzz, WaaL y RfaE (ver fig. 3) codificadas en el genoma de las cepas 23270 y 53993. La búsqueda se realizó por homología de secuencias con los genes de *E. coli* K-12 y por presencia de los dominios funcionales en estas enzimas.

### 3.5 Modificaciones y variabilidad en el LPS

Las modificaciones del LPS han sido tema de estudio en los últimos años. Estas modificaciones son importantes para que el microorganismo se adapte al ambiente, o bien, para generar mecanismos de resistencia. En *P. aeruginosa* se ha documentado que cambios en la estructura y composición de su LPS alteran su capacidad de adherencia a superficies sólidas (Rocchetta y col., 1999). Por otro lado, algunas bacterias Gram-negativas pueden desarrollar resistencia a distintos antibióticos como la polimixina. Este antibiótico posee carga positiva y tiene la capacidad de desplazar los iones  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , uniéndose al lipido A, causando la desestabilización y eventual destrucción de la membrana interna y externa. A través de la adición de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (LAra4N) a un grupo fosfato del lípido A, la carga negativa disminuye, generando una disminución en la afinidad de las polimixinas hacia el LPS (Nilsson y col., 2008).

Otro ejemplo de modificación del LPS consiste en el aumento en la formación de biopelículas cuando el “core” presenta modificaciones en alguna de sus heptosas (Nakao y col., 2012). En la enterobacteria *Shigella flexneri*, el antígeno O puede ser modificado a través de acetilaciones o fosforilaciones para generar una mayor diversidad antigénica. Se han reconocido treinta variantes de antígeno O en esta bacteria (Knirel y col., 2015).

En la literatura se han descrito análisis del perfil electroforético del LPS de *A. ferrooxidans* a partir de distintos relaves mineros, en los cuales se descubrieron diferencias significativas entre los perfiles electroforéticos entre un relave y otro, dando cuenta de la relación directa que existe entre el LPS y el ambiente en el que vive la célula (Southam & Beveridge, 1993). A su vez, se ha descrito un tratamiento en *A. ferrooxidans*

R2 para la extracción parcial del LPS. El efecto de este tratamiento es aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular, además de exponer proteínas de membrana externa, generando un aumento en la adhesión de las células a perlas de azufre (Arredondo y col., 1994). Todos estos antecedentes reafirman la importancia de la variabilidad del LPS como también la capacidad de las bacterias de modificar la estructura y/o composición del LPS ante distintas condiciones.

### **3.6 El LPS de *A. ferrooxidans* y los metales**

Son escasos los estudios dedicados a dilucidar la relación existente entre las moléculas del LPS y los distintos metales presentes en el medio extracelular, sobretodo en microorganismos biomineros. Experimentos de espectrometría infrarroja indican que a bajas concentraciones de ciertos óxidos de metales, las moléculas de agua unidas a su superficie son desplazadas por moléculas de LPS y a concentraciones más altas se pueden establecer puentes de hidrógeno entre los óxidos de metal y el LPS (Jucker y col., 1997; 1998). El hecho que el LPS sea una estructura altamente aniónica refuerza la idea de que es el principal sitio de unión de metales en las bacterias Gram-negativas (Langley & Beveridge, 1999).

Se ha descrito que el LPS de *A. ferrooxidans* TM tiene baja concentración de fósforo y esto es atribuido a la necesidad de la bacteria de mantener la carga de la membrana externa ligeramente positiva para repeler la alta concentración de protones de su entorno (Wang y col., 1970). En esta misma cepa de *A. ferrooxidans*, Hirt & Vestal (1975) describieron diferencias estructurales significativas entre el LPS de bacterias crecidas en azufre elemental, ion ferroso y glucosa. Particularmente, estas diferencias se observan principalmente en el contenido de azúcares y la composición de ácidos grasos del LPS.

En contraste a los estudios de Arredondo y col. (1994), Escobar y col., (1997) señalan que en *A. ferrooxidans* ATCC 19859, la pérdida parcial de LPS por medio de un tratamiento con cambios pH y EDTA tiene efectos negativos en la adherencia a sustratos como pirita o calcopirita.

Existen análisis proteómicos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 adaptadas a distintas concentraciones de cobre que presentan resultados interesantes relacionados al LPS. Un análisis proteómico de la cepa 53993 adaptada a 40 mM de CuSO<sub>4</sub> mostró un aumento significativo de la proteína RfaE que forma parte de la síntesis del 'core' del LPS (Martínez-Bussenius y col., 2016). Al mismo tiempo, otro análisis proteómico del laboratorio en la cepa 53993 crecida a 100 mM de CuSO<sub>4</sub> mostró un aumento significativo de la proteína Wzy (enviados a publicación).

Con estos antecedentes, resultaría interesante evaluar el efecto del cobre en la biosíntesis y expresión del LPS en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 para obtener un primer indicio del comportamiento de esta molécula frente al metal, en relación a estudiar si existe algún posible cambio de esta a nivel de la superficie de la membrana externa cuando la bacteria crece a altas concentraciones de cobre.

### **3.7 Objetivos generales**

Determinar el efecto de distintas concentraciones de cobre en el LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 y analizar la expresión transcripcional de genes relacionados a la síntesis de esta molécula.

### **3.8 Objetivos específicos**

1. Analizar los cambios transcripcionales de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993, crecidas en ausencia o presencia de distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ .
2. Cuantificar el LPS de ambas cepas de *A. ferrooxidans* en presencia o ausencia de  $\text{CuSO}_4$ .
3. Analizar el patrón electroforético del LPS de *A. ferrooxidans* crecidas en presencia o ausencia de  $\text{CuSO}_4$ .

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 se cultivaron a 30°C y a 150 rpm en medio 9K a pH 1,5 en ausencia o presencia de sulfato de cobre.

Dadas las diferentes resistencias a cobre de ambas cepas, para *A. ferrooxidans* ATCC 23270, se utilizó medio suplementado con 50 mM o 100 mM de CuSO<sub>4</sub>. En el caso de la cepa ATCC 53993, se empleó 100 mM o 200 mM de CuSO<sub>4</sub>.

El medio 9K contenía: 33,3 g/L de FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,4 g/L de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,1 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,04 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O (Amaro y col., 1991).

Los cultivos suplementados con CuSO<sub>4</sub> se adaptaron previamente de la siguiente manera: se expuso el cultivo a concentraciones crecientes de CuSO<sub>4</sub>, hasta obtener un crecimiento similar al de las células sin cobre. Los inóculos consistían en cultivos crecidos con una concentración de CuSO<sub>4</sub> menor. De esta manera, se logró incrementar gradualmente la concentración del metal para llegar a concentraciones finales de 100 y 200 mM de CuSO<sub>4</sub>.

El crecimiento bacteriano se monitoreó mediante el recuento del número de células del cultivo en una cámara Petroff-Hausser, utilizando un microscopio Olympus BX50.

## **4.2 Métodos utilizados para el análisis de los LPS**

### **4.2.1 Extracción de LPS**

Se utilizaron cultivos en fase exponencial tardía de ambas cepas de *A ferrooxidans* crecidos en las condiciones descritas. Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 x g por 5 min a 4°C y se lavaron dos veces por resuspensión con agua ácida ajustada a pH 1,5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y centrifugación a 10.000 rpm por 1 min. Luego, las células se lavaron dos veces por resuspensión y centrifugación con citrato de sodio 10 mM, pH 7 y finalmente se resuspendieron en agua ácida. Para normalizar el número de bacterias, se midió la densidad óptica a 600 nm de la suspensión celular y se ajustó a una densidad óptica de 2 ( $DO_{600nm} = 2$ ) en un volumen final de 1 mL de agua ácida. La extracción de LPS se realizó empleando tres réplicas biológicas.

