

UCH - FC
Biotecnología
A111
C1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Optimización del método de visualización de lipopolisacárido
de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 por medio de
electroforesis en geles de poliacrilamida.

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

por
Valentina Abarca Fuenzalida

Diciembre, 2009
Santiago de Chile

Director:
Dr. Nicolás Guillani G.
Facultad de Ciencias

Co-Director:
Dr. Sergio Álvarez A.
Facultad de Cs. Qcas. y Farmacéuticas





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE VISUALIZACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 POR MEDIO DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA”

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

VALENTINA ESTEFANÍA ABARCA FUENZALIDA

Dr. Nicolás Guiliani Guerin
Director del Seminario

Dr. Sergio Álvarez Armijo
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Presidente Comisión

Mag. María Mercedes Zaldívar San Román
Evaluadora

Se muestran cuatro firmas manuscritas en azul sobre líneas horizontales. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la biblioteca central de la Universidad de Chile, con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE".

Santiago, Diciembre de 2009



Nací el 1º de Julio de 1985 en Santiago. Estudié toda mi vida escolar en el mismo lugar, el Colegio Santa Familia. Ahí forjé gran parte de personalidad y conocí a grandes amigas, que espero tener cerca siempre. Era una buena estudiante en casi todas las áreas, pero siempre me vi atraída hacia la biología. En el año 2004 entré a estudiar una carrera “prometedora para el desarrollo de país”, como se señalaba en algún suplemento de estudios universitarios: “Ingeniería en Biotecnología Molecular”. Daba miedo ese nombre al principio, y en algunos semestres fue una tortura, pero ahora que ya está terminada, no parece tan aterradora. Acá conocí a muchos “ñoñazos”, que además de ser personas brillantes, han sido un apoyo enorme para poder avanzar en el curso de esta carrera.

En 2007, entré al Laboratorio de Comunicación Bacteriana para hacer una unidad de investigación, y se ha convertido en mi segunda casa hasta el día de hoy.

Este año han ocurrido varios hitos: me compré mi primer vehículo motorizado, una Yamaha roja bellísima; entré al programa de Magister de Ciencias Biológicas de esta Facultad, donde pienso extender el trabajo de este seminario, y hoy, 11 de diciembre, me estoy titulando de biotecnóloga. Por fin.

*A mi familia y amigos,
por la comprensión y el apoyo*



Agradecimientos

A mi familia, por haberme apoyado durante toda la vida, por haberme motivado siempre a dar todo de mi parte y por creer que tengo la capacidad de hacer lo que me proponga. Su fe en mí me conmueve y me motiva a ser mejor.

A los Doctores Nicolás Guiliani y Sergio Álvarez, por haberme recibido como su alumna y por enseñarme los primeros pasos en la carrera científica.

A la gente del Laboratorio de Comunicación Bacteriana y del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, por su gran calidad humana y por su eterna disposición en momentos de crisis técnicas o científicas. Muchas Gracias a Páltias, a Cecilia, a Coté, a Flags, a Orwell, a Claudio, a Fernando, a Fran, a Coto, a Rafa, a Simón, a Alex, a Cometa Villa, a Varela, a HP Gordillo y a Juan "Ataos",

A la Profesora Mercedes Zaldivar, a la Dra. Inés Contreras y a la gente del Laboratorio de Microbiología de Enteropatógenos, por haberme recibido con los brazos abiertos en la primera parte de este Seminario de Título. En especial quería destacar a Denisse Bravo por haber dedicado parte de su tiempo a enseñarme a trabajar con la técnica de preparación de LPS.

A Claudia, Grace y Alejandra, por el solo hecho de ser mis amigas. Espero que nuestro lazo no se rompa nunca.

A las LP, han sido un gran descubrimiento, las quiero mucho.

A mis amigos "ñoños". Espero que yo haya sido de tanta ayuda como ustedes lo han sido para mí durante esta carrera. Muchas gracias a Bea, a Matías, a Gaby, a Sonia, a Dany, a Pame, a Andrés, a José y a Cristian.

A FONDECYT (proyecto 1080441) por el financiamiento de este Seminario de Título.



Índice de Contenidos



Índice de Contenidos.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tablas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	viii
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	5
3.2. El Lipopolisacárido.....	6
3.3. Técnica de visualización de LPS en geles de poliacrilamida.....	7
3.4. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y LPS.....	9
3.5. Hipótesis.....	13
3.6. Objetivos.....	14
4. Materiales y Métodos.....	15
4.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	15
4.2. Extracción de LPS de <i>A. ferrooxidans</i>	15
4.2.1. Método de Hitchcock y Brown (1983).....	16
4.2.2. Método de Westphal y Jann (1965).....	17

4.3. Electroforesis en geles de Poliacrilamida SDS-Tricina.....	18
4.4. Tinción con nitrato de plata.....	20
5. Resultados.....	22
5.1. Elección del método de extracción apropiado.....	22
5.1.1. Análisis comparativos de los métodos de extracción.....	22
5.1.2. Método de Hitchcock y Brown.....	24
5.2. Optimización del método de Hitchcock y Brown para <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	26
5.2.1. Análisis del efecto del tiempo de lisis.....	27
5.2.2. Efecto de sonicación.....	28
5.2.3. Incorporación de una extracción con fenol.....	29
5.2.4. Efecto de pH de lisis.....	30
5.2.5. Efecto de diálisis.....	32
5.3. Mejoras de resolución en el gel.....	35
6. Discusión.....	38
7. Conclusiones.....	42
8. Bibliografía.....	44



Índice de Figuras

- Figura 1.** Ejemplo de un perfil electroforético de LPS en SDS-PAGE.
- Figura 2.** Estructura molecular del monómero de antígeno O de *A. ferrooxidans* IFO14262, cepa PH.
- Figura 3.** Perfil electroforético de LPS de *A. ferrooxidans*.
- Figura 4.** Análisis comparativo de métodos de extracción de Hitchcock y Brown y de Westphal y Jann.
- Figura 5.** LPS de *A. ferrooxidans* en diferentes puntos de la curva de crecimiento.
- Figura 6.** LPS de *A. ferrooxidans* en fase exponencial y fase estacionaria.
- Figura 7.** Estudio del efecto de la densidad celular y del tiempo de lisis en el proceso de obtención de LPS de *A. ferrooxidans*.
- Figura 8.** Análisis del efecto de la densidad celular y sonicación en el proceso de extracción de LPS de *A. ferrooxidans*.
- Figura 9.** Análisis del efecto del pH de lisis y de la incorporación de una digestión con DNasa I en el proceso de obtención de LPS de *A. ferrooxidans*.
- Figura 10.** Efecto del pH de lisis y de la incorporación de un paso de diálisis en el procedimiento de extracción de LPS de *A. ferrooxidans*.
- Figura 11.** SDS-PAGE 10%, gel de 17 cm.
- Figura 12.** Comparación del perfil electroforético de LPS de *A. ferrooxidans* crecido en hierro, azufre y tiosulfato.



Índice de Tablas

Tabla I. Composición del gel de TSDS para separa LPS.

Tabla II. Protocolo optimizado de extracción de LPS de *A. ferrooxidans*.



Lista de Abreviaturas

2-ME	2-mercaptoetanol (o β -mercaptoetanol)
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético (del inglés ethylenediaminetetraacetic acid)
EPS	Sustancia poliméricas extracelulares (del inglés extracellular polymeric substance)
LPS	Lipopolisacárido
DO	Densidad óptica
KDO	Ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (del inglés 2-keto-3-deoxyoctonate)
PSA	Persulfato de amonio
RPM	Revoluciones por minuto
UR OAg	Unidades repetidas de antígeno O
S-OAg	Moléculas cortas de antígeno O (del inglés short O antigen)
VL-OAg	Moléculas muy largas de antígeno O (del inglés very long O antigen)

1. Resumen

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria Gram-negativa quimiolitotrófica que participa en el consorcio bacteriano de biolixiviación de minerales. La adherencia de los microorganismos al mineral es determinante en la eficiencia del mecanismo directo de biolixiviación. Existen antecedentes que indican que *A. ferrooxidans* es capaz de modular la composición de ciertas sustancias poliméricas extracelulares ("EPS" en inglés) cuando se cultiva en diferentes condiciones (sustratos energéticos solubles v/s sólidos; sustratos hidrofóbicos v/s cargados). Las células crecidas en azufre elemental no pueden adherirse a pirita, debido a que poseen un EPS no apto para la adherencia a una superficie cargada (la pirita está cargada negativamente a pH 2). Estos resultados sugieren que la bacteria tiene la habilidad de adaptarse a las condiciones ambientales que enfrenta para mejorar el proceso de adherencia.

El lipopolisacárido (LPS) es la molécula más expuesta y más abundante de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Se ha descrito que tiene un rol de importancia en la adherencia a superficies sólidas. En el caso de *A. ferrooxidans*, se ha observado que la remoción parcial del LPS, tiene efectos negativos sobre la adherencia a sustratos minerales como la calcopirita. Esto nos permite inferir que el LPS es importante en el proceso de adherencia al mineral de *A. ferrooxidans*. Entonces, como se ha observado con el EPS, esta bacteria podría ser capaz de modular tanto la síntesis como la estructura misma de su LPS, en respuesta a diferentes condiciones ambientales, y así incrementar la adherencia. Si bien existen algunos trabajos enfocados en estudiar la estructura y composición del LPS de *A. ferrooxidans*, no hay ninguno que haya estudiado la síntesis y función del LPS en esta bacteria.

Una de las técnicas más usadas para el estudio del LPS en bacterias patógenas, es la visualización de su perfil electroforético en geles de poliacrilamida. Este trabajo buscó estandarizar la técnica de visualización del perfil electroforético del LPS de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, con la finalidad de, en estudios posteriores, caracterizar su patrón de migración en diferentes condiciones.

Se realizaron modificaciones a los dos métodos de obtención de LPS más usados en la literatura, la extracción con fenol caliente descrita por Westphal y Jann y el método de Hitchcock y Brown. A pesar que estaba descrita la utilización del protocolo de Westphal y Jann, para extraer LPS de las cepas R2 e IFO 14262 de *A. ferrooxidans*, no se obtuvo resultados satisfactorios en este estudio. La optimización del método de Hitchcock y Brown se enfocó principalmente en el proceso de lisis, ya que se observó que este paso era deficiente en las condiciones señaladas en el protocolo original. Por lo tanto se realizaron modificaciones en el pH de la solución amortiguadora y en el tiempo de lisis. Además, se incorporaron pasos de digestión con DNAsa I y de diálisis de las muestras. También se probó realizar la electroforesis en geles de 17 cm y de gradiente de poliacrilamida para mejorar la resolución.

Los resultados obtenidos muestran que la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* posee una distribución modal entre 5 y 10 unidades repetidas de antígeno O. Adicionalmente, se logró contabilizar hasta 20 unidades repetidas en el gel, que es equivalente a lo reportado anteriormente. En experimentos preliminares, la única diferencia que fue posible observar, fue una menor cantidad de LPS del largo preferencial de *A. ferrooxidans* en la muestras extraídas desde células crecidas en ión ferroso v/s azufre elemental y tiosulfato.

2. Abstract

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative chemolithoautotrophic bacterium involved in bioleaching of ores. The efficiency of the direct bioleaching mechanism depends on the adhesion of microorganisms to the mineral. When it is grown under different conditions (soluble v/s solid energetic substrates; hydrophobic v/s charged substrates), *A. ferrooxidans* is capable of modulating the composition of its extracellular polymeric substances (EPS). The cells grown in elemental sulfur are not able to attach to pyrite (which is negatively charged at pH 2), since they possess an EPS that is not suitable for the attachment to a charged surface. These results suggest that the microorganism has the ability to adapt to the environmental conditions in order to improve the adhesion process.

The lipopolysaccharide (LPS) is the most exposed and abundant molecule of the outer membrane in Gram-negative bacteria. It has been described that it has an important role in the adhesion to solid surfaces. It has been reported that in *A. ferrooxidans* the partial removal of the LPS has negative effects on the attachment to mineral substrates, such as chalcopyrite. This evidence allows us to infer that LPS is important in the mineral adhesion process of *A. ferrooxidans*. As it has been described for the EPS, this bacterium might be capable of modulating the synthesis and the structure of its LPS in response to different environmental conditions.

Although the structure and composition of the LPS of *A. ferrooxidans* has been studied, there are no reports related to the synthesis regulation and function in this bacterium.

