



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

Exopolisacárido Pel y formación de biopelículas en la bacteria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans*

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN CUMPLIMIENTO
PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

POR

MAURICIO JAVIER DÍAZ FUENZALIDA

MARZO, 2018

SANTIAGO - CHILE

DIRECTOR DE TESIS: DR. NICOLÁS GUILIANI GUERIN

“Dedicado a todos los que creyeron en mí”

Agradecimientos

A los miembros de mi familia que me han estado apoyando durante todo este tiempo de estudio.

Al Dr. Nicolás Guiliani por haberme permitido desarrollar la tesis en su laboratorio y soportarme todo este tiempo.

Al Dr. Mario Vera, al Dr. Wolfgang Sand y al Biofilm Centre en la Universidad de Duisburg-Essen en Alemania por permitirme realizar parte de mi investigación allá.

A los proyectos regulares Fondecyt 1120295 y 1160702 y a la beca Conicyt 21120064 por aportar el financiamiento durante el desarrollo de la tesis.

Índice General

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE ANEXOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	43
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIALES Y MÉTODOS	45
5. RESULTADOS	61
6. DISCUSIÓN	101
7. CONCLUSIONES	116
8. REFERENCIAS	117
9. ANEXOS	128

Índice de Figuras

Fig. 1.	Ciclo de formación de una biopelícula bacteriana.	3
Fig. 2.	Comparación estructural entre el operón <i>pel</i> identificado en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 y el operón <i>pel</i> canónico de <i>P. aeruginosa</i> PA14.	62
Fig. 3.	Presencia/ausencia del operón <i>pel</i> en diferentes cepas de <i>At. thiooxidans</i> .	65
Fig. 4.	Caracterización de la presencia de azúcares de superficie en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 mediante ensayo de unión a lectinas.	68
Fig. 5.	Comprobación de la estructura y expresión operónica del conjunto de genes <i>pel</i> de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	70
Fig. 6.	Análisis del efecto de la presencia de ciertas AHLs en la adherencia de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 a cupones de azufre elemental.	75
Fig. 7.	Alineamiento de secuencias aminoacídicas de distintos ortólogos de PelD.	78
Fig. 8.	Comprobación de la mutación específica de <i>pelD</i> mediante PCR.	81
Fig. 9.	Comprobación de la delección del gen <i>pelD</i> en <i>At. thiooxidans</i> mediante Southern Blot.	82
Fig. 10.	Curvas de crecimiento en azufre elemental de las cepas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 parental y mutante derivada $\Delta pelD$.	83
Fig. 11.	La ausencia de PelD altera la estructura de las biopelículas de <i>At. thiooxidans</i> sobre azufre elemental.	84
Fig. 12.	Alteración de la presencia de azúcares de superficie por la mutación $\Delta pelD$ en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	87
Fig. 13.	Efecto de la mutación $\Delta pelD$ en la adherencia a azufre mediada por la molécula de QS 3-oxo-C8-AHL en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	90
Fig. 14.	Efecto de la eliminación de <i>pelD</i> en la resistencia mecánica de las biopelículas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 sobre cupones de azufre.	92
Fig. 15.	Análisis comparativo de los patrones de proteínas extracelulares obtenidas de biopelículas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 parental (WT) y mutante PelD ⁻ ($\Delta pelD$).	93
Fig. 16.	Contexto genómico del locus <i>ATHIO_RS0104245</i> .	96
Fig. 17.	Análisis de los geles 2D de las proteínas del sobrenadante de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 silvestre (WT) y mutante $\Delta pelD$ (MU).	99
Fig. 18.	Estructura del putativo operón <i>bcs</i> de biosíntesis de celulosa identificado en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	104