### **4.2.2 Obtención del LPS por el método de Hitchcock y Brown modificado**

La suspensión de bacterias se centrifugó a 10.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspendió en 90 µL de solución amortiguadora de lisis (SDS al 2%; 2-ME al 4%; Tris-HCl 0,5 M pH 9). La suspensión se hirvió durante 30 min a 100°C. Posterior a esto, el lisado se digirió con 100 µg/mL de DNasa I por 90 min a 37°C. Después, la muestra se digirió con 1 mg/mL de Proteinasa K por 90 min a 60°C. Finalmente, el lisado se dializó usando una membrana de nitrocelulosa de 0,025 µm de poro contra agua nanopura durante 40 min. Las muestras conteniendo el LPS se mezclaron con amortiguador de carga 3X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8; SDS al 6%; glicerol al 30%; 2-ME al 15%; azul de bromofenol al 0,06%) y se almacenaron a 4°C.

### **4.2.3 Cuantificación del LPS mediante el ensayo de Purpald.**

El LPS extraído se cuantificó mediante el ensayo de Purpald (Quesenberry y Lee, 1996). En este ensayo, los grupos glicoles terminales no sustituidos presentes en el KDO

de las moléculas de LPS se oxidan por acción de ácido peryódico ( $\text{NaIO}_4$ ). Esta oxidación libera formaldehído, el cual reacciona cuantitativamente con el reactivo de Purpald formando un aducto incoloro. En una segunda oxidación con  $\text{NaIO}_4$  se produce un compuesto cromogénico con un pico de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

Para el ensayo se utilizó una curva de calibración con concentraciones crecientes de KDO (Merck). Las concentraciones fueron las siguientes: 0, 4, 8, 16, 20, 40, 60 y 120  $\mu\text{g/mL}$ , diluyendo el KDO en agua nanopura. Las muestras de LPS extraído se diluyeron 1.000 veces en agua nanopura. Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de las muestras y estándares en una placa microtituladora. A cada pocillo se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaIO}_4$  32 mM, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 25 min. Luego, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Purpald 136 mM a cada pocillo, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente se agregó 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaIO}_4$  64 mM para detener la reacción. Se midió la absorbancia de cada muestra a 550 nm. Utilizando la curva de calibración de KDO, se calculó la concentración relativa de LPS en cada muestra.

#### **4.2.4 Electroforesis en geles de Poliacrilamida SDS-Tricina**

Las muestras de LPS obtenidas en 4.2.2 se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-Tricina (Lesse y col., 1990). Los geles se prepararon al 12% de acrilamida total. Los volúmenes de los componentes del gel para el sistema Mini-Protean 3 Biorad® están detallados en la Tabla I.

La composición de la solución amortiguadora del ánodo es de 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9 y la solución amortiguadora del cátodo es de 0,1 M Tris-HCl, 0,1M Tricina, 0,1% SDS, pH 8,25. La electroforesis en el sistema Mini-Protean 3 se realiza a 50 V hasta que las muestras entren al gel resolutivo y luego a 150 V por 90 min.

**Tabla I. Composición del gel de TSDS.**

<b>Soluciones</b>	<b>Gel separador (12%)</b>	<b>Gel concentrador</b>
49,5% acrilamida total, 6% bisacrilamida	1250 $\mu$ L	-
49,5% acrilamida total, 3% bisacrilamida	-	250 $\mu$ L
Solución amortiguadora del gel (Tris-HCl 3 M, pH 8,45, SDS 0,3%).	1660 $\mu$ L	775 $\mu$ L
Glicerol	520 $\mu$ L	-
H <sub>2</sub> O bidestilada	1560 $\mu$ L	2100 $\mu$ L
TEMED	6 $\mu$ L	6 $\mu$ L
PSA 10%	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

#### **4.2.5 Tinción con nitrato de plata**

La tinción de los geles se realizó por el método de Tsai y Frasch (1982) modificado. Luego de retirarse de la cámara, el gel se sumergió en una solución de fijación (etanol al 40%, ácido acético al 10%, en agua bidestilada) durante 16 a 20 h. Después, se incubó con una solución de oxidación (etanol al 40%, ácido acético glacial al 10%, peryodato de sodio al 0,7%, en agua bidestilada) por 20 min con agitación. Luego, se realizaron dos lavados con agua bidestilada durante 5 min con agitación. El gel se tiñó con 150 mL de una solución que contiene 2,8 mL de NaOH 1 N, 3 mL de amoníaco al 25% (v/v) y 1 g de AgNO<sub>3</sub>, aforado con agua bidestilada. El gel se lavó dos veces con agua bidestilada durante 5 min con agitación. Se reveló de 5 a 20 min con 250 mL de una solución de revelado (12,5 mg de ácido cítrico monohidrato y 125  $\mu$ L de formaldehído al 37%). Finalmente, la reacción se detiene con un lavado con agua bidestilada.

### **4.3 Técnicas de biología molecular**

#### **4.3.1 Extracción del DNA genómico**

Células de ambas cepas de *A. ferrooxidans* provenientes de 300 o 600 mL de cultivo crecidos hasta la fase exponencial tardía se colectaron por centrifugación a 10.000 x g por 5 min y se lavaron dos veces con agua ácida, pH 1,5 ajustada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y dos veces con citrato de sodio 10 mM, pH 7. Para extraer el DNA se utilizó el “UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit”, según las instrucciones del fabricante.

#### **4.3.2 Extracción del RNA total**

Para la extracción del RNA total se utilizaron cultivos de ambas cepas de *A. ferrooxidans* crecidos hasta fase exponencial tardía. Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 x g por 5 min y se lavaron dos veces con agua ácida, pH 1,5, ajustada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y dos veces con citrato de sodio 10 mM, pH 7. A partir de este punto el protocolo se realizó en hielo. Para la extracción, se utilizaron entre 10 y 20 mg de células (peso húmedo). Los pellets celulares se resuspendieron en 200 µL de solución de lisis celular (acetato de sodio 0,02 M, SDS al % 0,05 y EDTA 1 mM, pH 5,5) y se incubaron a 70°C por 5 min. A cada resuspensión celular se le agregó 1 mL de TRIzol (Invitrogen), se mezcló por inversión y se incubó a 70°C por 5 min. Luego, se agregaron 200 µL de cloroformo y se homogeneizó con vórtex. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10.000 x g por 10 min a 4°C y se recuperaron las fases acuosas. Para precipitar el RNA, se agregó 1 volumen de isopropanol al 100 % y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min seguido de una centrifugación a 13.000 x g por 10 min a 4°C. Finalmente se escurrió todo el líquido y cada pellet obtenido se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas.

Para evitar la contaminación con DNA, las muestras se trataron con 4 U de DNasa libre de RNasas TURBO DNA-free (Ambion) por 30 min a 37°C en una reacción con un volumen final de 100 µL, donde 10 µL correspondían a RNA (hasta 2000 ng/µL), 10 µL de buffer “DNA-free” y agua libre de nucleasas. Luego del tratamiento, se agregaron 10 µL de “DNase inactivation buffer”, incubando a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g por 10 min, se recuperó la fase acuosa y el RNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol al 100% y 1:10 volumen de acetato de sodio 3 M durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 min a 4°C y el pellet obtenido se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el RNA se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas.

#### **4.3.3 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó por la medición de absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en un equipo espectrofotómetro multi-volúmenes Epoch (Biotek). Para la medición se utilizaron 2 µL de muestra. La pureza de las muestras se determinó mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Sólo se utilizaron muestras cuya razón  $A_{260}/A_{280}$  fuera  $>$  a 1,8 en el caso del DNA y 1,7 para el RNA.

#### **4.3.4 Electroforesis en geles de agarosa**

Con el fin de visualizar las muestras de ácidos nucleicos se utilizaron geles de agarosa al 0,5%, 1% y 2% en TBE 1X (89 mM Tris-Borato, EDTA 2 mM, pH 8,3) teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Las muestras se mezclaron con solución amortiguadora de carga 6X (SDS al 0,5%, glicerol al 25%, EDTA 12 mM y azul de bromofenol al 0,05%). La electroforesis se realizó a 100 V por 30 min. Las muestras se visualizaron mediante el uso de luz ultravioleta a 320 nm.