One of the most used techniques in the study of LPS in pathogenic bacteria is through electrophoretic profile visualization by polyacrylamide gels. This thesis aims to standardize this technique for LPS from the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 strain, in order to characterize the migration pattern under different conditions

Modifications were carried out of the two most commonly used methods for LPS obtention reported in the literature, the Hitchcock and Brown method and the hot phenol extraction described by Westphal and Jann. Even though the Westphal and Jann method has been previously reported as a successful protocol for LPS extraction from *A. ferrooxidans* strains R2 and IFO 14262, no satisfactory results were obtained with the strain ATCC 23270. The optimization of the Hitchcock and Brown method was mainly focus on the lysis process, because it was observed that this step was deficient in the conditions described in the original protocol. Therefore, modifications were carried out in pH of the lysis buffer and the time of lysis process. Furthermore, steps of DNase I digestion and dialysis of the samples were incorporated. Also, electrophoresis of 17 cm and polyacrilamide gradient gels were tested to improve the resolution of the profile.

The obtained results demonstrated that *A. ferrooxidans* ATCC 23270 possesses a modal distribution between 5 and 10 repeated units of O antigen. Moreover, we were able to detect up to 20 repeated units of O antigen, which is equivalent to what has been reported previously. In addition, in our experimental conditions, it appears that the ATCC 23270 strain produces a lower amount of LPS at the modal distribution level in cells grown on ferrous iron compared to sulfur and thiosulphate grown cells.

3. Introducción

3.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria acidófila Gram-negativa que obtiene energía a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre e ión ferroso. Este microorganismo forma parte del consorcio bacteriano que participa en la biolixiviación de minerales de cobre, uranio y oro (Devasia y col., 1993). Actualmente en Chile el 5% del cobre producido se obtiene mediante biolixiviación, y se proyecta un aumento acelerado de su aplicación, debido a que permite ampliar considerablemente las reservas de cobre económicamente explotables en el país. (Orozco, 2009).

La adherencia al sustrato mineral es crítica para el mecanismo directo de biolixiviación (Devasia y col., 1993), de modo que las estructuras superficiales de la bacteria son de gran relevancia en la eficiencia del proceso (Sand y col., 2001). Existen estudios que señalan que la disolución de sustratos minerales por bacterias lixiviantes, como *A. ferrooxidans*, involucra la adherencia al mineral mediada por sustancias poliméricas extracelulares ("EPS" en inglés) (Gehrke y col., 1998; 2001). Cuando *A. ferrooxidans* es crecido en pirita (FeS_2), el EPS que produce tiene una alta concentración de ácido glucurónico, el cual forma un complejo con el ión férrico recién oxidado por la bacteria. Esta especie es la que ataca químicamente al mineral y lixivia los metales de interés, por lo tanto, la capa de EPS es el espacio físico donde ocurre la disolución del mineral (Rohwerder y col., 2003).

Está descrito que *A. ferrooxidans* produce una composición diferente de EPS dependiendo de las condiciones de crecimiento (pirita v/s azufre elemental, superficie cargada negativamente v/s superficie apolar), sugiriendo que la bacteria

es capaz de modular la producción de estas estructuras superficiales, en función de las diferentes condiciones ambientales que enfrenta (Gehrke y col., 1998; 2001; Rohwerder y col., 2003).

3.2. El Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal y la molécula más expuesta de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por lo tanto está en contacto directo con el ambiente y podría mediar la interacción inicial con el sustrato.

Está documentado en *Pseudomonas aeruginosa* que cambios en la composición o estructura del LPS de esta bacteria, alteran su capacidad de adherencia a superficies sólidas (Williams y Fletcher, 1996; Rocchetta y col., 1999). Experimentos de espectrometría infrarroja señalan que a bajas concentraciones, las moléculas de LPS desplazan a las moléculas de agua unidas a la superficie de ciertos óxidos de metales, y que a concentraciones más altas se pueden establecer puentes de hidrógeno entre el LPS y la superficie del óxido de metal (Jucker y col., 1997; 1998). Estos resultados sugieren que esta estructura superficial tiene un rol importante en la adherencia de la bacteria a los sustratos sólidos.

EL LPS es una molécula anfipática, constituida por:

- una parte hidrofóbica, correspondiente al lípido A, que está formada por un disacárido fosforilado y acilado con cadenas de ácidos grasos hidroxilados. Esta porción es parte integral de la membrana externa (Raetz, 1990; Raetz y Whitfield, 2002).

- una parte hidrofílica que está compuesta por el oligosacárido central o "core", y más hacia el exterior, por el polisacárido O. El "core" está conformado por un oligosacárido con cierto nivel de conservación, que puede o no presentar fosforilaciones, y tiene como función mantener la integridad de la membrana. Esto se logra por medio de interacciones cruzadas entre los grupos fosfato y cationes bivalentes. En el "core" se pueden encontrar dos azúcares poco usuales: heptosas y KDO (del inglés 2-keto-3-deoxyoctonate). El polisacárido O, o antígeno O, es la región más expuesta del LPS. Consiste en un polímero de un oligosacárido formado generalmente por residuos de cuatro a seis azúcares que está ligado al "core". Puede tener hasta 100 repeticiones de la unidad oligosacáridica (Raetz, 1990; Raetz y Whitfield, 2002). El número de unidades repetidas de antígeno O presenta un número preferencial o distribución modal para cada especie.

La distribución de los largos de cadena de antígeno O y la cantidad del LPS producido, puede ser analizado en geles de poliacrilamida de Tricina-SDS (TSDS-PAGE) (Hitchcock y Brown, 1983; Schägger, 2006). En bacterias enteropatógenas está descrita la regulación de la síntesis del antígeno O durante las fases de crecimiento, que afecta tanto la cantidad producida, como la distribución de largos de cadena (Carter y col., 2007; Bravo y col., 2008).

3.3. Técnica de visualización de LPS en geles de poliacrilamida.

Esta técnica es ampliamente usada en microorganismos patógenos, donde el antígeno O es un importante factor de virulencia (Hoare y col., 2006; Carter y col.,

2007; Bravo y col., 2008). Dicho procedimiento consta de 3 partes: la obtención de LPS, la electroforesis en geles de poliacrilamida y la tinción del gel.

La obtención de LPS puede realizarse mediante el método de extracción con fenol caliente (Westphal y Jann, 1965), o por el método de Hitchcock y Brown (1983), que es similar a una preparación de proteínas totales al cual se le agrega un paso de proteólisis con Proteinasa K. Después de su obtención, las muestras de LPS se analizan por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se han usado diferentes detergentes y amortiguadores de corrida para mejorar la resolución, tanto a alto (glicina) como a bajo peso molecular (tricina) (Marolda y col., 2006). El gel finalmente se tiñe para poder observar el perfil electroforético. Aunque existen varios tipos de tinción, la más comúnmente usada es la tinción con nitrato de plata (Tsai y Frasch, 1982).

El perfil electroforético de LPS tiene un patrón de tipo escalera (fig. 1), debido a que el LPS total de la célula está compuesto por moléculas de diferente grado de polimerización de antígeno O, por lo tanto lo que se observa en el perfil es la distribución de largos de cadena. Cada banda corresponde a una molécula de LPS con una unidad de antígeno O más que la molécula de la banda inmediatamente inferior. Con este tipo de análisis es posible definir para una especie determinada, el o los largos preferenciales de las moléculas de LPS, es decir la distribución modal (por ejemplo, S-OAg y VL-OAg, fig. 1).

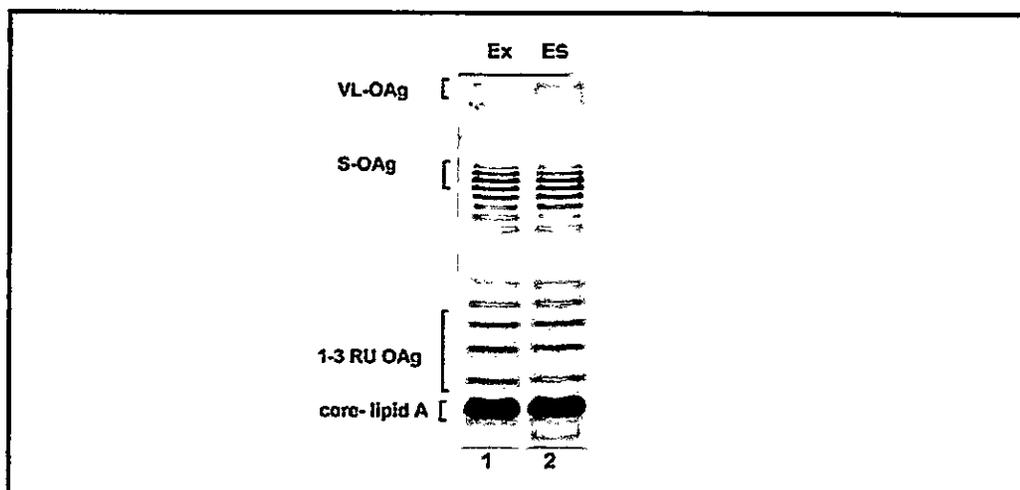


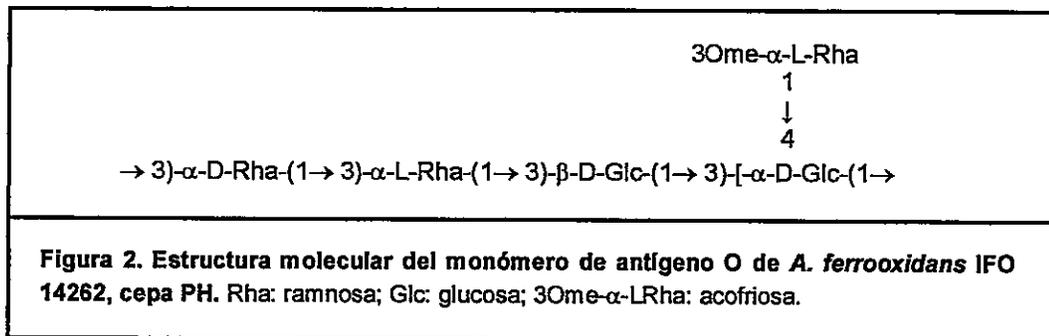
Figura 1. Ejemplo de un perfil electroforético de LPS en Tricina-SDS-PAGE. LPS de *Shigella flexneri* cepa 2457T $\Delta rfaH/(rfaH^+)$ en fase exponencial (Ex) y estacionaria (Es). Están indicadas las diferentes partes de la molécula de LPS. "1-3 RU OAg", 1 a 3 unidades repetidas de antígeno O, "S-OAg" y "VL-OAg" indican los largos preferenciales o distribución modal de esta bacteria (modas corta y muy larga respectivamente) (Carter y col., 2007).

3.4. *Acidithiobacillus ferrooxidans* y LPS

Por ser un importante factor de virulencia, existe una gran cantidad de antecedentes relacionados con la estructura, función, biosíntesis y regulación del LPS en bacterias patógenas. Sin embargo, en microorganismos biomineros, la investigación es escasa y está principalmente enfocada a definir la estructura y composición de la molécula (Wang y col., 1970; Vestal y Hirt, 1975; Yokota y col., 1987; 1988). En el caso de *A. ferrooxidans*, hasta la fecha, ningún estudio se ha dedicado a caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la síntesis de LPS, ni en la relación de ésta regulación con la función de la molécula en la bacteria. Tampoco se ha estudiado la relación entre la estructura del LPS y la expresión de los genes involucrados en su biosíntesis.

Está descrito que el LPS de *A. ferrooxidans* cepa TM, tiene baja concentración de fósforo (Wang y col., 1970; Vestal y Hirt, 1975). Esto probablemente se deba a la necesidad de esta bacteria acidófila de mantener la carga de la membrana ligeramente positiva para repeler los protones de su entorno.

Se ha descrito que las cepas R2 e IFO 14262 (cepa PH) de *A. ferrooxidans* y la cepa IFO 13724 de *A. thiooxidans* comparten el mismo esqueleto disacárido de lípido A (Yokota y col., 1987). Éste está compuesto por glucosamina y 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa. Además, para la cepa IFO 14262 de *A. ferrooxidans*, se identificó la estructura de la unidad monomérica del antígeno O (fig. 2), y se determinó que en esta cepa el número de repeticiones llega a 20 (Vinogradov y col., 1994).