Índice de tablas

Tabla 1.	Ejemplos de receptores de c-di-GMP identificados en bacterias.	12
Tabla 2.	Presencia/ausencia del operón <i>pel</i> en los genomas secuenciados de diferentes bacterias presentes en entornos minerales ácidos.	63
Tabla 3.	Análisis de la composición de los EPS extraídos desde las sub-poblaciones planctónicas y adheridas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 crecido en azufre elemental.	66
Tabla 4.	Número normalizado de transcritos de los genes <i>pelA</i> , <i>pelD</i> y <i>wcaG</i> de las sub-poblaciones planctónicas y adheridas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 crecido en azufre elemental.	72
Tabla 5.	Comparación de la cantidad de transcritos de los genes <i>pelA</i> , <i>pelD</i> y <i>wcaG</i> de las sub-poblaciones planctónicas y adheridas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 crecido en azufre elemental en presencia o ausencia de 5 μ M de 3-oxo-C8-AHL.	76
Tabla 6.	Comparación en la cantidad de azúcares y proteínas presentes en los EPS de las cepas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 y Δ <i>pelD</i> .	86
Tabla 7.	Cuantificación de los niveles de expresión de los genes <i>pelA</i> y <i>wcaG</i> de las sub-poblaciones celulares planctónicas y adheridas de <i>At. thiooxidans</i> Δ <i>pelD</i> crecido en azufre elemental.	89
Tabla 8.	Comparación de los niveles de expresión de <i>pelA</i> y <i>wcaG</i> entre las cepas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 silvestre (WT) y Δ <i>pelD</i> en células planctónicas (P) y adheridas (A).	89
Tabla 9.	Efecto de la presencia de 3-oxo-C8-AHL en los niveles de expresión de <i>pelA</i> y <i>wcaG</i> en células planctónicas (P) y adheridas (A) de células de <i>At. thiooxidans</i> Δ <i>pelD</i> crecidas en azufre elemental.	89
Tabla 10.	Proteínas identificadas por MS/MS en los sitios seleccionados en la electroforesis 2D.	100

Índice de Anexos

<u>Anexo 1</u>		
Tabla A1.	Cepas y plasmidios utilizados en este estudio	128
<u>Anexo 2</u>		
Tabla A2.	Partidores utilizados en este estudio	129
<u>Anexo 3</u>		
Tabla A3.	Cantidad y composición de los EPS extraídos desde las subpoblaciones planctónicas y adheridas de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377 crecido en azufre elemental.	131
<u>Anexo 4</u>		
Tabla A4.	Péptidos únicos identificados en la secuenciación MS/MS de la proteína codificada por <i>ATHIO_RS0104245</i> .	132
<u>Anexo 5</u>		
Tabla A5.	Identificación de las proteínas a partir de las sitios seleccionadas en la electroforesis 2D	133
<u>Anexo 6</u>		
Fig. A1.	Estructura del sitio activo del dominio GGDEF de la proteína PleD de <i>Caulobacter crescentus</i> .	137
<u>Anexo 7</u>		
Fig. A2.	Estructura del sitio activo del dominio EAL de la proteína Tbd1265 de <i>Thiobacillus denitrificans</i> .	138
<u>Anexo 8</u>		
Fig. A3.	Estructura del sitio activo del dominio HD-GYP de la proteína Bd1817 de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> .	139
<u>Anexo 9</u>		
Fig. A4.	Control de pureza de las cepas de <i>At. thiooxidans</i> utilizadas en los experimentos de proteómica.	140
<u>Anexo 10</u>		
Fig. A5.	Niveles de expresión transcripcional del gen <i>bcsA</i> en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	141
<u>Anexo 11</u>	Artículos producidos durante este estudio	142

Lista de Abreviaturas

c-di-GMP	Diguanilato cíclico
cDNA	DNA complementario
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DGC	Diguanilato ciclasa
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
EPS	Sustancia polimérica extracelular
gDNA	DNA genómico
K_d	Constante de disociación
LB	Luria-Bertani (medio de cultivo)
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
qPCR	PCR cuantitativo
QS	Quorum Sensing
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Resumen

Acidithiobacillus thiooxidans es una bacteria que obtiene energía metabólica y poder reductor a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. En estado natural, esta bacteria se encuentra junto con otros microorganismos participantes del consorcio de biolixiviación de sulfuros metálicos formando estructuras multicelulares llamadas biopelículas sobre la superficie de sulfuros minerales. Las células están embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) las cuales se componen principalmente de exopolisacáridos, proteínas y lípidos.