#### 4.3.5 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia de los genes de interés en base a las secuencias anotadas de los genomas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. Para esto se empleó el programa Geneious, el cual utiliza la herramienta bioinformática Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) como base. Los oligonucleótidos se sintetizaron por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Se seleccionaron partidores de entre 18 a 20 pb, que generen estructuras secundarias débiles y que posean una Tm mayor a 50°C. El diseño de los partidores consideraba una amplificación de entre 150 – 250 pb para PCR en tiempo real. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestran en la Tabla II.

**Tabla II: Oligonucleótidos utilizados para evaluar posibles cambios en los niveles de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis del LPS.**

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	Técnica
16S rRNA (fw)	TGGTGCCTAGCGTACTGAGTG	qRT- PCR
16S rRNA (rev)	CCGAAGGGCACTTCCGCA	qRT- PCR
wzy (fw)	GGCTATGACCTTCTGGGACA	qRT- PCR
wzy (rev)	CGGCCAGATATTCCAGGTAA	qRT- PCR
wzz (fw)	CGGAGGATCAACAACGCTAT	qRT- PCR
wzz (rev)	GCCAGTGCCTTTTCCATATT	qRT- PCR
rfaE (fw)	CGTACTGGTTTGGCAAGGT	qRT- PCR
rfaE (rev)	GTCAGGAATCAGCACCGTCT	qRT- PCR
umu (fw)	ATGCACTGTGATCCGATTCCC	Chequeo cepa
umu (rev)	TCAGACGCGATGCAGCAC	Chequeo cepa
Lferr_0211 (fw)	GGAAGTCAAACGCATGGAAT	Chequeo cepa
Lferr_0211 (rev)	ACACAGGAACCCATCACCAT	Chequeo cepa

#### 4.3.6 PCR convencional

Para confirmar la pureza de cada cepa de *A. ferrooxidans*, se amplificó DNA genómico utilizando partidores específicos para las islas genómicas exclusivas de cada una de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993. Se utilizó el protocolo de la enzima Taq

polimerasa. Cada reacción contenía buffer 10X, dNTPs 10 mM, partidores 10 pM, DNA 10 pg, 1,25 U de Taq DNA polimerasa (New England Biolabs) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Las condiciones para cada reacción fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 2 min, 95°C por 20 s, apareamiento a 50°C por 20 s, elongación a 68°C por 1 min y extensión a 68°C por 10 min, 30 ciclos.

#### **4.3.7 Transcripción inversa**

La obtención de cDNA se realizó mediante transcripción inversa del RNA total. Se utilizaron 0,8 µg de RNA total y 0,5 µg de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamers primers, Promega). Previo al tratamiento, se incubó la mezcla de 5 µL de RNA y los partidores a 70°C por 5 min para la desnaturalización de estructuras secundarias del RNA. Luego se incubó en hielo por 5 min y se agregaron 15 µL de una mezcla de buffer ImProm-II (Promega), dNTPs 0,5 mM c/u, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 U de transcriptasa inversa ImProm-II (Promega). Las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: incubación inicial 10 min a 25°C para inducir la unión de los partidores y luego la síntesis se realizó a 42°C por 1 h. Finalmente se desnaturalizó la transcriptasa a 70°C por 15 min.

#### **4.3.8 PCR en tiempo real**

Para cuantificar la expresión de los genes en respuesta a cobre se realizó qRT-PCR. Para esto, se utilizó el sistema 96-well PikoReal Real-Time PCR System y el software Thermo Scientific PikoReal Software 2.2. Para las mediciones se utilizó 0,5 µL de diluciones 1:20 de cDNA y 1:200 para el caso del 16S rRNA, 0,2 µL de cada partidor 1 µM y 5 µL de master mix Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen) y 4,1 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

#### 4.3.9 Cuantificación por PCR en tiempo real

A partir de tres réplicas biológicas, se utilizó qRT-PCR para cuantificar la expresión de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE*. Basándose en la relación entre el aumento de fluorescencia en las reacciones de PCR se determinó la cuantificación relativa. Esta utiliza la razón de los transcritos de una muestra de estudio con respecto a una muestra control (Pfaffl, 2004). Para esto, se construyeron curvas a partir de diluciones seriadas de DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 en rangos de 10 ng/μL hasta 0,01 ng/μL. Para determinar la expresión relativa fue necesario obtener los valores de “CT”, ciclo en el cual la fluorescencia es exponencial y estadísticamente significativa con respecto al ruido de fondo. Al graficar los valores de CT versus el logaritmo de la concentración de DNA, se obtiene una recta con la cual es posible determinar la eficiencia de los partidores (E). Se consideró como una eficiencia óptima un rango de 90-110%. A partir de los valores de (E) y el CT de las muestras fue posible determinar la expresión relativa de los genes mediante la siguiente fórmula:

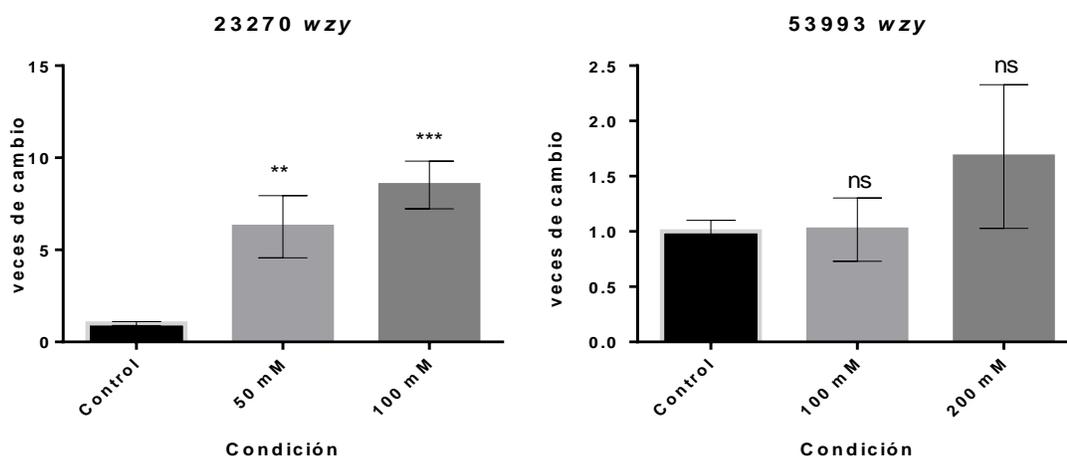
$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E + 1)^{\Delta CT \text{ gen de estudio (condición control-condición experimental)}}}{(E + 1)^{\Delta CT \text{ gen de referencia (condición control-condición experimental)}}$$

Se utilizó el gen 16S de *A. ferrooxidans* como gen de referencia.

## 5. Resultados

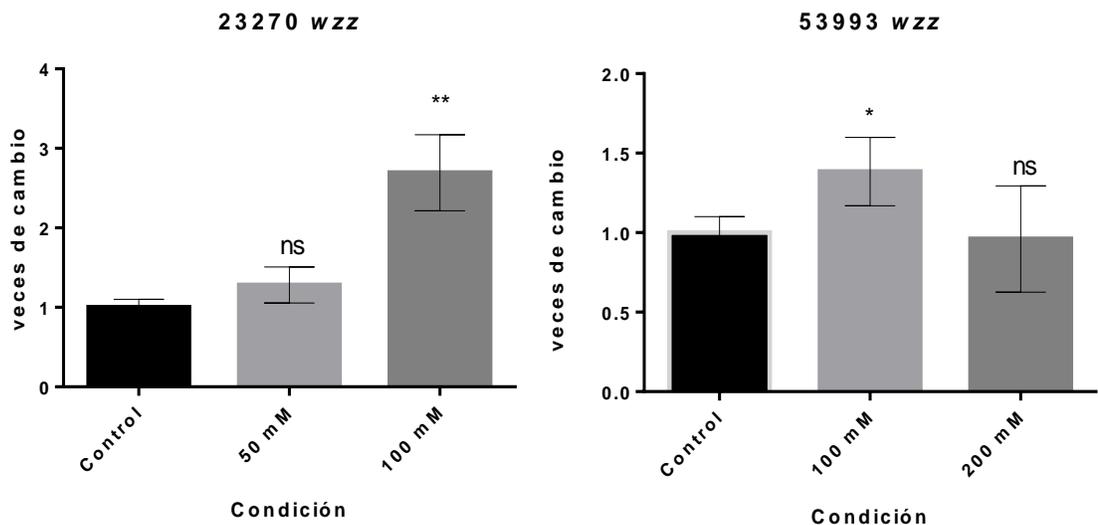
### 5.1 Análisis transcripcional de genes de *A. ferrooxidans* posiblemente involucrados en la síntesis del LPS.