Según Yokota y col. (1988), no existen diferencias en la estructura química ni en el perfil electroforético del LPS extraído desde células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre elemental e ión ferroso (fig. 3A). Estos resultados contrastan con los publicados por Hirt y Vestal (1975), que indican que se observan diferencias tanto en el contenido de azúcares (hexosamina, KDO y heptosas), como en la composición de ácidos grasos del LPS. En este trabajo no se reportaron experimentos de visualización del perfil electroforético de LPS

Respecto a la adherencia de *A. ferrooxidans* a superficies sólidas y el efecto que el LPS podría tener en ésta, el trabajo de Arredondo y col. (1994) señala que la remoción parcial del LPS de *A. ferrooxidans* cepa R2, por medio de incubaciones con solución amortiguadora con pH mayor a 3,5 (fig. 3B), produce una mayor exposición de las proteínas de membrana externa, lo que incrementa la hidrofobicidad de la superficie de la bacteria, y genera un aumento en la adherencia celular a un sustrato hidrofóbico. Por otra parte, Escobar y col. (1997) señalan que en *A. ferrooxidans* ATCC 19859, la pérdida parcial de LPS por medio de un tratamiento con EDTA, tiene efectos negativos sobre la adherencia a sustratos minerales como calcopirita o pirita. Estos antecedentes indican que el LPS afecta positiva o negativamente la adherencia de la bacteria dependiendo del tipo de sustrato sólido, lo que sugiere que las condiciones ambientales (por ejemplo, sustrato polar v/s apolar) podrían afectar la regulación de la síntesis de LPS en función del tipo de mineral.

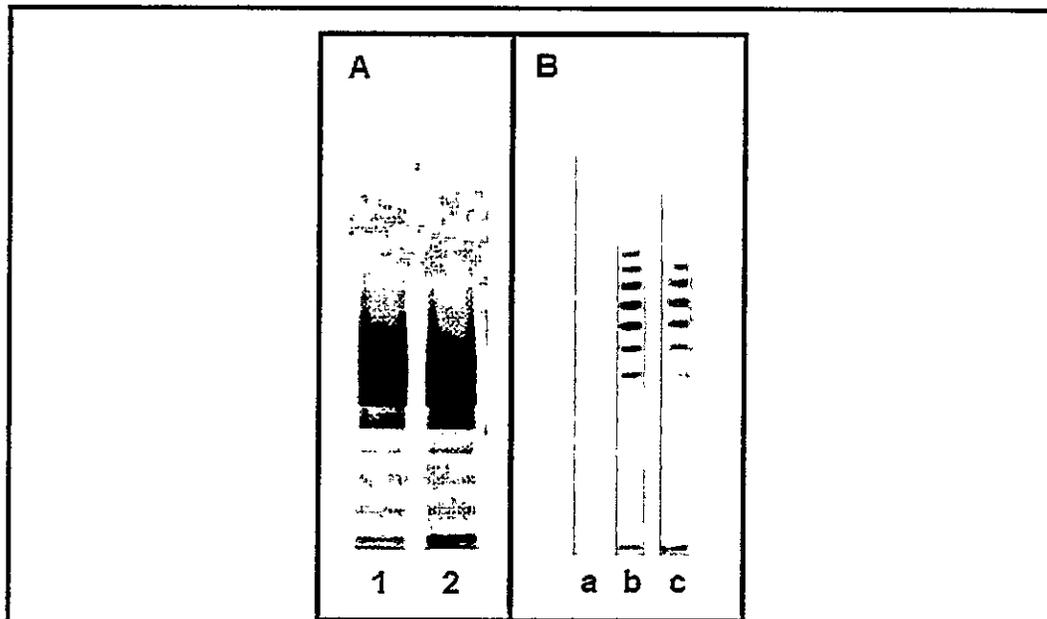


Figura 3. Perfil electroforético de LPS de *A. ferrooxidans*. A, LPS de células de *Thiobacillus ferrooxidans* IFO 14262, crecidas en ión ferroso (1), en azufre elemental (2) (Yokota y col. 1988); B, LPS de *Thiobacillus ferrooxidans* R2 obtenido a partir de sobrenadante de cultivo previamente incubados a en solución amortiguadora pH 1,5 (a), 6,8 (b) y 8,0 (c), en este caso las células se marcaron con un pulso de ^{14}C , y luego el gel se reveló por autoradiografía (Arredondo y col., 1994).

Los trabajos mencionados anteriormente se han realizado en cepas de *A. ferrooxidans* que no cuentan con su genoma secuenciado, y muchas de ellas no se encuentran disponibles para usarlas como modelo de estudio. El hecho de disponer del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 permite realizar estudios de expresión de los genes de biosíntesis de LPS, y experimentos de complementación heteróloga para analizar la funcionalidad de estos genes.

Nos pareció interesante entonces, trabajar con la cepa ATCC 23270 para poder aproximarse mejor a la función de la molécula de LPS en el proceso de adherencia al mineral.

3.5. Hipótesis

El pH óptimo de crecimiento de *A. ferrooxidans* es de 1,8, pero el pH intracelular es de 6,5 (Baker-Austin y Dopson, 2007). Para mantener la homeostasis de pH, existen varios mecanismos descritos que tienen como objetivo evitar la entrada de protones al citoplasma, incluyendo la presencia de una pared celular más rígida. Esta pared complica la experimentación con estas bacterias, ya que las hacen resistentes a los tratamientos de lisis que se usan comúnmente para organismos neutrófilos. Es por eso que se deben adaptar las técnicas utilizadas rutinariamente para proteobacterias, como *E. coli*, para lograr extraer proteínas y ácidos nucleicos en bacterias acidófilas como *A. ferrooxidans*.

Se ha reportado que distintas cepas de *A. ferrooxidans* muestran alta heterogeneidad, tanto a nivel filogenético (Karavaiko y col., 2003), como en el perfil electroforético de LPS (Southam y Beveridge, 1993). En este último trabajo, se observó que algunos aislados fueron más recalcitrantes que otros al tratamiento de extracción de LPS. De esta manera es posible que la cepa ATCC 23270 presente una mayor o menor renuencia a la metodología de obtención de LPS que las cepas ya estudiadas.

En base a lo anterior, hemos desarrollado la siguiente hipótesis de trabajo:

- Es posible optimizar la visualización del perfil electroforético de LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, adaptando para este microorganismo acidófilo los protocolos de extracción usados en otras bacterias Gram-negativas.

3.6. Objetivos

El objetivo de este trabajo es optimizar la técnica de visualización del perfil de LPS de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* en geles de poliacrilamida. Para ello se optó por las siguientes aproximaciones:

1.- Ensayar los métodos de extracción de LPS de Hitchcock y Brown, y de Westphal y Jann, y determinar cuál es el más apropiado para *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

2.- Realizar la modificaciones apropiadas, tanto del método de extracción, como de la técnica electroforética, si es necesario, para mejorar la visualización del perfil de LPS de esta cepa de *A. ferrooxidans*.

4. Materiales y Métodos

4.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270 se cultivó a 30 °C con agitación en 3 sustratos energéticos diferentes: ión ferroso, azufre elemental y tiosulfato.

Para el crecimiento en Fe⁺² se utilizó el medio 9K a pH 1,45, que contenía: 33,3 g/l de FeSO₄ × 7 H₂O; 0,4 g/l de MgSO₄ × 7 H₂O; 0,1 g/l de (NH₄)₂SO₄; 0,04 g/l de KH₂PO₄ × 3 H₂O (Amaro y cols., 1991).

Los cultivos en azufre elemental, se realizaron también en el medio 9K, pero el ión ferroso se reemplazó por 50 g/l de perlas de azufre esterilizadas previamente, ajustando el pH del medio a 2,5 (Ramírez y col., 2004; Arredondo y col., 1994).

Para los cultivos en tiosulfato, se utilizó el medio DSMZ 71 [3 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l de MgSO₄ × 7 H₂O, 0,25 g/l de CaCl₂ × 2 H₂O, 3 g/l de KH₂PO₄ y 5 g/l de Na₂S₂O₃ × 5 H₂O]. El medio se preparó sin tiosulfato, se esterilizó por autoclave. El tiosulfato se agregó al momento de inocular. Se pesó la cantidad adecuada de tiosulfato para el volumen de cultivo a realizar, se disolvió en agua destilada y se esterilizó por filtración (con filtro de 0,22 μm) antes de agregar al medio fresco.

El crecimiento bacteriano se monitoreó por medio de recuento del número de células del sobrenadante de cultivo en una cámara Petroff-Hausser.

4.2. Extracción de LPS de *A. ferrooxidans*.

Se utilizaron cultivos en fase exponencial de *A. ferrooxidans* crecidos en los diferentes medios. Las células crecidas en azufre elemental, tiosulfato e ión ferroso se colectaron por centrifugación a 3500 x g por 10 min a temperatura ambiente y se

lavaron tres veces con agua ácida ajustada a pH 2 con H₂SO₄. En el caso de las células crecidas en ión ferroso, se realizó un lavado con agua ácida y dos lavados con citrato de sodio 10 mM, pH 7, para finalmente resuspender las células en agua ácida. Para normalizar el número inicial de bacterias, se midió la densidad óptica de la suspensión celular y se ajustó a diferentes densidades ópticas (DO_{600nm} 2, 4, 6 u 8) en un volumen final de 1,5 ml de agua ácida.

Para la obtención del LPS de *A. ferrooxidans* se probaron dos métodos y se realizaron ciertas modificaciones.

4.2.1. Método de Hitchcock y Brown (1983).

La suspensión de bacterias se centrifugó a 12000 × g por 2 min. El precipitado celular se resuspendió en 90 µl de la solución amortiguadora de lisis (SDS 2%; 2-ME 4%; Glicerol 10%; Azul de Bromofenol 0,002%; Tris-HCl 1 M pH 6,8). Alternativamente, esta solución se ajustó a pH 9. Luego, para lisar las células, la suspensión fue hervida durante 10, 15, 30 o 45 min según se indique. Después, este lisado fue digerido con 100 µg/ml DNAsa I (30 min o 90 min, 37 °C, 5 mM MgCl₂), con 1 mg/ml Proteinasa K (90 min, 60 °C) y fue dializado usando una membrana de nitrocelulosa de 0,025 µm de poro contra agua nanopura durante 40 min, para eliminar DNA, proteínas y sales, respectivamente. Los pasos de digestión con DNAsa I y de diálisis se incorporaron al protocolo a medida que avanzaba la ejecución de este seminario de título.

Para mejorar la calidad de las muestras, se incorporó un segundo paso de extracción de residuos peptídicos con fenol (Marolda y col., 2006). La primera parte de este procedimiento es equivalente a lo mencionado en el párrafo anterior, diferenciándose en la composición de la solución amortiguadora de lisis utilizada

(SDS 2%; 2-ME 4%; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8). Después de la digestión con Proteinasa K, se agregó un volumen de fenol 90% (fenol saturado básico 90%; 2-ME 0,1%; 8-hidroxiquinolina 0,2%) y se incubó a 65 °C por 15 min, con homogenización por vórtex cada 5 min. Luego, se incubó por 10 min en hielo para después centrifugar a 13000 x g por 10 min a 4 °C. La fase acuosa (80~100 µl) fue transferida a un tubo limpio, se le agregó 500 µl de etil-éter saturado con Tris-EDTA y se mezcló varias veces por inversión. La solución de éter saturado con Tris-EDTA se preparó con 2 volúmenes de Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM, y 5 volúmenes de etil-éter, se agitó vigorosamente y se usó la fase orgánica. Este paso se realiza para extraer las trazas de fenol presentes en la muestra. Luego se centrifugó a 13000 x g por 1 min a 4 °C y se descartó la fase orgánica. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 3X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8; SDS 6%; glicerol 30%; 2-ME 15%; azul de bromofenol 0,06%) y de almacenaron a 4 °C.

4.2.2. Método de Westphal y Jann (1965).

Este método consiste en una extracción con fenol caliente. A diferencia del protocolo anterior, requiere la deshidratación de las células. La suspensión de bacterias se centrifugó a 12000 × g por 2 min. El precipitado celular se suspendió en 500 µl de una solución cloroformo:metanol (1:1), y se centrifugó a 6000 x g. Se descartó el sobrenadante y se repitió tres veces. Después el precipitado celular se resuspendió en 500 µl etanol y incubó de 16 a 18 h a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g y se lavó tres veces con acetona, con centrifugaciones a 13000 x g. El precipitado se resuspendió en 100 µl de éter etílico y los tubos se dejaron abiertos alrededor de una hora bajo campana para evaporar el éter. Al

precipitado deshidratado se le adicionaron 200 μ l de fenol 90% (solución descrita en el método de Hitchcock y Brown) y 200 μ l agua bidestilada, ambos precalentados a 65 °C. Esta mezcla se incubó a 65 °C por 20 min y se agitó cada 5 min. Después se incubó por 10 min en hielo para luego centrifugar por 20 min a 13000 x g. Se recuperó la fase acuosa. La fase orgánica fue limpiada dos veces con agua, con el fin de extraer la mayor cantidad de LPS; finalmente se juntaron las tres fracciones acuosas obtenidas.