Se ha descrito que la solubilización de los minerales sulfurados metálicos está mediada por estos EPS. Sin embargo, la composición de los EPS y su rol exacto en la solubilización de sulfuros metálicos ha sido caracterizado solamente en la bacteria oxidadora de hierro y azufre *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aunque las demás especies de *Acidithiobacillus* que son capaces de oxidar solamente compuestos reducidos del azufre son fundamentales en estos procesos de lixiviación.

En base a estos antecedentes, nos propusimos caracterizar alguno de los EPS y los mecanismos moleculares involucrados en la formación de biopelículas en la especie modelo *At. thiooxidans*. En un trabajo previo, se identificó un gen putativo que codifica para una proteína de unión a c-di-GMP PeID, la cual está caracterizada en *Pseudomonas aeruginosa* formando parte de un complejo multiproteico de membrana involucrado en

la biosíntesis del exopolisacárido Pel. Al analizar el contexto genético del gen *pelD*, se identificó un putativo operón con una estructura similar al operón canónico identificado en *P. aeruginosa*. El análisis comparativo entre los genomas disponibles de las bacterias acidófilas que están presentes en los entornos minerales ácidos reveló que este operón sólo está presente en los genomas de *At. thiooxidans* y *At. caldus*.

Ante este resultado, este trabajo se enfocó en comprender cuál sería la importancia de este exopolisacárido en la formación de biopelículas de *At. thiooxidans* sobre la superficie de azufre elemental. La medición de los niveles de transcrito mediante qPCR mostró que los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* del putativo operón presentan un mayor de expresión en células adheridas que en células planctónicas. El análisis de azúcares de superficie mediante el uso de lectinas identificó la presencia de N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina. Tratando de dilucidar algunas de las señales que regulan la producción de Pel, se descubrió que la adición exógena de la molécula de Quorum Sensing (QS) 3-oxo-C8 AHL incrementa la transcripción de los genes *pelA* y *pelD*.

Finalmente, se procedió a obtener una cepa mutante nula en el gen *pelD* mediante recombinación homóloga. Luego de analizar el DNA de esta cepa, se realizaron análisis de adherencia y formación de biopelículas sobre la superficie de azufre elemental mediante microscopía electrónica y de epifluorescencia. La mutación $\Delta pelD$ afectó la estructura de la biopelícula al reducir la presencia de N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina en la superficie, pero adicionalmente provocó un incremento en la

producción de estructuras filamentosas que rodean a las células. Para resolver la incógnita sobre la naturaleza de estas fibras, se realizaron análisis comparativos preliminares de la expresión de proteínas extracelulares. El análisis del sobrenadante de los cultivos y de las proteínas del EPS reveló un cambio en producción de proteínas secretadas al medio.

En base a estos resultados es posible concluir que el exopolisacárido Pel producido por la bacteria biominera *At. thiooxidans* juega un rol estructural en la formación de biopelículas sobre la superficie de azufre elemental y que la regulación de su síntesis involucra a las vías del QS y del c-di-GMP.

Abstract

Acidithiobacillus thiooxidans is a bacterium that obtains metabolic energy and reducing power from the oxidation of reduced sulfur compounds. In the natural state, this bacterium is found along with other microorganisms that are members of the metal sulfides bioleaching consortium forming multicellular structures called biofilms on the surface of mineral sulfides. The cells are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) which are composed mainly of exopolysaccharides, proteins and lipids.