Para determinar si existen cambios en la expresión de genes de *A. ferrooxidans* posiblemente involucrados en la síntesis del LPS, se realizó PCR en tiempo real de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE*, comunes a ambas cepas estudiadas. Este estudio se realizó a las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  ya mencionadas para cada cepa. En el caso del gen *wzy*, que codificaría para una posible antígeno O polimerasa, se observó un aumento en la expresión de más de 5 veces en la cepa 23270, tanto a 50 como a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$  (fig. 5). En esta última condición, la expresión del gen *wzy* aumentó alrededor de 7,5 veces. Por otro lado, en la cepa 53993 no se observaron cambios significativos en los niveles transcripcionales del gen *wzy* cuando la bacteria fue expuesta al metal (fig. 5). Este resultado sugiere que la cepa 23270 podría alterar la síntesis de las cadenas de unidades repetidas de antígeno O, o bien, aumentar la cantidad de LPS en respuesta al cobre.



**Figura 5. Niveles transcripcionales del gen *wzy* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ .** Cada valor se obtuvo a partir de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Se realizó el análisis estadístico t-Student, donde: \*\*\* indica  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$  y ns  $p > 0,05$ .

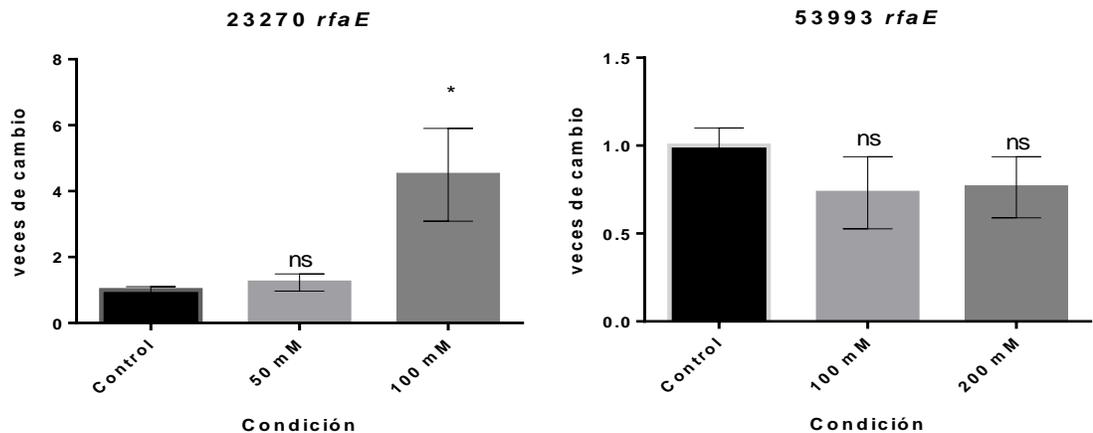
En el caso del gen *wzz*, que codificaría para el determinante de largo de cadena del antígeno O, sólo se observaron diferencias significativas cuando la bacteria se creció a 100 mM de CuSO<sub>4</sub>. La expresión diferencial de este gen en presencia de cobre aumentó 2,5 y 1,5 veces en las cepas 23270 y 53993, respectivamente (Fig. 6). Esto podría indicar que, a 100 mM de CuSO<sub>4</sub>, en la cepa 23270 existiría una mayor regulación del largo de cadenas repetidas del antígeno O al momento de sintetizar este componente del LPS. Es importante notar que en la cepa 53993 no se observó un aumento a 200 mM de CuSO<sub>4</sub>, a pesar de existir un aumento leve a 100 mM.



**Figura 6. Niveles transcripcionales del gen *wzz* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. Las condiciones empleadas fueron como en la fig. 5.**

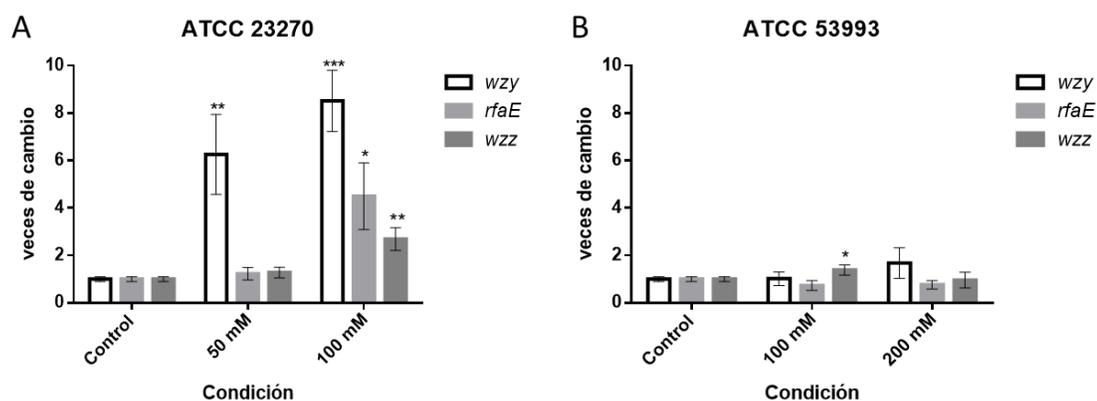
El gen *rfaE*, que codificaría para una proteína bifuncional involucrada en la síntesis del 'core' del LPS, también presentó algunos cambios transcripcionales cuando la bacteria se expuso a cobre. En la cepa 23270 no se observaron diferencias a 50 mM de CuSO<sub>4</sub>, sin embargo, a 100 mM aumentó su expresión en 4 veces (fig. 7). En contraste, en la cepa 53993 no se visualizaron cambios significativos en las condiciones estudiadas (fig. 7). En base a este resultado, se sugiere que la bacteria podría expresar

una mayor cantidad de esta enzima bifuncional, lo que, en conjunto con los resultados transcripcionales previos, podría significar un aumento en la cantidad de LPS producido por la cepa 23270.



**Figura 7. Niveles transcripcionales del gen *rfaE* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. Las condiciones fueron como en la fig. 5.**