Según el método de Westphal y Jann, en este punto se debe realizar una diálisis de las fase acuosas durante 48 h para eliminar las trazas de fenol, pero optamos por realizar dos extracciones con éter saturado de Tris-EDTA (solución descrita en el método de Hitchcock y Brown), debido a que con este procedimiento se cumple el objetivo de extraer las trazas de fenol remanente, y además toma menos tiempo. Luego se procedió a concentrar la muestra por medio de centrifugación al vacío a 60 °C para eliminar cualquier residuo volátil, hasta un volumen menor a 50 μ l. Después se diluyó en 2 ml de agua bidestilada y se ultracentrifugó a 100000 x g por 4 h a 4 °C. El sobrenadante se volvió a ultracentrifugar dos veces más. Los tres precipitados obtenidos se resuspendieron en 100 μ l de agua bidestilada y se les adicionó 50 μ l de amortiguador de carga 3X. Las muestras se guardaron a 4 °C.

4.3. Electroforesis en geles de Poliacrilamida SDS-Tricina

Las muestras de LPS fueron analizadas en geles de Poliacrilamida SDS-Tricina (TSDS) (Lesse y cols., 1990). Los geles se prepararon al 12% de acrilamida total, a menos que se señale otra cosa. Los volúmenes de los

componentes del gel para el sistema Mini-Protean 3 Biorad® están detallados la tabla 1.

La composición de la solución amortiguadora del ánodo (cámara inferior) es de 0,2 M Tris-HCl pH 8,9, y la de la solución amortiguadora del cátodo (cámara superior) es de 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M 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 para separar LPS

Soluciones	Gel Separador (12%)	Gel Concentrador
49,5% acrilamida total 6% bisacrilamida	1250 μ l	-
49,5% acrilamida total 3% bisacrilamida	-	250 μ l
Solución amortiguadora del gel (Tris-HCl 3M, pH 8,45, SDS 0,3%)	1660 μ l	775 μ l
Glicerol	520 μ l	-
H ₂ O Bidestilada	1560 μ l	2100 μ l
TEMED	6 μ l	6 μ l
PSA 10%	100 μ l	100 μ l

Para mejorar la resolución, también se trabajó con geles de 17 cm que permiten una corrida más larga. En esos casos, se corrió a 50 V por 90 min y a 150 V por alrededor de 16 h a 4 °C para evitar que la cámara se caliente.

También, se realizaron electroforesis en geles de 17 cm con gradiente 7-15% de acrilamida total. Este tipo de gel se preparó con un sistema que tiene dos vasos cónicos comunicados por un tubo con una llave de paso. Uno de los vasos, tiene una manguera de salida de la solución de acrilamida. Este vaso también tiene instalado un homogenizador. Se prepararon dos soluciones de acrilamida, una al

15% y otra al 7%. La solución más concentrada se vertió en el vaso que tiene la manguera y la más diluida en el otro. La manguera se colocó en el molde del gel. Cuando estuvo todo listo se encendió el homogenizador, se abrió la llave de paso entre ambos vasos y se comenzó a llenar el molde. El voltaje de corrida fue equivalente a lo descrito en el párrafo anterior. Este tipo de electroforesis permite resolver bien en un mismo gel bandas de alto y de bajo peso molecular.

4.4. Tinción con nitrato de plata

Existen varios métodos de detección de LPS desde geles de poliacrimamida: la tinción con sulfato de zinc, es un método rápido, pero de baja resolución; la tinción comercial ProQ Emeralds 300 de Molecular Probes®, que es altamente sensible, ya que usa fluorescencia para teñir; Western Blot, es un método muy específico y sensible cuando se cuenta con los anticuerpos para la cepa de interés; y la tinción con nitrato de plata descrita por Tsai y Frasch (1982), que es más sensible que la tinción con sulfato de zinc, y más barata que el método ProQ Emeralds 300.

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 sumerge en una solución de fijación (etanol 40%, ácido acético glacial 10% en agua bidestilada) durante 16 a 20 h. Después, se incuba durante 10 min con agitación, en una solución de oxidación (etanol 40%, ácido acético glacial 10%, 0,7% periodato de sodio, en agua bidestilada). Luego, se realizan tres lavados con agua bidestilada durante 10 min con agitación. Después, el gel se tiñe con 150 ml de una solución que contiene 2,8 ml de NaOH 1N, 3 ml amoníaco 25% (v/v), 1 g de AgNO_3 y se afora con agua bidestilada. El gel se lava tres veces con agua bidestilada durante 10 min con agitación. Se revela de 5 a 20 min en 250 ml de solución que contiene 12,5 mg de

5. Resultados

5.1. Elección del método de extracción apropiado.

Al iniciar este trabajo, existían 7 publicaciones que se referían a la preparación de LPS de *A. ferrooxidans*. En estos trabajos se utilizaron dos protocolos diferentes para extraer LPS en este microorganismo:

- El método de Westphal y Jann, que se ha usado anteriormente con las cepas R2, TM e IFO 14262 de *A. ferrooxidans* para análisis de tipo estructural, como de resonancia magnética nuclear (Yokota y col., 1988; Vinogradov y col., 1994), espectrometría infrarroja (Rodríguez y col., 1986), espectrometría de masa acoplada a cromatografía de gases (Vestal y Hirt, 1975; Yokota y col., 1987), y para estudios electroforéticos (Yokota y col., 1987; 1988).

- El método de Hitchcock y Brown sólo se ha usado para estudiar el perfil electroforético mediante SDS-PAGE desde aislados de drenajes mineros y de la cepa R2 de *A. ferrooxidans*, mediante tinción con nitrato de plata (Southam y Beveridge, 1993), o revelado por medio de autoradiografía (Arredondo y col., 1994).

En este trabajo decidimos probar ambos métodos para estudiar el perfil electroforético de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*.

5.1.1. Análisis comparativos de los métodos de extracción.

El protocolo de Westphal y Jann es un método más complejo que el de Hitchcock y Brown, pero se han observado resultados exitosos con ambas

metodologías en publicaciones anteriores (Yokota y col., 1987; 1988; Southam y Beveridge, 1993). En este trabajo se obtuvo resultados equivalentes con ambos protocolos (fig. 4). Se observó el perfil de LPS de manera muy tenue y poco resuelto en las bandas de peso molecular medio-alto (desde la 5ª banda de abajo hacia arriba).

No se pudo determinar con claridad el largo preferencial de la molécula de LPS de *A. ferrooxidans*.

Debido a que el método de Westphal y Jann, no genera una mejor visualización del perfil de LPS, y que además, es más engorroso que el método de Hitchcock y Brown, se decidió optimizar este último protocolo para *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

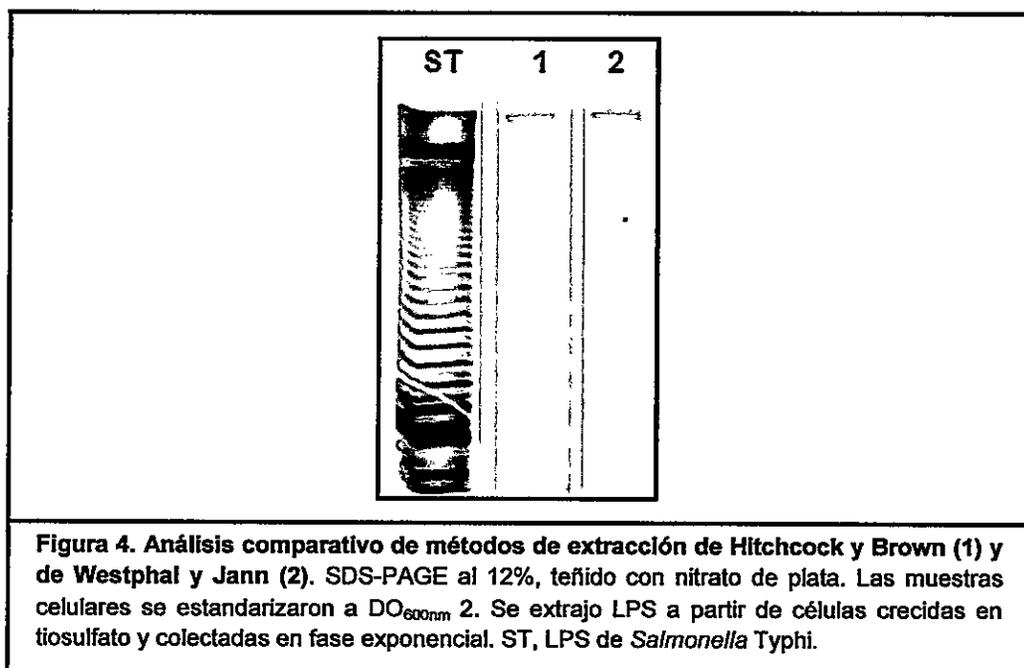


Figura 4. Análisis comparativo de métodos de extracción de Hitchcock y Brown (1) y de Westphal y Jann (2). SDS-PAGE al 12%, teñido con nitrato de plata. Las muestras celulares se estandarizaron a DO_{600nm} 2. Se extrajo LPS a partir de células crecidas en tiosulfato y colectadas en fase exponencial. ST, LPS de *Salmonella Typhi*.

5.1.2. Método de Hitchcock y Brown.

Los primeros experimentos con este método se realizaron con las mismas indicaciones metodológicas usadas para bacterias de la familia enterobacteriaceae (Hoare y col., 2006; Carter y col., 2007; Bravo y col., 2008). Inicialmente, se preparó LPS en distintos momentos de la curva de crecimiento de un cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en medio de tiosulfato (fig. 5A). Las bandas obtenidas de esta manera (fig. 5B) son mucho más tenues que cuando este método se aplica en *Shigella flexneri* (fig. 1, p. 8). Este resultado fue obtenido en numerosas ocasiones. Si bien dos geles independientes teñidos independientemente con plata no son necesariamente comparables, el resultado sugiere que con este método se obtiene para *A. ferrooxidans* menos LPS que en el caso de microorganismos enteropatógenos.

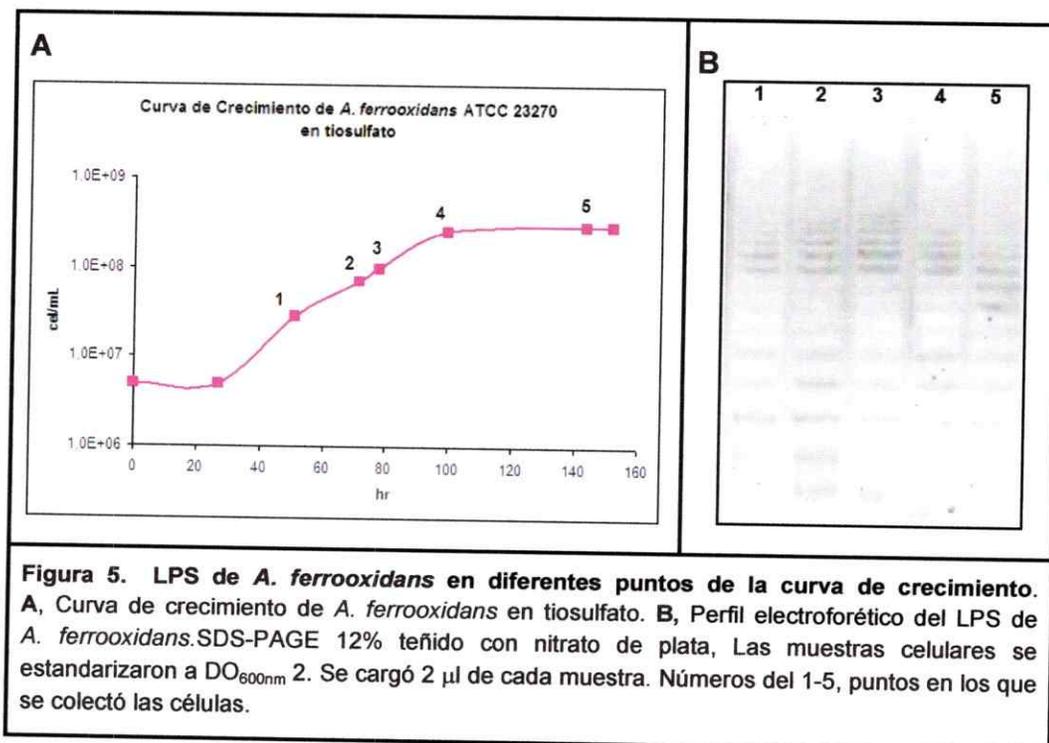


Figura 5. LPS de *A. ferrooxidans* en diferentes puntos de la curva de crecimiento. A, Curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato. B, Perfil electroforético del LPS de *A. ferrooxidans*. SDS-PAGE 12% teñido con nitrato de plata. Las muestras celulares se estandarizaron a DO_{600nm} 2. Se cargó 2 μ l de cada muestra. Números del 1-5, puntos en los que se colectó las células.