It has been described that the solubilization of the metal sulfide minerals is mediated by these EPS. However, the composition of the EPS and their exact role in the solubilization of metal sulfides has been characterized only in the iron and sulfur oxidizer bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, although the other *Acidithiobacillus* species that are only capable of oxidizing reduced sulfur compounds are important in these leaching processes.

Based on this background, we set out to characterize some of the EPS and the molecular mechanisms involved in biofilm formation in the model species *At. thiooxidans*. In a previous work it was identified a putative gene encoding a c-di-GMP binding PelD protein, which is characterized as part of a multiprotein membrane complex involved in Pel exopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.

When we were analyzing the genetic context of the *pelD* gene, a putative operon with a structure similar to the canonical operon identified in *P. aeruginosa* was identified. Comparative analysis between available genomes of acidophilic bacteria that are present in acidic mineral environments revealed that this operon is only present in the genomes of *At. thiooxidans* and *At. caldus*.

Given this result, this work focused on understanding the importance of this exopolysaccharide in biofilm formation of *At. thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. Measurement of transcript levels by qPCR showed that *pelA*, *pelD* and *wcaG* genes of the putative operon exhibit a greater expression in attached cells than in planktonic cells. The analysis of surface sugars by the use of lectins identified the presence of N-acetyl-galactosamine and N-acetyl-glucosamine. Trying to elucidate some of the signals that regulates the production of Pel, it was discovered that the exogenous addition of Quorum Sensing (QS) molecule of 3-oxo-C8 AHL increases the transcription of *pelA* and *pelD* genes.

Finally, a *pelD* gene null mutant strain was obtained by homologous recombination. After analyzing the DNA of this strain, adherence and biofilm formation analysis were performed on the elemental sulfur surface by electronic and epifluorescence microscopy. The $\Delta pelD$ mutation affected the structure of the biofilm by reducing the presence of N-acetyl-galactosamine and N-acetyl glucosamine on the surface, but additionally caused an increase in the production of fibrillar structures

surrounding the cells. To solve the unknown about the nature of these fibers, preliminary comparative analysis of extracellular protein expression were performed. Analysis of the culture supernatant and proteins from EPS revealed a change in production of secreted proteins to the medium.

Based on these results it is possible to conclude that the Pel exopolysaccharide produced by the biomining bacterium *At. thiooxidans* plays a structural role at biofilm formation on the surface of elemental sulfur and that the regulation of its synthesis involves QS and c-di-GMP pathways.

1. Introducción

1.1. Biopelículas

Una biopelícula se define como una agrupación estructural y funcionalmente compleja de microorganismos, los cuales se encuentran embebidos en una matriz auto-producida de sustancias poliméricas extracelulares, que está adherida a la superficie de un sustrato sólido, ya sea biológico o no biológico, formando una comunidad (Costerton y col., 1995; Davey y O'Toole, 2000, Hall-Stoodley y col., 2004). Los microorganismos que se encuentran inmersos dentro de una biopelícula difieren enormemente de sus contrapartes planctónicas en sus propiedades morfológicas, metabólicas y fisiológicas (Watnick y Kolter, 2000). Estas biopelículas son ubicuas en el medio ambiente y representan la forma más común de crecimiento microbiano (Hall-Stoodley y col., 2004, Moons y col., 2009). Las biopelículas poseen una relevancia importante desde el punto de vista ecológico, industrial y médico (Costerton y col., 1995; Sauer y col., 2007; Olivera-Nappa y col, 2010; Saha y Donofrio, 2012).