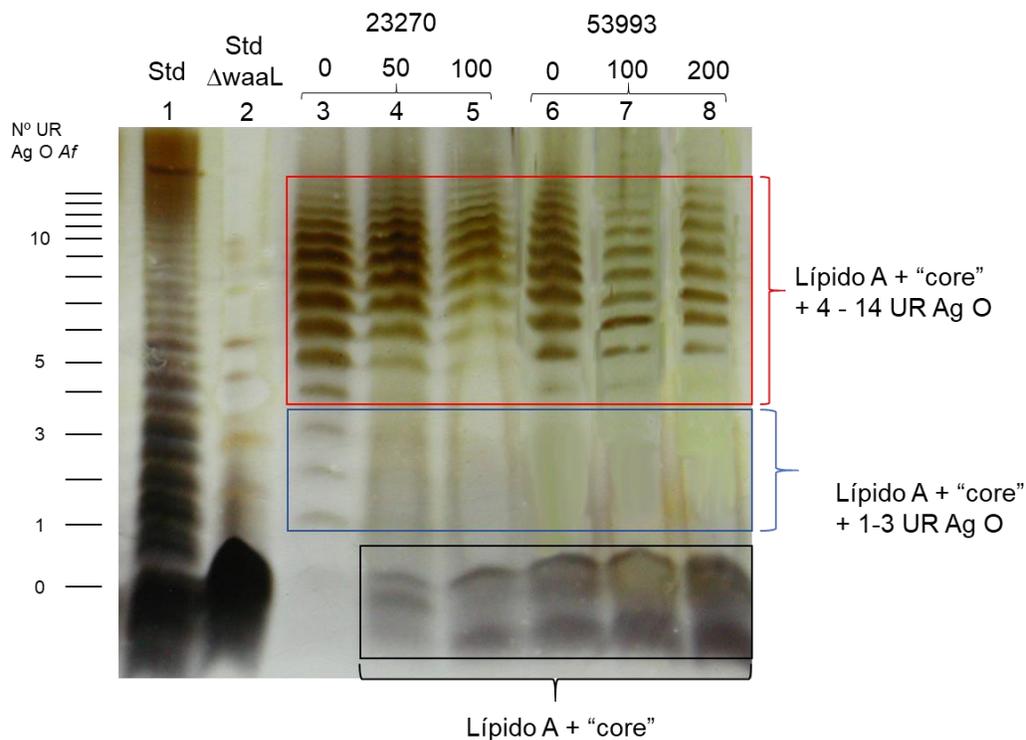
Resulta importante comparar la expresión diferencial de estos genes en la misma cepa. En la figura 8 se compararon los cambios transcripcionales de cada gen por cepa. En la cepa 23270 es donde se observan las mayores diferencias, ya que todos los genes presentan un aumento en su expresión cuando la concentración de CuSO<sub>4</sub> aumenta. El gen *wzy* fue el que mayor cambio presentó, con un aumento de más del doble comparado con el gen *rfaE* y *wzz*. A 50 mM de CuSO<sub>4</sub>, prácticamente no se observaron diferencias entre los genes *rfaE* y *wzz*, sin embargo, a 100 mM, el gen *rfaE* aumentó el doble en comparación con el gen *wzz*. En la cepa 53993, el único gen que presentó cambios leves fue el *wzz*, a 100 mM de CuSO<sub>4</sub>. Los otros genes no presentaron variaciones significativas.



**Figura 8. Comparación transcripcional de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ . (A) Cepa ATCC 23270. (B) Cepa ATCC 53993. Condiciones fueron como en la fig. 5.**

## 5.2 Análisis del LPS a *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993

Para determinar si el cobre afecta a la molécula de LPS, se realizó un TSDS-PAGE utilizando muestras de LPS extraído de células crecidas en las condiciones descritas previamente para cada cepa (fig. 9). A grandes rasgos, no se observan mayores diferencias en el perfil electroforético del LPS cuando las bacterias se exponen a distintas concentraciones de cobre, excepto que en el control sin cobre de la cepa 23270 se observan bandas con un menor número de unidades repetidas (UR) de antígeno O. Los controles sin cobre de ambas cepas son muy similares, por lo que no hay diferencias en el perfil electroforético del LPS entre una cepa y la otra. También se observa la zona correspondiente al lípido A en cada carril. En general, se pueden ver bandas con 5 a 10 UR de antígeno O. No se apreciaron cambios en el largo preferencial o moda de la molécula cuando la bacteria crece en presencia de  $\text{CuSO}_4$ . Esto sugiere que la presencia de cobre no genera cambios en el largo de las cadenas del LPS.

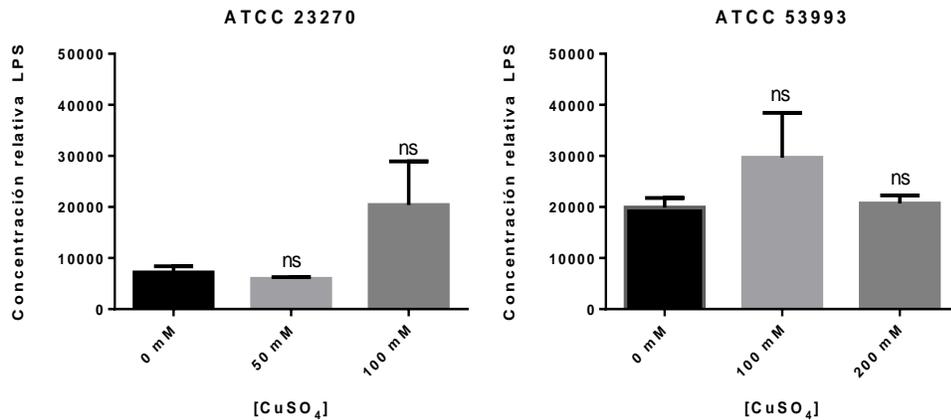


**Figura 9. Comparación del perfil electroforético de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ .** TSDS-PAGE al 12%. Carril 1 y 2 corresponden a LPS WT y LPS  $\Delta\text{WaaL}$  de *S. enterica* utilizados como estándares. Carriles 3 al 8 corresponden a LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (3-5) y ATCC 53993 (6-8), respectivamente. Sobre cada carril se indica la concentración de  $\text{CuSO}_4$  en la cual creció el cultivo. N° UR Ag O se refiere al número de unidades repetidas de antígeno O.

### 5.3 Cuantificación del LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 en presencia de cobre

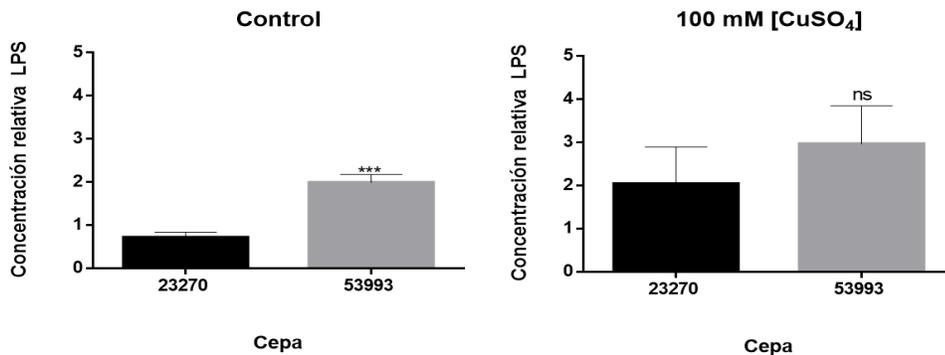
Para evaluar posibles cambios en la cantidad del LPS en ambas cepas de *A. ferrooxidans* en presencia de cobre, se crecieron cultivos bajo distintas concentraciones del metal. Para esto, se utilizaron células previamente adaptadas a la concentración de metal deseada (50 y 100 mM para la cepa 23270; 100 y 200 mM para la 53993). En la cepa 23270 no se observan diferencias en las cantidades de LPS entre las condiciones sin cobre y 50 mM de  $\text{CuSO}_4$  (fig. 10). Al comparar la condición control con la condición 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ , se observa un aumento en la concentración relativa de LPS, la que

sin embargo, no es significativa. La cepa 53993 no presenta mayores variaciones en la concentración relativa de LPS al comparar todas las condiciones estudiadas (fig. 10).



**Figura 10. Concentración relativa de LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecida a distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. Condiciones fueron como en la fig. 5.**

Adicionalmente, se realizaron comparaciones entre ambas cepas en distintas condiciones. Los resultados se observan en la figura 11. En la condición control, la cepa 53993 presenta un aumento de casi tres veces en la concentración relativa de LPS en comparación a la cepa 23270. En el caso de la condición 100 mM de CuSO<sub>4</sub>, no se observaron diferencias significativas, indicando que la cantidad de LPS es similar en ambas cepas.



**Figura 11. Comparación de la concentración relativa de LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 sin cobre y a 100 mM de CuSO<sub>4</sub>. Condiciones fueron como en la fig. 5.**

## 6. Discusión

Diversos estudios en bacterias Gram-negativas indican que la estructura de la membrana externa puede variar según el ambiente en el que se encuentre el microorganismo (Yang y col., 2011). Específicamente, existen estudios que afirman que el LPS puede presentar modificaciones para que la bacteria se adapte al medio externo. En base a esto, altas concentraciones de cobre en el medio externo podrían gatillar modificaciones tanto a nivel de la membrana de externa como del LPS.