Para poder observar de mejor manera el perfil del LPS se decidió modificar la cantidad de muestra cargada en el gel. Se utilizó una preparación de LPS extraído de células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato hasta fase exponencial, temprana y tardía, y fase estacionaria (fig. 6). Al aplicar 6 μ l se observa con mayor claridad el patrón característico de tipo escalera, distinguiéndose moléculas con diferente cantidad de unidades repetidas. Además, aparecen bandas de mayor peso molecular, correspondientes probablemente al largo preferencial del LPS de *A. ferrooxidans* (fig. 6, marco azul).

La resolución de este gel y la cantidad de LPS obtenidos no fueron suficientemente buenas como para observar eventuales diferencias entre los patrones de LPS extraídos desde células de *A. ferrooxidans* provenientes de fases de crecimiento distintas, ni tampoco determinar con precisión el número de unidades repetidas de antígeno O. Además, se puede observar una banda fuera del patrón de tipo escalera, que podría corresponder a proteínas no hidrólizadas (fig. 6, marco rojo).

Por esto, se decidió primero optimizar el método de extracción antes de seguir trabajando con muestras de diferentes condiciones biológicas. Desde este punto en adelante, todos los experimentos mostrados, a menos que se señale lo contrario, corresponden a muestras extraídas desde cultivos crecidos en tiosulfato en fase exponencial.

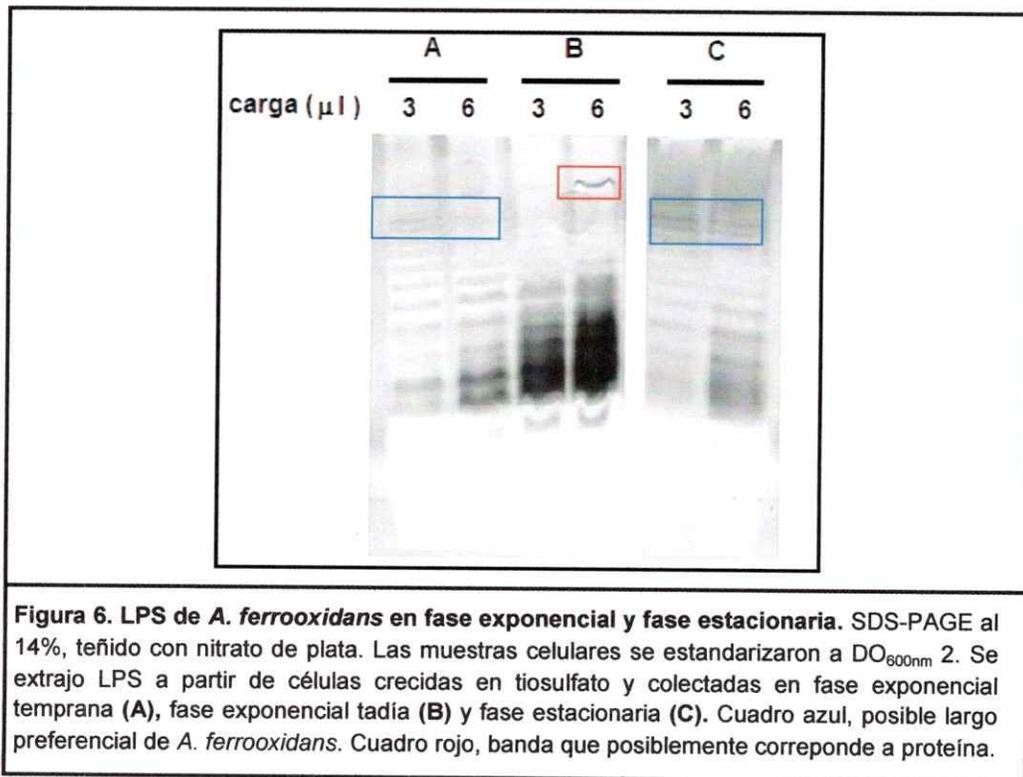


Figura 6. LPS de *A. ferrooxidans* en fase exponencial y fase estacionaria. SDS-PAGE al 14%, teñido con nitrato de plata. Las muestras celulares se estandarizaron a DO_{600nm} 2. Se extrajo LPS a partir de células crecidas en tiosulfato y colectadas en fase exponencial temprana (A), fase exponencial tardía (B) y fase estacionaria (C). Cuadro azul, posible largo preferencial de *A. ferrooxidans*. Cuadro rojo, banda que posiblemente corresponde a proteína.

5.2. Optimización del método de Hitchcock y Brown para *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Durante los experimentos iniciales fue evidente la presencia de un precipitado celular remanente de células luego del paso de lisis a 100 °C. Esto no ocurrió cuando este procedimiento se realizó a partir de microorganismos enteropatógenos, para los cuales la lisis suele ser completa. Así, el bajo rendimiento de nuestra preparación podría resultar de un baja eficiencia en la lisis de las células de *A. ferrooxidans*. Esto nos indicó que ese paso pudiese ser crítico y, por ende, se intentó optimizarlo mediante tres estrategias: i) aumento del tiempo de incubación a los 100 °C, ii) incorporación de un paso de sonicación, iii) aumento del pH del amortiguador de lisis.

Adicionalmente, con el objeto de mejorar la preparación y obtener un LPS más concentrado, se estandarizó la suspensión bacteriana a DO_{600nm} 4, 6 u 8.

5.2.1. Análisis del efecto del tiempo de lisis

Se realizaron algunos ensayos de extensión del tiempo de lisis y se observó que se disminuía parcialmente el precipitado de células remanente. Sin embargo, no se observó una mejora sustancial en el perfil de LPS (fig. 7), comparado con los resultados anteriores (fig. 6). Independientemente, y debido a que se produjo una disminución del sedimento remanente, de todas maneras se adoptó un tiempo de lisis de 30 min para los experimentos posteriores.

Adicionalmente, en este experimento se trabajó con mayores concentraciones celulares (estandarizadas a DO_{600nm} 4 y 6). En esos casos, se observó que el precipitado celular remanente era mayor que cuando se usaba DO_{600nm} 2, pero de todas maneras disminuía con la extensión del tiempo de lisis.

No obstante, en el perfil electroforético de estas muestras se distinguen claramente bandas de bajo peso molecular (probablemente "core" y "core" + 1 unidad repetida), aunque, no es posible distinguir la distribución modal o el largo preferencial del LPS de *A. ferrooxidans*.

Por otra parte, en el perfil se observan bandas "anómalas" de bajo peso molecular (fig. 7, marco rojo), que mientras más concentrada es la muestra, más pronunciado es el efecto. Esto podría deberse a la presencia de sales o de otros contaminantes celulares en la muestra. Este efecto fue observado repetidas veces en experimentos posteriores.

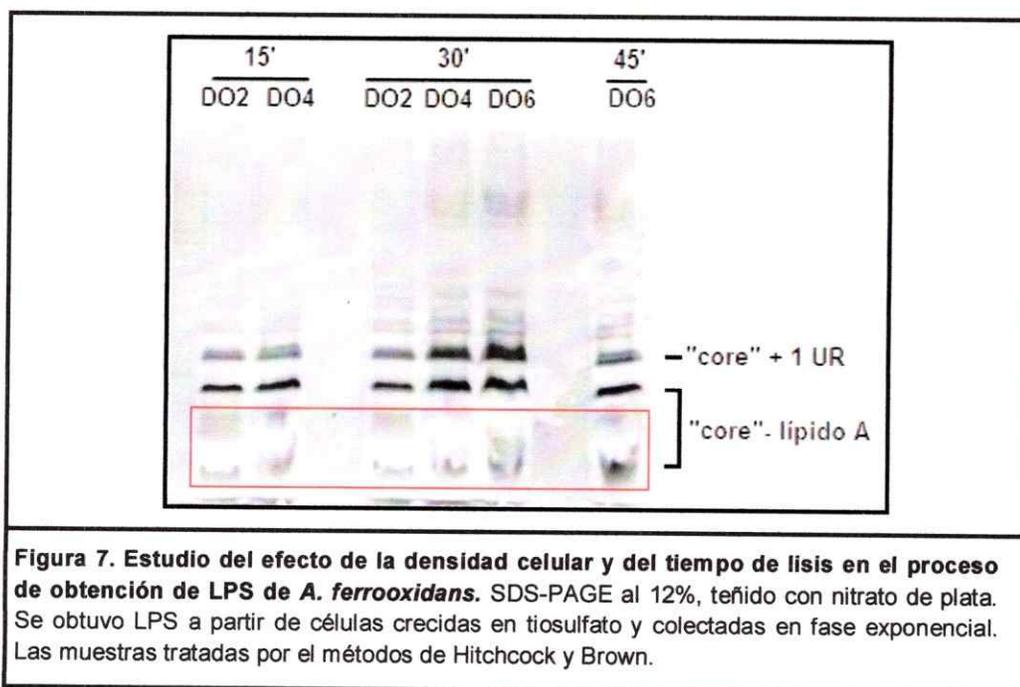


Figura 7. Estudio del efecto de la densidad celular y del tiempo de lisis en el proceso de obtención de LPS de *A. ferrooxidans*. SDS-PAGE al 12%, tefido con nitrato de plata. Se obtuvo LPS a partir de células crecidas en tiosulfato y colectadas en fase exponencial. Las muestras tratadas por el métodos de Hitchcock y Brown.

5.2.2. Efecto de sonicación

La sonicación es un procedimiento exitoso para lisar células de *A. ferrooxidans*. De hecho, es una técnica utilizada para la preparación de proteínas de esta bacteria (Guiliani y col., 2000). No está descrito un paso de sonicación en ninguno de los métodos comunes de preparación de LPS, por lo que no era del todo claro si la sonicación podría afectar la integridad física de la molécula de LPS.

El paso de sonicación se aplicó a la suspensión celular obtenida con el amortiguador de lisis, antes de calentar las células. Luego de completado el proceso (sonicación + 30 min de lisis a 100 °C) se observó una disminución del precipitado celular remanente, respecto a las muestras que no fueron sonicadas, sugiriendo que este procedimiento mejoraba la lisis. No obstante, al comparar el perfil electroforético de muestras con diferentes concentraciones iniciales de células

que fueron sometidas al procedimiento normal (N), o que fueron sonicadas previo al tratamiento de lisis a 100 °C (S). No fue apreciable un efecto categórico del tratamiento con sonicación en el patrón de migración ni en la intensidad de las bandas (fig. 8).

Como era de esperar, el aumento inicial de bacterias durante la preparación, aumentó la intensidad del perfil obtenido. Esto es particularmente notorio en moléculas de mayor migración (fig. 8).

Debido a que no se obtuvieron mejoras en el perfil de LPS, la sonicación no se incluyó en el protocolo en experimentos posteriores.

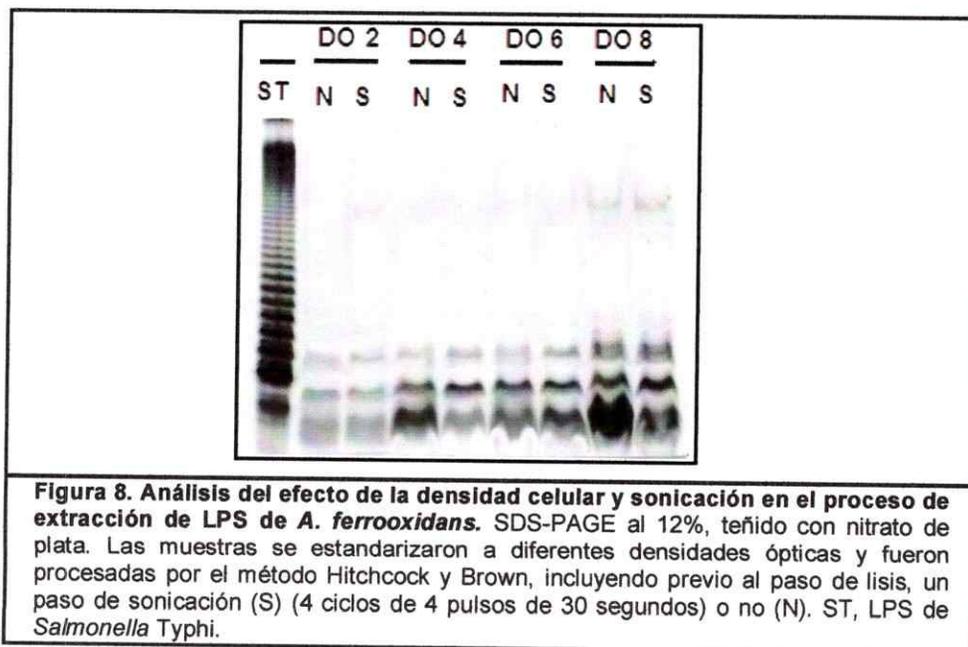


Figura 8. Análisis del efecto de la densidad celular y sonicación en el proceso de extracción de LPS de *A. ferrooxidans*. SDS-PAGE al 12%, teñido con nitrato de plata. Las muestras se estandarizaron a diferentes densidades ópticas y fueron procesadas por el método Hitchcock y Brown, incluyendo previo al paso de lisis, un paso de sonicación (S) (4 ciclos de 4 pulsos de 30 segundos) o no (N). ST, LPS de *Salmonella Typhi*.