Aunque la formación de biopelículas es un aspecto de la fisiología bacteriana que ha sido reconocido y científicamente documentado por aproximadamente 100 años (Henrici, 1933), el comportamiento celular, el flujo de diferentes metabolitos dentro de la biopelícula y los mecanismos que coordinan la formación de ésta son aspectos que recién se están dilucidando. En la actualidad se ha descrito que el comportamiento de los microorganismos dentro de las biopelículas, ya sean de una o múltiples especies, es más

cercano al comportamiento de un superorganismo (Costerton y col., 1995; O'Toole y col., 2000). Este “nuevo organismo” suele poseer propiedades fenotípicas que no poseen las células planctónicas o las especies individuales (cuando se trata de biopelículas mixtas), como son la utilización de ciertas fuentes nutricionales, la resistencia frente a elementos ambientales nocivos, como la escasez de nutrientes o la acción de biocidas (Fleming y Wingender, 2010), o el desarrollo de estructuras reproductivas complejas (O'Toole y col., 2000).

Pese a que el fenotipo de formación de biopelículas está presente en arqueas (Orell y col., 2013), bacterias (Hall-Stoodley y col., 2004; Moons y col., 2009) y eucariontes (Aguilera y col., 2007; Fanning y Mitchell, 2012), las investigaciones se han enfocado principalmente en algunas bacterias, en particular en especies patógenas humanas. Los estudios sobre la formación de biopelículas en las bacterias han definido seis etapas diferentes (O'Toole y col., 2000): i) Movimiento de las células hacia el sustrato mediado por fenómenos como la quimiotaxis; ii) Interacción inicial no específica reversible entre las bacterias y el sustrato, iii) Colonización secundaria irreversible mediada por interacciones específicas entre célula-célula o célula-sustrato; iv) Proliferación de las células adheridas con la formación de microcolonias; v) Crecimiento e interacción de las microcolonias, secreción de grandes cantidades de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), con la subsecuente organización estructural y maduración de la biopelícula; y vi) Dispersión de células desde la biopelícula, ya sea como células individuales o conglomerados (Davey y O'Toole, 2000; Ha y O'Toole, 2015) (Fig. 1).