En este estudio se evaluó el posible papel del LPS y de algunas proteínas involucradas en su síntesis, frente a la exposición a cobre de *A. ferrooxidans*. Se midieron los niveles transcripcionales del gen que codificara para la proteína RfaE y de los genes de la antígeno O polimerasa (*wzy*) y el determinante del largo de cadena del antígeno O (*wzz*). Previamente, se demostró en nuestro laboratorio que la proteína RfaE, que forma parte de la síntesis del 'core' del LPS, aumentó sus niveles de síntesis en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 en presencia de 40 mM de CuSO<sub>4</sub> (Martínez-Bussenius, 2016). Estas proteínas no están caracterizadas en las cepas estudiadas de *A. ferrooxidans*, sin embargo, comparten los mismos dominios funcionales que las proteínas Wzy, Wzz y RfaE de *E. coli* y *S. enterica*, por lo que sugieren fuertemente que poseen las mismas funciones en *A. ferrooxidans*.

Con respecto a la proteína de membrana interna Wzy, es interesante notar que cuando la bacteria se expuso a cobre, sólo hubo un aumento en la transcripción de este gen en la cepa 23270. El aumento de la transcripción fue proporcional al aumento de la concentración de cobre en el medio externo, indicando que el cobre induciría el aumento de la transcripción de este gen, por lo que también se podría esperar un aumento de la proteína. En este caso, se esperaría una mayor polimerización de las cadenas del

antígeno, las cuales podrían ser utilizadas en la síntesis de nuevas moléculas de LPS. Con la cepa 53993, no se observaron diferencias transcripcionales del *wzy* en presencia de cobre. Esto difiere de estudios transcripcionales y proteómicos no publicados del laboratorio, en los cuales se observa un aumento en la transcripción del gen *wzy* en la cepa 53993. Este resultado se podría explicar porque en dichos estudios no publicados, las células no estaban adaptadas al cobre, lo que podría generar una respuesta más energética de la bacteria a la alta concentración del metal. En cambio, en los estudios del presente trabajo, las células ya estaban adaptadas a las concentraciones de cobre utilizadas, por lo tanto, no existiría esta respuesta diferencial.

Ambas cepas de *A. ferrooxidans* mostraron un aumento en la transcripción del gen *wzz* cuando las bacterias crecieron a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ . En la cepa 23270, el aumento de la transcripción se correlacionó con el aumento de la concentración de cobre del medio extracelular. Contrario a lo que se podría esperar, la cepa 53993 no mostró un aumento significativo en la transcripción de este gen cuando la bacteria creció a 200 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Esto podría sugerir que, debido a la alta concentración del metal, la célula opte por utilizar su energía en la regulación de la maquinaria de resistencia a cobre.

El gen que codifica para la proteína bifuncional RfaE sólo presentó un aumento transcripcional en la cepa 23270, a 100 mM de cobre. En una publicación reciente de nuestro laboratorio, el análisis proteómico de la cepa 53993 dio cuenta de un aumento significativo en los niveles de esta proteína cuando la bacteria es adaptada a 40 mM de  $\text{CuSO}_4$  (Martínez-Bussenius, 2016). Como se expuso anteriormente, las altas concentraciones de cobre utilizadas en el presente estudio podrían explicar por qué no se observó un aumento en la transcripción de este gen, ya que la célula podría estar muy

estresada, por lo que optaría por privilegiar su gasto energético en la regulación de la maquinaria de resistencia a cobre (Martinez-Bussenius y cols., 2017).

Es claro que, ante la presencia de cobre, los tres genes estudiados aumentan de manera significativa en la cepa 23270, no así en la 53993 (fig. 8). Este contraste es interesante, ya que, de manera preliminar, resulta llamativo que en una cepa los genes aumenten su transcripción y en la otra no. La respuesta a esta incógnita podría estar directamente relacionada a los determinantes de resistencia a cobre adicionales que posee la cepa 53993 en su isla genómica. Cuando la cepa 53993 crece en un medio con alta concentración de cobre, se activan sus múltiples mecanismos de resistencia para mantener el cobre intracelular a concentraciones óptimas, mediante sistemas de eflujo, chaperonas, etc. (Orellana y Jerez, 2011). Es por esto que la bacteria no necesitaría modificaciones adicionales para defenderse del cobre. La cepa 23270 no posee estos determinantes de resistencia adicionales, por lo que podría utilizar otras estrategias para mantener el cobre en homeostasis, aparte de los mecanismos de resistencia que posee en su genoma. La naturaleza aniónica del LPS permitiría interacciones con diversos cationes, además de su capacidad de interactuar con metales e incluso formar puentes de hidrógeno con ciertos óxidos de metales. Es posible que esta molécula pueda realizar este tipo de interacciones con el cobre (Jucker y col., 1998). De esta manera, la cepa 23270 podría sintetizar mayor cantidad de LPS, o bien, modificar la molécula en respuesta a una alta concentración del metal. Esta idea se apoya en el aumento de la transcripción de los tres genes analizados en este estudio y que participarían en la síntesis del LPS. Un aumento en el nivel de estas proteínas podría afectar considerablemente la síntesis de esta molécula. Específicamente, el aumento de estas proteínas podría provocar modificaciones en la molécula de LPS, variaciones en su

cantidad exportada a la membrana externa, o ambas, lo que podría conferirle a la bacteria una mayor tolerancia a altas concentraciones de cobre u otros metales

En algunos trabajos, se ha propuesto que las proteínas Wzy, Wzz, Wzx y WaaL, encargadas del transporte, polimerización y ligación del antígeno O a la molécula nascente de LPS, respectivamente, formarían un complejo en el lado periplasmático de la membrana interna de la bacteria (Islam y Lam, 2014). Si bien es cierto que un aumento en los niveles de alguna de estas proteínas (como el caso de la Wzy y Wzz en este trabajo) no asegura que formen un complejo, una buena forma de descartar este supuesto sería medir la transcripción de las proteínas Wzx y WaaL, dado que, si efectivamente formaran un complejo, las cuatro proteínas deberían aumentar sus niveles en conjunto.

Al presentar cambios transcripcionales en los genes *wzy*, y *wzz* en respuesta al cobre, un resultado posible sería la modificación de la molécula de LPS a nivel de antígeno O, produciendo moléculas con distinto número de UR de antígeno O, variando el largo de la molécula completa de LPS. Esto se debería visualizar fácilmente en el perfil electroforético de los LPS. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias importantes en los perfiles de LPS de ambas cepas. Además, hasta el momento no se han descrito genes exclusivos de las islas genómicas de cada cepa que estén relacionados con la síntesis LPS, por lo que no habría motivo para pensar que el perfil electroforético entre ambas cepas fuera distinto.