5.2.3. Incorporación de una extracción con fenol

En el perfil electroforético algunos experimentos se percibieron bandas que podrían corresponder a proteínas no hidrolizadas (fig. 6, p. 23, marco rojo). Esto no ocurrió en todos los casos, pero de todas maneras era un resultado común. Por

esto se decidió analizar el efecto de un paso de extracción con fenol para eliminar los posibles residuos proteicos remanentes en la muestra, después de la digestión con Proteinasa K. Cuando se probó esta metodología se observó que se perdía una cantidad de LPS con la extracción. Los perfiles eran muy tenues a pesar de cargar una gran cantidad de muestra o de usar una mayor cantidad de células desde el inicio (resultado no mostrado). Por esto, el paso de extracción con fenol no se siguió utilizando en experimentos posteriores.

5.2.4. Efecto de pH de lisis

En cultivos de laboratorio, *A. ferrooxidans* se crece a pH que comprenden el rango entre 1,45 y 4,7, pero es capaz de crecer en condiciones incluso más ácidas. Concentraciones de protones menores desestabilizan su envoltura, afectando su viabilidad (Arredondo y col., 1994). Por esto se decidió realizar la lisis con el amortiguador ajustado a un pH más básico (pH 9) para optimizar el proceso. Esto presentaba el inconveniente que el pH óptimo de actividad de la Proteinasa K está entre 7 - 8, lo que podría generar una proteólisis ineficiente. Por esto también se probó realizar la lisis a pH 9 y luego diluir la muestra en solución amortiguadora más concentrada y con el pH ajustado a 6,8, equivalente al amortiguador normal.

Los resultados muestran que la lisis a pH 9 aumentó ostensiblemente el rendimiento de la preparación de LPS, lo que mejoró notablemente el perfil electroforético respecto a la preparación a pH 6,8 (fig. 9). No obstante, en estas preparaciones se observó un "background" oscuro en el perfil, a la altura de las bandas de peso molecular medio y alto (fig. 9). En el caso de las muestras a las que se les ajustó el pH con amortiguador pH 6,8 después de la lisis, se observa un perfil un poco más tenue que en las muestras a las que no se les ajustó el pH. Esto

tiene sentido debido a que estas muestras están más diluidas. A pesar del “background”, en el perfil obtenido a partir de las células lisadas a pH 9 se observaron moléculas de bajo peso molecular y moléculas de mayor grado de polimerización que podrían corresponder a la distribución modal del LPS de esta bacteria (fig. 9, marcos rojos).

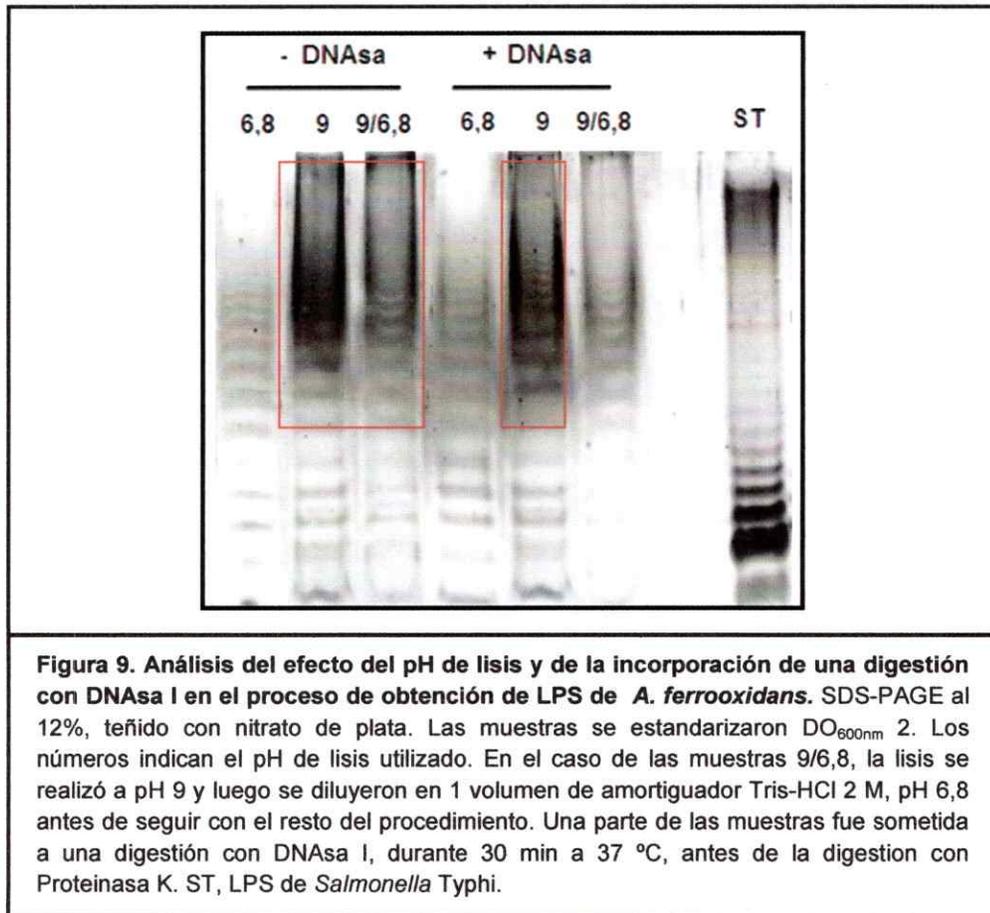


Figura 9. Análisis del efecto del pH de lisis y de la incorporación de una digestión con DNAsa I en el proceso de obtención de LPS de *A. ferrooxidans*. SDS-PAGE al 12%, teñido con nitrato de plata. Las muestras se estandarizaron DO_{600nm} 2. Los números indican el pH de lisis utilizado. En el caso de las muestras 9/6,8, la lisis se realizó a pH 9 y luego se diluyeron en 1 volumen de amortiguador Tris-HCl 2 M, pH 6,8 antes de seguir con el resto del procedimiento. Una parte de las muestras fue sometida a una digestión con DNAsa I, durante 30 min a 37 °C, antes de la digestión con Proteinasa K. ST, LPS de *Salmonella* Typhi.

Si bien al realizar la lisis a pH 9 se logró eliminar el “precipitado celular” remanente, estas muestras resultaron notablemente más viscosas que las sometidas al tratamiento normal, lo que dificultaba su aplicación en el gel. En el artículo de Marolda y col. (2006), se señala que las muestras presentan una alta viscosidad, por lo general, cuando se preparan a partir de suspensiones celulares

muy concentradas y que mayoritariamente se debe al DNA presente en la muestra. Esto tiene sentido con lo observado en el perfil, debido a que el DNA también se tiñe con plata y esto podría generar el “background” oscuro. En estos casos, Marolda y col. (2006) sugieren que se realice una digestión con DNAsa I durante 30 min antes de la proteólisis con Proteinasa K.

El tratamiento con DNAsa I disminuyó notablemente la viscosidad de las muestras. Respecto al “background” oscuro que se observó en las muestras lisadas a pH 9, este disminuyó parcialmente en las muestras digeridas con DNAsa I, sugiriendo que el “background” efectivamente corresponde a DNA. De hecho, digestiones más extensas de 90 min, atenuaron aún más este efecto (resultado no mostrado).

En conjunto estas observaciones indican que la lisis de *A. ferrooxidans* es más eficiente a pH 9.

5.2.5. Efecto de diálisis

En la figura 9, se puede apreciar que las muestras digeridas a pH 9 presentan una migración “anómala” en las bandas de menor peso molecular (las bandas se ven curvas), algo parecido a lo observado en las muestras que se preparaban a partir de una densidad celular muy alta (fig. 7 y 8, p. 25 y 26). Este efecto fue más notorio en muestras concentradas cuando la lisis se realizó a pH 9, y más tenue en muestras con menor cantidad de células. Las muestras que eran lisadas a pH 9, y luego diluidas en amortiguador a pH 6,8, tenían muy pocas veces este efecto y era por lo general más débil. Esta última observación relativa a la dilución de las muestras, sugería que esta migración “anómala” pudiese deberse a la presencia de una alta concentración de sales. Se intentó entonces, disminuir el

volumen de muestra cargada sin mermar en la relación calidad/cantidad de LPS. Sin embargo incluso con 6 μ l de carga se presentó este fenómeno. Por otro lado, se trató de aumentar los lavados de las células antes de iniciar la lisis, pero tampoco generó cambios mayores. Finalmente, se optó por dializar las muestras en membranas de nitrocelulosa contra agua nanopura (fig. 10A).

Este tratamiento se tradujo en la desaparición de las bandas "anómalas" de bajo peso molecular y en una mejor definición del perfil electroforético de LPS. De este modo, se pudo detectar entre 15 y 16 unidades repetidas de antígeno O (fig. 10A, carriles c sin diálisis y b y c con diálisis). Utilizando análisis densitométrico, se logró determinar que el largo preferencial de la cadena de antígeno O del LPS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, se encuentra entre la 5ª y 10ª unidad repetida (fig. 10B).

Cabe destacar que la muestra c sin diálisis de la figura 10A, no presenta la migración "anómala" de las de las moléculas de bajo peso molecular, a pesar de no haber sido dializada. Esto puede deberse a que esta muestra fue diluida en amortiguador para ajustar el pH a 6,8 antes de la digestión con DNasa I. En todas las muestras se cargó el mismo volumen, por lo que la concentración de sales en esta muestra se diluyó al ajustar el pH, y por lo tanto se cargó menos sal en la electroforesis.

En conclusión, los cambios en el pH de lisis, la incorporación de la digestión con DNasa I, y finalmente, la diálisis mejoraron notablemente la calidad de las muestras y la visualización de perfil de LPS de *A. ferrooxidans* (fig. 10A).

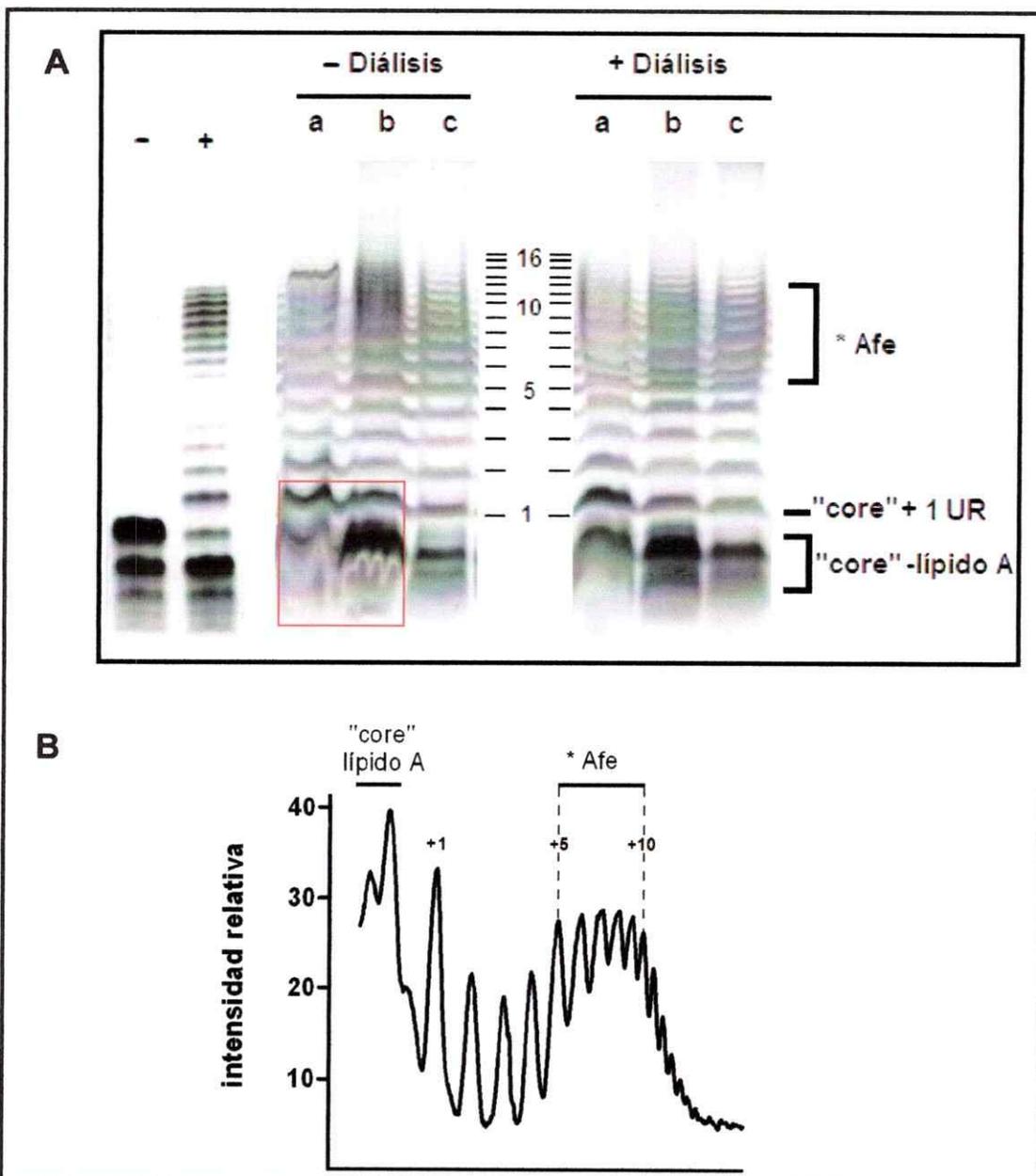


Figura 10. Efecto del pH de lisis y de la incorporación de un paso de diálisis en el procedimiento de extracción de LPS de *A. ferrooxidans*. **A**, SDS-PAGE 12%, teñido con nitrato de plata. El paso de lisis se realizó a pH 6,8 (a) o a pH 9 (b y c). Todas las muestras fueron tratadas con DNAsa I directamente (a y b) o después de ajustar el pH a 6,8 (c). Al finalizar el proceso las muestras se dializaron o no durante 40 min contra agua nanopura en una membrana de nitrocelulosa de 0,025 μm de poro. En rojo se marca las bandas de bajo peso molecular con migración "anómala". Controles, LPS de *Shigella flexneri*, mutante Δwzy sin antígeno O, (-); cepa silvestre con antígeno O normal (+). **B**, Determinación de las regiones "core- lipido A" y "largo preferencial" mediante análisis densitométrico de las bandas presentes en el carril c de las muestras dializadas, obtenido con el programa UN-SCANT-IT gel software (Silk Scientific) . "core"+ 1 UR, "core" más una unidad repetida de antígeno O; *Afe, altura a la que se ubica el largo preferencial de *A. ferrooxidans*.

5.3. Mejoras de resolución en el gel.

Después de optimizar la extracción de LPS con los pasos de lisis a pH 9, la digestión con DNAsa I y la diálisis, decidimos analizar si el uso de geles más largos permitía mejorar la resolución del patrón de LPS (fig. 11). Se puede observar que el gel extendido, aumenta notablemente la resolución de las moléculas de LPS de *A. ferrooxidans*. El resultado obtenido sugiere que la distribución modal de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* podría ser de 5 a 12 unidades repetidas de antígeno O (fig. 11). Las moléculas de bajo peso molecular se ven mucho más difusas. Sin embargo, en este gel se pueden observar entre 17 y 18 unidades de antígeno O, es decir, dos más que en los mini-geles.

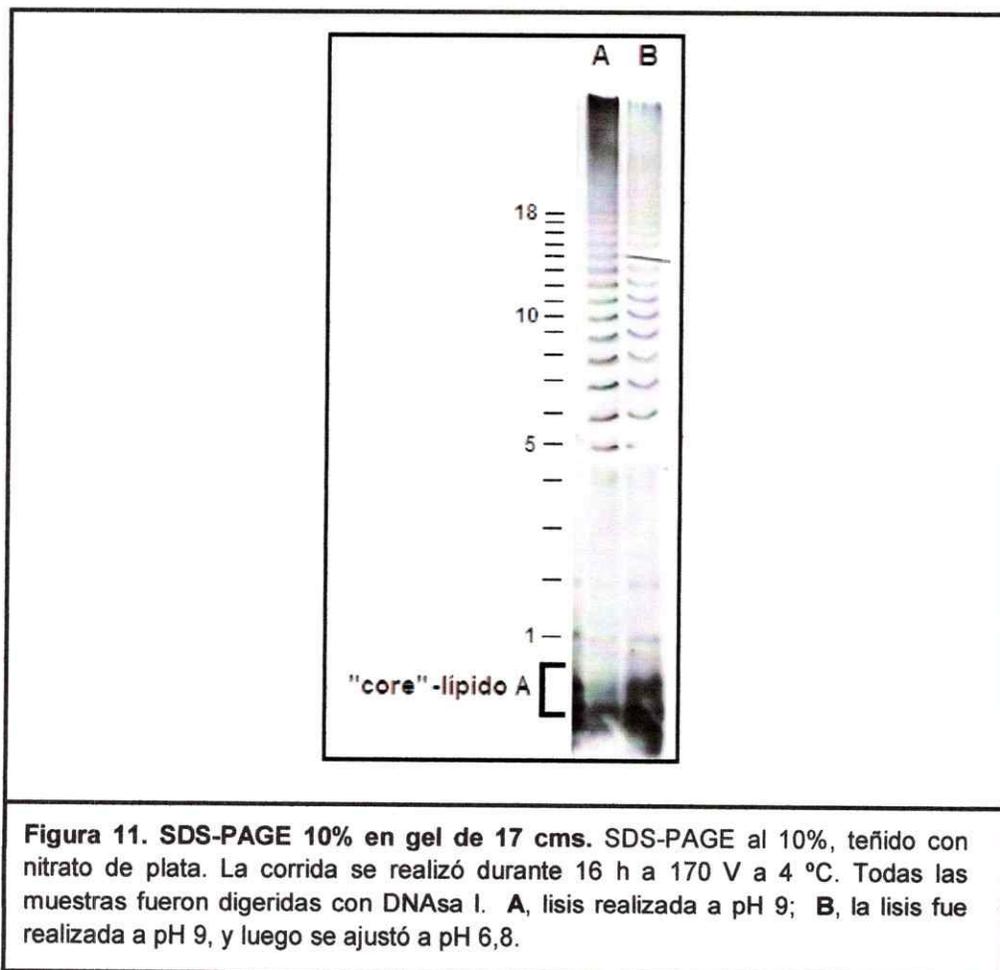
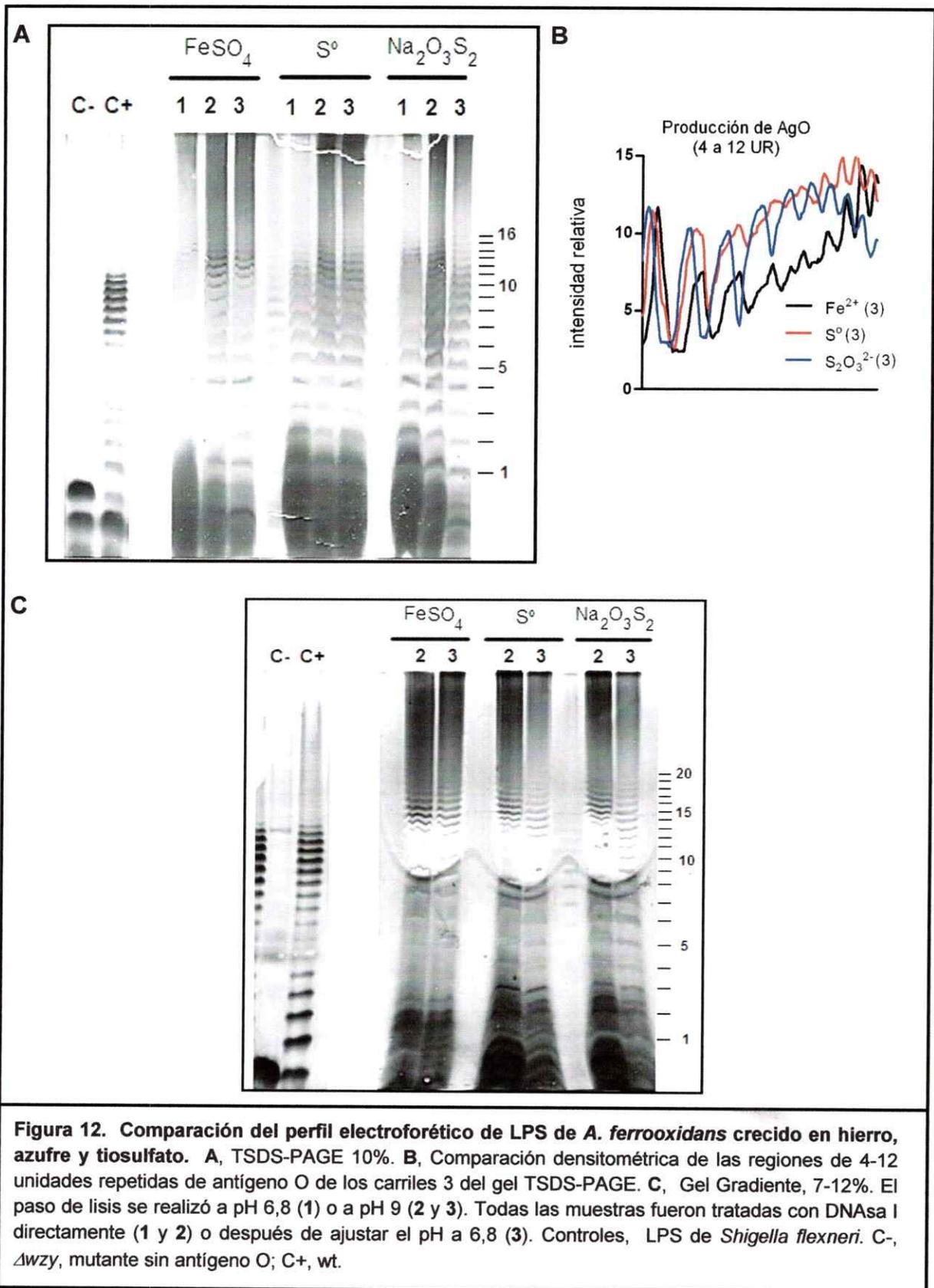


Figura 11. SDS-PAGE 10% en gel de 17 cms. SDS-PAGE al 10%, teñido con nitrato de plata. La corrida se realizó durante 16 h a 170 V a 4 °C. Todas las muestras fueron digeridas con DNAsa I. **A**, lisis realizada a pH 9; **B**, la lisis fue realizada a pH 9, y luego se ajustó a pH 6,8.

Con la mejora en la resolución obtenida con la electroforesis en geles más largos se probó usar el protocolo optimizado y los geles de 17 cm para analizar y comparar los perfiles de LPS extraídos desde células crecidas en ión ferroso, azufre elemental y tiosulfato.

En la figura 12, se comparan muestras obtenidas desde células crecidas en ión ferroso, en azufre elemental y tiosulfato. Estas muestras fueron corridas en geles de 17 cm de largo TSDS-PAGE (fig. 12A) o de gradiente (fig. 12C). En el gel TSDS-PAGE de 17 cm, se pudo cargar una mayor cantidad del LPS (24 μ L) de *A. ferrooxidans* lo que generó que las bandas inmediatamente por sobre el largo preferencial del antígeno O no se resolvieran bien y además se marcara un "background" oscuro. A esa altura del gel aún se distinguen bandas de LPS de *A. ferrooxidans*. Para obtener mayor resolución de estas muestras, se decidió probar la técnica de geles de poliacrilamida en gradiente (fig. 12C). Se puede ver que efectivamente se resolvieron mejor las moléculas de peso molecular medio-alto, observándose entre 19 y 20 bandas correspondientes a unidades repetidas de antígeno O, lo que es equivalente a lo reportado por Vinogradov y col. (1994), en la cepa IFO 14262 de *A. ferrooxidans*. Cabe señalar que en ambos geles, se pueden distinguir señales intensas de bajo peso molecular que podrían corresponder a oligopéptidos remanentes de la digestión.

Respecto al perfil de LPS en los diferentes sustratos, no se observan diferencias sustanciales, pero sí se puede vislumbrar que al parecer las muestras extraídas desde células crecidas en ión ferroso poseen una menor cantidad de LPS en el rango de la distribución modal *A. ferrooxidans*. Esta observación fue corroborada por medio de un análisis densitométrico (fig. 12B).