Tampoco se observan diferencias al comparar los perfiles electroforéticos a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$  entre ambas cepas. Uno de los resultados esperados consistía en que la molécula de LPS podría presentar mayor UR de antígeno O, es decir, tamaños más largos, cuando la bacteria crece en presencia de cobre, interactuando con este, con el

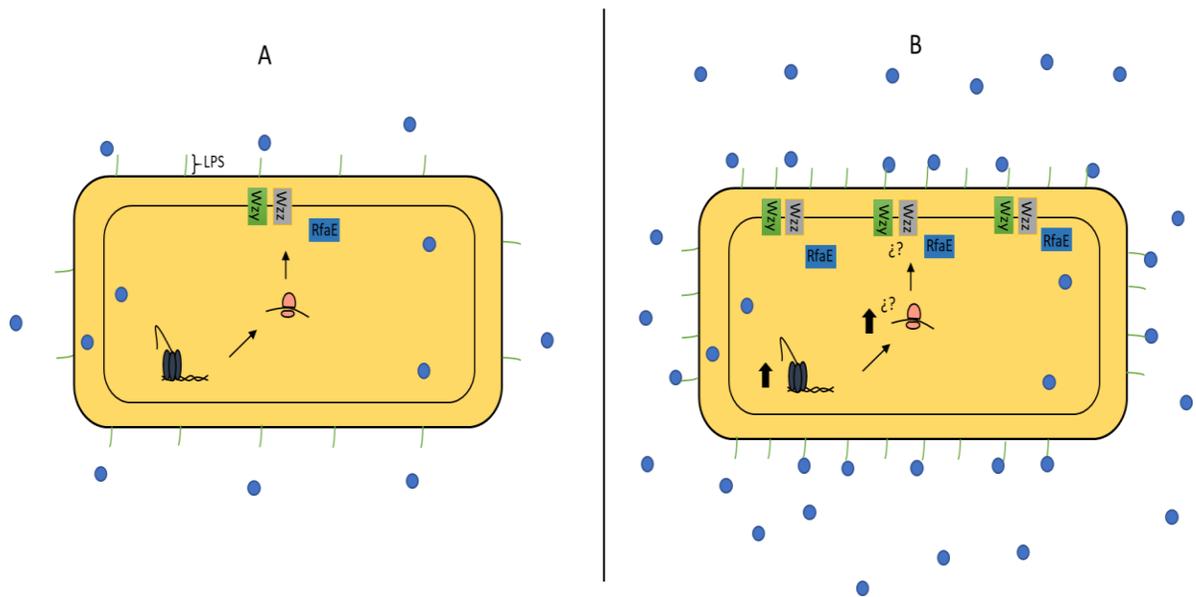
fin de mantener al metal alejado de la célula, como se observó en el estudio de Southam y Beveridge (1993).

La cepa 53993 no presentó cambios en la cantidad de LPS en las condiciones estudiadas. La cepa 23270 no presenta cambios cuantitativos significativos a 0 y 50 mM de  $\text{CuSO}_4$ , sin embargo, se observó una clara tendencia al incremento de la cantidad de LPS a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ . De manera interesante, en esta condición es donde hubo mayor aumento de los transcritos estudiados. Esta alza se puede deber a la necesidad de la bacteria de defenderse de la alta concentración de cobre en el medio externo. Como se describió antes, el LPS posee carga parcialmente negativa, por lo tanto, interactuaría fácilmente con distintos cationes presentes en el medio, como por ejemplo  $\text{Cu}^{+2}$ . Al haber una mayor cantidad de moléculas de LPS en la superficie exterior de la membrana externa de la célula, por simple electrostática, existiría un mayor número de interacciones con cationes como el  $\text{Cu}^{+2}$ . Esto impediría el paso de los cationes hacia la célula, ya que el LPS estaría atrapando al metal, evitando su entrada en la bacteria.

A pesar de que en la cepa 53993 no se observen aumentos de los transcritos estudiados, presentó una cantidad alta de LPS (mayor que la cepa 23270) en la condición sin cobre. Esta cantidad se mantuvo en niveles similares cuando la bacteria se expuso al metal y también fue similar a la cantidad alcanzada por la cepa 23270, indicando que la cepa 23270 aumentaría los niveles de LPS en respuesta al metal, mientras que la cepa 53993 no lo haría debido a que ya posee una mayor cantidad de esta molécula. Tomando esto en cuenta, en la cepa 53993 debería ocurrir el mismo efecto descrito anteriormente con los cationes de  $\text{Cu}^{+2}$ . Además, sus mecanismos de resistencia adicionales a cobre ayudarían a la célula a mantener de mejor manera la homeostasis del cobre.

El aumento transcripcional del gen *rfaE* podría estar relacionado al aumento de los niveles de LPS en la célula, ya que la proteína codificada por este gen está involucrada en la síntesis del 'core' del LPS. Con los resultados proporcionados en este trabajo no se puede inferir si existe alguna modificación en el 'core' del LPS en respuesta al cobre extracelular. Experimentos posteriores podrían determinar si existe alguna modificación en este sector de la molécula que le permita a la bacteria resistir mayores concentraciones de cobre.

En la figura 12 se resume la propuesta de lo que ocurriría en el caso de la cepa 23270 y el LPS cuando la bacteria crece a altas concentraciones de cobre. El metal induciría un aumento del LPS con el fin de tratar resistir las altas concentraciones presentes en el ambiente.



**Figura 12. Propuesta de la posible respuesta del LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a altas concentraciones de cobre.** (A), condición con bajas concentraciones de cobre. Transcripción, traducción y síntesis basal de algunas proteínas posiblemente relacionadas a la síntesis del LPS. (B), condición con altas concentraciones de cobre. Un aumento en la transcripción de genes posiblemente relacionadas a la síntesis de LPS podría provocar un aumento en la traducción y síntesis de estas proteínas. Esto resultaría en un aumento en los niveles de LPS presentes en la bacteria. Las líneas negras representan la membrana interna y externa. El LPS es representado por líneas verdes pequeñas. Las flechas gruesas hacia arriba representan un aumento en la transcripción y traducción.

Se debe considerar que los resultados en este seminario de título son una primera aproximación al rol que podría desempeñar el LPS de *A. ferrooxidans* en la interacción de la bacteria con su entorno, particularmente con metales que podrían existir en el medio. Futuros experimentos deberían ser capaces de determinar de manera específica cual sería el rol que cumple esta molécula frente al estrés por cobre y otros metales. Un posible estudio sería medir los cambios transcripcionales de los genes *wzx* y *waaL* en respuesta a cobre con el objetivo de determinar si aumentan su expresión cuando la bacteria es expuesta al metal. Otro experimento interesante sería realizar una expresión heteróloga de estos genes en *E. coli* y determinar si esto contribuye en el cambio de su MIC de cobre. Para dilucidar las diferencias que presentaron ambas cepas de *A. ferrooxidans* con respecto a los cambios transcripcionales y cambios en la cantidad del LPS, es necesario un estudio que contemple a los determinantes de resistencia a cobre adicionales que posee la cepa 53993.

Este estudio es novedoso dado que en la literatura existen muy pocos trabajos que analicen la síntesis y regulación del LPS en relación con las diversas funciones que cumple esta molécula en la bacteria, sobre todo en microorganismos biomineros. En estas bacterias, la interacción bacteria-metal es fundamental, y como se ha descrito, el LPS podría jugar un rol fundamental en esta interacción, lo que vuelve a esta molécula un foco de estudio importante para el futuro. Debido al rol que tiene *A. ferrooxidans* en la industria del cobre, es importante conocer todos los efectos y modificaciones que el metal puede ocasionar en la bacteria. Así mismo, también es importante determinar cuáles son los mecanismos que la bacteria utiliza para sobrellevar las altas concentraciones de cobre presentes en el ambiente. Este conocimiento podría

emplearse en la optimización de los procesos industriales en los que esta bacteria se vea involucrada.

## 7. Conclusiones

- Los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE* de la cepa 23270 de *A. ferrooxidans* aumentan su transcripción de manera significativa cuando la bacteria crece a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ .
- La cantidad de LPS en la cepa 23270 de *A. ferrooxidans* aumentó cuando la bacteria crece a 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ .
- El perfil electroforético del LPS de las cepas 23270 y 53993 de *A. ferrooxidans* no presentó variaciones cuando la bacteria es expuesta a distintas concentraciones de cobre.
- En las condiciones estudiadas, la cepa 53993 de *A. ferrooxidans* no presentó cambios significativos en los niveles transcripcionales de los genes *wzy*, *wzz* y *rfaE*, ni cambios significativos en la cantidad de LPS.
- La cepa 53993 de *A. ferrooxidans* presenta mayor cantidad de LPS en comparación con la cepa 23270 cuando las bacterias crecen en ausencia de cobre y en presencia del metal, ambas cepas poseen cantidades similares de LPS.

## 8. Bibliografía

Abeyrathne, P.D., Daniels, C., Poon, K.K., Matewish, M.J. & Lam, J.S. 2005. Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* **197**: 3002-3012.

Amaro, A. M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. & Jerez, C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol.* **173**: 910-915.

Arredondo, R., García, A. & Jerez, C.A. 1994. Partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its adhesion to solids. *Appl Environ Microbiol.* **60**: 2846-2851.

Arguello, J. M., Raimunda, D. & Padilla-Benavides, T. 2013. Mechanism of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* **3**: 73.

Consejo Minero 2016. Minería en cifras. Santiago, Chile. Recuperado de [www.consejominero.cl/wp-content/uploads/2016/09/Mineria-en-Cifras-Septiembre-2016.pdf](http://www.consejominero.cl/wp-content/uploads/2016/09/Mineria-en-Cifras-Septiembre-2016.pdf) [consultado el 2.11.16].

Coram, N. & Rawlings, D. 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates south african commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Appl Environ Microbiol.* **68**: 838-845.

Devasia, P., Natarajan, K. & Sathyanarayana, D. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 4051-4055.

Escobar, B., Huerta, G. & Rubio, J. 1997. Influence of lipopolysaccharides on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. *World J Microbiol Biotechnol.* **13**: 593-594.

Franco, A.V., Liu, D. & Reeves, P.R. 1996. A Wzz (Cld) protein determines the chain length of K lipopolysaccharide in *Escherichia coli* O8 and O9 strains. *J Bacteriol.* **178**: 1903-1907.

Friedrich, E. & Whitfield, C. 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J Endotoxin Res.* **11**: 133-144.

Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K. & 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.

Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R.J. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* **5**: 928-938.

Hirt, W.E. & Vestal, J.R. 1975. Physical and chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* lipopolysaccharides. *J Bacteriol.* **123**: 642-650.

Islam, S.T. & Lam, J.S. 2014. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can J Microbiol.* **60**: 697-716.

Jerez, C.A. 2017. Biomining of metals: how to access and exploit natural resource sustainably. *Microb Biotechnol.* **10**: 1191-1193.

Jucker, B.A., Harms, H., Hug, S.J. & Zehnder, B. 1997. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Colloids Surf B.* **9**: 331-343.

Jucker, B.A., Zehnder, B. & Harms, H. 1998. Quantification of polymer interactions in bacterial adhesion. *Environ Sci Technol.* **32**: 2909-2915.

Kalynych, S., Morona, R. & Cygler, M. 2014. Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol Rev.* **38**: 1048-1065.

Knirel, Y.A., Sun, Q., Senchenkova, S.N., Perepelov, A. V., Shashkov, A.S. & Xu, J. 2015. O-antigen modifications providing antigenic diversity of *Shigella flexneri* and underlying genetic mechanisms. *Biochemistry (Mosc).* **80**: 901-914.

Langley, S. & Beveridge, T.J. 1999. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 489-498.

Lesse, A.J., Campagnari, A.A., Bittner, W.E. & Apicella, M.A. 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods*. **126**: 109-117.

Liu, D., Cole, R.A. & Reeves P.R. 1996. An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit flippase. *J Bacteriol*. **178**: 2102-2107.

Lloyd, D.R. & Phillips, D.H. 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res*. **424**: 23-26.

Ma, B., Reynolds, C.M. & Raetz, C.R. 2008. Periplasmic orientation of nascent lipid A in the inner membrane of an *Escherichia coli* *LptA* mutant. *Proc Natl Acad U S A*. **105**: 13823-13828.

Martínez-Bussenius, C., Navarro, C.A., Orellana, L. H., Paradela, A. & Jerez C.A. 2016. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. *J Proteomics*. **145**: 37-45.

Martínez-Bussenius, C., Navarro, C.A. & Jerez, C.A. 2017. Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. *Microbiol Biotechnol*. **10**: 279-295.

Müller-Loenniers, S., Lindner, B. & Brade, H. 2002. Structural analysis of deacylated lipopolysaccharide of *Escherichia coli* strains 2513 (R4 core-type) and F653 (R3 core-type). *Eur J Biochem*. **269**: 5982-5991.

Müller-Loenniers, S., Lindner, B. & Brade, H. 2003. Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis. *J Bio Chem*. **278**: 34090-34101.

Navarro, C.A., Orellana, L. H., Mauriaca, C. & Jerez, C.A. 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl Environ Microbiol*. **75**: 6102-6109.

Nakao, R., Ramstedt, N., Wai, S.N. & Uhlin, B.E. 2012. Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. PLoS One. **7**: e51241.

Nilsson, C., Skoglund, A., Moran, A.P., Annuk, H., Engstrand, L. & Normark, S. 2008. Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases. PLoS One. **3**: e3811.

Olson, G., Brierley, J. & Brierley, C. 2003. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. Appl Environ Microbiol **63**: 249-257.

Orellana, L. H. & Jerez C. A. 2011. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. Appl Microbiol Biotechnol. **92**: 761-767.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol Lett. **26**: 509-515.

Puig, S. & Thiele, D.J. 2002. Molecular mechanism of copper uptake and distribution. Curr Opin Chem Biol. **6**: 171-180.

Queensenberry, M. S. & Lee, Y.C. 1996. A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: application under periodation conditions. Anal Biochem. **234**: 50-55.

Raetz, C.R. & Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu Rev Biochem **71**: 635- 700.

Raetz, C.R., Guan, Z., Ingram, B.O., Six, D.A., Song, F., Wang, X. & Zhao, J. 2009. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. J Lipid Res. **50**(Suppl): S103-S108.

Rawlings, D. 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.

Rochetta, H. L., Burrows, L.L. & Lam, J.S. 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 523-553.

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

Roncero, C. & Casabanan, M.J. 1992. Genetic analysis of the genes involved in synthesis of the lipopolysaccharide core in *Escherichia coli* K-12: three operons in the *rfa* locus. *J Bacteriol.* **174**: 3250-3260.

Ruiz N., Gronenberg, L.S., Kahne, D. & Silhavy, T.J. 2008. Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 5537-5542.

Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G. & Schippers, A. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy.* **59**: 159-175.

Soliz, M. & Stoyanov, J.V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev.* **27**: 183-195.

Southam, G. & Beveridge, T.J. 1993. Examination of lipopolysaccharide (O-Antigen) populations of *Thiobacillus ferrooxidans* from two mine tailings. *Appl Environ Microbiol.* **59**: 1283-1288.

Sperandeo, P., Cescutti, R., Villa, R., Di Benedetto, C., Candia, D., Dehò, G. & Polissi, A. 2007. Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **189**: 244-253.

Sperandeo, P., Lau, F.K., Carpentieri, A., De Castro, C., Molinaro, A., Dehò, G., Silhavy, T.J. & Polissi, A. 2008. Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **190**: 4460-4469.

Tsai, C.M. & Frasch, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* **119**: 115-119.

Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J., & Holmes, D. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics*. **9**: 597.

Valvano, M.A., Marolda, C. L., Bittner, M., Glaskin-Clay, M., Simon, T. L. & Klena, J. D. 2000. The *rfaE* gene from *Escherichia coli* encodes a bifunctional protein involved in biosynthesis of the lipopolysaccharide core precursor ADP-L-glycerol-D-manno-heptose. *J. Bacteriol.* **182**: 488-497.

Wang, W.S., Korczynski, M.S. & Lundgren, D.G. 1970. Cell envelope of an iron-oxidizing bacterium: studies of lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Bacteriol.* **104**: 556-565.

Wang, X. & Quinn, P.J. 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* **49**: 97-107.

Whitfield, C., Amor, P.A. & Köplin, R. 1997. Modulation of the surface architecture of gram-negative bacteria by the action of surface polymer:lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol Microbiol.* **23**: 629-638.

Wu, T., McCandlish A.C., Gronenberg, L.S., Chng S.S., Silhavy, T.J. & Kahne, D. 2006. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 11754-11759.

Yang, Y., Tan, S.N., Glenn, A.M., Harmer, S., Bhargava, S. & Chen, M. 2015. A direct observation of bacterial coverage and biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* on chalcopyrite and pyrite surfaces. *Biofouling.* **31**: 575-586.