6. Discusión

Los organismos acidófilos obtienen energía a partir del gradiente de pH entre el ambiente externo y el citosol, pero el influjo de protones es controlado para evitar la acidificación excesiva el medio intracelular. Las membranas de estos organismos tienen adaptaciones para resistir el ambiente ácido y ser capaces de regular la entrada de protones. Estas adaptaciones hacen más compleja la experimentación con estos microorganismos, ya que los protocolos de trabajo que se usan con bacterias neutrófilas no funcionan con estos organismos acidófilos, o es necesario optimizarlos para poder usarlos. Esta fue esencialmente la finalidad de este seminario de título, encontrar "la fórmula" que permitiera visualizar el perfil de LPS de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* con el objetivo futuro de poder observar este fenotipo en diferentes condiciones experimentales.

Este trabajo se abocó a realizar cambios en las metodologías descritas para la obtención de LPS en enterobacterias, con el fin de optimiza la visualización del perfil electroforético de *A. ferrooxidans*. Las modificaciones se enfocaron en el proceso de lisis celular, y en la eliminación de contaminantes como el exceso de DNA y sales del medio de cultivo.

Haciendo un análisis *a posteriori*, era previsible que un factor como el pH podría generar un aumento en la lisis celular de un organismo acidófilo, considerando lo mencionado anteriormente sobre la adaptaciones de la membranas de estos microorganismos. Estas adaptaciones impiden que la membrana se desestabilice a una alta concentración de protones, pero no la protegen a pH alto (Arredondo y col., 1994).

El perfil electroforético obtenido con protocolo de fenol caliente usado en este trabajo, fue muy tenue, poco definido, aun con muestras de alta concentración celular, a pesar de que éste método había sido utilizado anteriormente para este microorganismo. El proceso de lisis en esta metodología ocurre cuando las células que previamente pasaron por un proceso de deshidratación, son expuestas a la solución de fenol caliente. Quizás este tratamiento no fue lo suficientemente agresivo, como para lograr una lisis eficiente en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, dado que los resultados aquí expuestos indican que éste es el paso crítico para la preparación de LPS en esta bacteria. Las publicaciones anteriores en que se había usado este protocolo para extraer LPS desde otras cepas de *A. ferrooxidans* (Yokota y col., 1987; 1988), no son explícitos acerca de detalles específicos de la metodología, que pudieron haber variado a partir del procedimiento original publicado en 1965 (Westphal y Jann, 1965). Considerando lo señalado anteriormente, sobre el acondicionamiento de las metodologías para trabajar con este tipo de microorganismos, es probable que se hayan requerido modificaciones al protocolo que no fueron detalladas en estos artículos.

En la literatura, también existen trabajos en los que se utilizó el protocolo de Hitchcock y Brown para extraer LPS de *A. ferrooxidans*, sin embargo, no requirieron de las modificaciones que nosotros tuvimos que incorporar para poder obtener un perfil bien resuelto. En el trabajo de Arredondo y col. (1994), si bien se usa el protocolo de extracción esencialmente sin modificaciones, la detección de LPS se realiza por autorradiografía, que es mucho más sensible que la tinción con nitrato de plata, y probablemente por esto no fue necesario optimizar el paso de lisis. En el caso de Southam y Beveridge (1993), se usó el método de Hitchcock y Brown con dos modificaciones: un lavado inicial con ácido oxálico para desprender las células

adheridas a los precipitados de metales, y una digestión con Proteinasa K a temperatura más baja que lo descrito (37 °C v/s 60 °C). Estas extracciones se hicieron a partir de aislados de *A. ferrooxidans* provenientes de drenajes mineros. Si bien se obtienen buenos perfiles de LPS, donde se puede apreciar la distribución modal de cada aislado, algunos son poco definidos o con una baja cantidad de LPS en comparación con otros. Es decir, a partir de cepas diferentes de *A. ferrooxidans*, los rendimientos de extracción parecen haber sido algo variables. Algo equivalente pudo haber pasado en este trabajo, en donde se usó una cepa distinta a las estudiadas anteriormente que pudo haber sido más recalcitrante al protocolo de extracción.

El método aquí desarrollado para la preparación y análisis electroforético del LPS de *A. ferrooxidans*, permitió determinar que la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* produce moléculas que llegan a tener a lo menos 20 unidades repetidas de antígeno O. Esto es similar a lo descrito en otras cepas de esta misma especie (Vinogradov y col., 1994). Por otra parte, se pudo definir, por primera vez a nuestro entender, el largo preferencial o distribución modal de LPS de *A. ferrooxidans*. En esta cepa la distribución modal está entre 5 y 10 unidades repetidas de antígeno O.

Respecto a la caracterización del perfil de LPS de células de *A. ferrooxidans* en diferentes sustratos energéticos, nuestros resultados preliminares sugieren que las bacterias crecidas en ión ferroso tienen una menor cantidad de moléculas en el rango de la distribución modal. De todas maneras este trabajo necesita seguir profundizándose.

Como se mencionó en la introducción, *A. ferrooxidans* modula la composición del EPS que produce en diferentes condiciones de crecimiento

(sustrato sólido v/s líquido, pirita v/s azufre, Gehrke y col., 1998; 2001; Rohwerder y col., 2003). De eso se puede inferir que, el LPS al ser una estructura superficial, involucrada en la adherencia a sustratos sólidos (Williams y Fletcher, 1996; Jucker y col. 1997; 1998; Rocchetta y col., 1999), podría ser también regulado a nivel de su biosíntesis dependiendo de las condiciones ambientales a las que se enfrente. En el genoma *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se han identificado 2 genes importantes en la biosíntesis de LPS los cuales codifican para el determinante de largo de cadena (AFE_2950) y la polimerasa de antígeno O (AFE_2796). El análisis del contexto genómico de ambos genes reveló la presencia de varios ORFs que codificarían para proteínas potenciales involucradas en la síntesis de LPS. En base a los resultados obtenidos durante el presente trabajo, nos proponemos ahora estudiar la organización génica, estructural y funcional de los genes involucrados en la biosíntesis del LPS en diferentes condiciones de crecimiento

7. Conclusiones

- Al probar los dos métodos de extracción de LPS más citados en la literatura, y en base a los resultados obtenidos, se optó por trabajar con el método de Hitchcock y Brown para analizar el perfil electroforético de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*.
- El paso de lisis celular fue determinante en la obtención de LPS de *A. ferrooxidans*. Las optimizaciones desarrolladas durante este trabajo fueron el aumento del pH de lisis de 6,8 a 9 y la extensión del tiempo de lisis.
- Las modificaciones señaladas en el punto anterior derivaron en la necesidad de incorporar: i) un paso de digestión con DNasa I para eliminar el "background" de tinción inespecífica de DNA en el gel y ii) un paso de diálisis antes de cargar las muestras en el gel para eliminar impurezas como sales provenientes del medio de cultivo, que alteraban la migración de las muestras.
- Entonces, el protocolo optimizado se muestra en la siguiente tabla:

Tabla II. Protocolo optimizado para la extracción de LPS de *A. ferrooxidans*.

Paso 1: Obtención de Células	1,5 ml de suspensión celular estandarizada a DO_{600nm} 2, ésta suspensión se centrifuga para obtener un precipitado celular.
Paso 2: Lisis Celular	El precipitado celular se resuspende en una solución amortiguadora de lisis a pH 9 (SDS 2%; 2-ME 4%; Tris-HCl 0,5 M pH 9), y se incuba a 100 °C por 30 min.
Paso 3: Digestión con DNasa I	37 °C por 90 min.
Paso 4: Digestión con Proteinasa K	60 °C por 90 min.
Paso 5: Diálisis	20 - 40 min contra agua nanopura.

- Se logró determinar que el largo preferencial de *A ferrooxidans* ATCC 23270 está entre 5 y 10 unidades repetidas de antígeno O, y además se pudo detectar hasta 20 unidades repetidas en el gel.
- Todavía queda inconclusa la tarea de caracterizar el perfil de LPS de *A. ferrooxidans* en diferentes fases de crecimiento y crecido en diferentes sustratos energéticos, pero fue posible observar que en fase exponencial, el LPS extraído desde células crecidas en ión ferroso está menor representado a la altura de la distribución modal, que el extraído desde células crecidas en azufre y tiosulfato.

8. Bibliografía

- Amaro A. M., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I. y 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. y Jerez C.A.** 1994. Partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its adhesion to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2846-2851.
- Baker-Austin C. y Dopson, M.,** 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**: 165–171.
- Bravo D., Silva C., Carter J., Hoare A., Alvarez S., Blondel C., Zaldívar M., Valvano M. y Contreras I.** 2008. Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* **57**: 938-946.
- Carter J., Blondel C., Zaldívar M., Alvarez S., Marolda C., Valvano M. y Contreras I.** 2007. O-antigen modal chain length in *Shigella flexneri* 2a is growth-regulated through RfaH-mediated transcriptional control of the wzy gene. *Microbiology.* **153**:3499-507
- Devasia P., Natarajan K., Sathyanarayana D. y Ramananda Rao G.** 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adherencia on mineral sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4051-4055
- Escobar B., Huerta G. y Rubio J.** 1997. Influence of lipopolysaccharides on the attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to minerals. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**: 593-594
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D. y Sand W.** 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 273–2747.
- Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K. y 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.
- Guillani N. y Jerez C.** 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the mayor outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **66**: 2318-2324
- Hitchcock P. y Brown T.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**: 269-270.

- Hoare A., Bittner M., Carter J., Alvarez S., Zaldívar M., Bravo D., Valvano M. y Contreras I.** 2006. The outer"core"lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect. Immun.* **74**: 1555-1564.
- Jerez C.A. Chamorro D., Peirano I., Toledo H. y Arredondo R.** 1988. Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Biochem. Int.* **17**: 989-999
- Jucker B., Harms H., Hug S. y Zehnder A.** 1997. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **9**: 331-343.
- Jucker B., Harms H., y Zehnder A.** 1998. Polymer interaction between five gram-negative bacteria and glass investigated using LPS micelles and vesicles as model system. *Colloid Surfaces B Biointerfaces* **11**: 33-45.
- Karavaiko G.I., Turova T.P., Kondrat'eva T.F., Lysenko A.M., Kolganova T.V., Ageeva S.N., Muntyan L.N. y Pivovarova T.A.** 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**:113-119
- Lesse A., Campagnari A., Bittner W. y Apicella M.** 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods.* **123**: 109-117
- Marolda C., Lahiry P., Vinés E., Saldías S. y Valvano, M.** 2006. Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide. *Methods Mol. Biol.* **347**: 237-252
- Orozco P.** 2009. Primera patente de un microorganismo chileno: BioSigma patentó la bacteria Wenelén. Sala de Prensa, Codelco. Extraído el 28 de junio de 2009 desde la página de la Sala de Prensa de Codelco: http://www.codelco.com/prensa/archivo/fr_prensa_detalle.asp?id=20090612114816
- Raetz C.** 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 129-170.
- Raetz C. y Whitfield C.** 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 635-700.
- Ramírez P., Guiliani N., Valenzuela L., Beard S. y Jerez C.A.** 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4491-4498.
- Rocchetta H., Burrows L., y Lam J.** 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:523– 553.

- Rodriguez M., Campos S. y Gomes-Silva B.** 1986. Studies on native strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. III. Studies on the outer membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. Characterization of the lipopolysaccharides and some proteins. *Biotech. Appl. Biochem.* **8**: 292-299
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. y Sand W.** 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239-248.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P. y Schippers A.** 2001. (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* **59**: 159-175.
- Schägger H.** 2006, Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**: 16-22.
- Southam G. y Beveridge J.** 1993. Examination of Lipopolysaccharide (O-Antigen) of *Thiobacillus ferrooxidans* from Two Mine Populations Tailings. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1283-1288.
- Tsai C. y Frasch C.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.
- Vestal R. y Hirt W.,** 1975. Physical and chemical studies on *Thiobacillus ferrooxidans* lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **123**: 642-650.
- Vinogradov E., Campos-Portuguez S., Yokota A. y Mayer H.** 1994. The structure of the O-specific polysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* IF0 14262. *Carbohydr. Res.* **261**: 103-109.
- Wang W., Korczynski M. y Lundgen D.** 1970 Cell Envelope of an Iron-Oxidizing Bacterium: Studies of Lipopolysaccharide and Peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **104**: 556-565.
- Westphal O., y Jann K.** 1965. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.* **5**: 83-91.
- Williams V. y Fletcher M.** 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:100-104.
- Yokota A., Rodriguez M., Yamada Y., Imai K., Borowiak D., y Mayer H.** 1987. Lipopolysaccharides of *Thiobacillus* species containing lipid A with 2,3-diamino-2,3-dideoxyglucose. *Arch. Microbiol.* **149**: 106-111.
- Yokota A., Yamada Y., e Imai K.** 1988, Lipopolysaccharides of iron-oxidizing *Leptospirillum ferrooxidans* and *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**: 27-37.