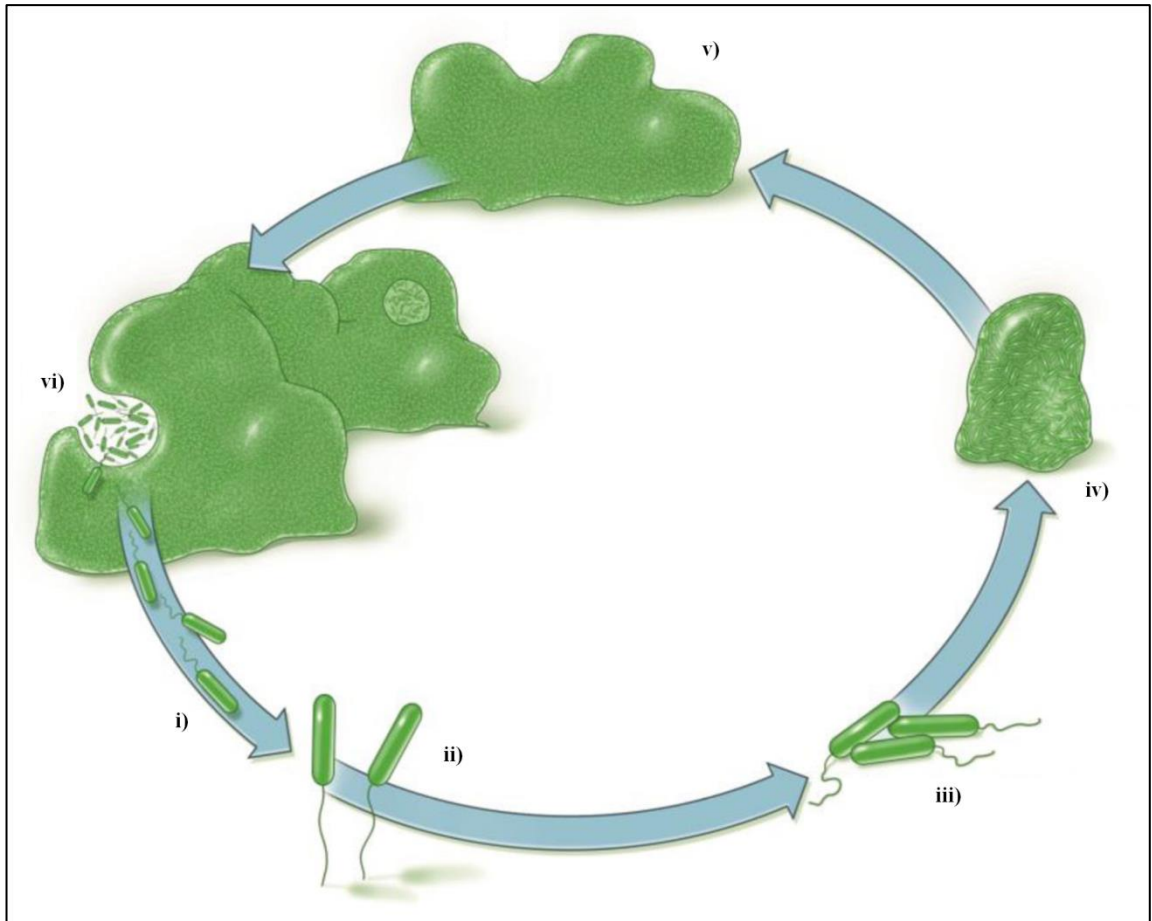


Figura 1. Ciclo de formación de una biopelícula bacteriana. Se observan las etapas de i) el desplazamiento de células planctónicas hacia un sustrato, ii) la adherencia reversible, iii) la adherencia irreversible, iv) la formación de microcolonias, v) la maduración y vi) la liberación de las células para repetir el ciclo. Figura basada en la imagen de Ha y O'Toole, (2015).

1.2. Regulación de la formación de biopelículas en bacterias

Debido a los grandes cambios metabólicos y fisiológicos implicados, la formación de biopelículas es un proceso celular que se encuentra altamente regulado a múltiples niveles. Está descrito que la regulación se encuentra a nivel de la transcripción del RNA mensajero, la traducción del mRNA a proteínas y la actividad de las proteínas (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004; Thoendel y Horswill, 2010; Galloway y col., 2011). Entre los múltiples mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas en las bacterias, la vía del Quorum Sensing (QS) (Thoendel y Horswill, 2010; Galloway y col., 2011) y la vía del ácido diguanílico cíclico (c-di-GMP) (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004; Hengge, 2009; Römling y col., 2013) son los más caracterizados.

1.2.1. Vía del Quorum Sensing

La vía del QS es un sistema de comunicación célula-célula que es mediado por la secreción de moléculas de bajo peso molecular conocidas como autoinductores (AIs). Antiguamente descrito como un sistema que funcionaba dentro de una misma especie, en la actualidad las evidencias muestran que el QS también regula la comunicación y el comportamiento entre diferentes especies bacterianas (Federle y Bassler, 2003). La naturaleza de los AIs utilizados varía según bacteria productora: N-acil homoserina lactonas en bacterias Gram-negativa (AI-1), péptidos autoinductores en

bacterias Gram-positiva (CSP) y compuestos derivados de la 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (AI-2). Los niveles de AI presentes son dependientes de la densidad poblacional de células bacterianas presentes. Cuando la concentración de AI supera un determinado umbral, lo que se transduce que la población celular ha llegado a un determinado nivel, se produce un cambio en la expresión de varios genes blanco, los cuales regulan fenotipos como la bioluminiscencia, la virulencia, la motilidad y la formación de biopelículas (Ng y Bassler 2009; Thoendel y Horswill, 2010; Galloway y col., 2011). Con respecto a este último fenotipo, se ha estudiado en varias bacterias como el QS regula este fenotipo así como las interacciones celulares que se dan dentro de la misma biopelícula, permitiendo la organización estructural tridimensional, la repartición de los nichos ecológicos y el flujo de nutrientes y desechos dentro de la comunidad (Li y Tiang, 2012).

El primer sistema de QS descubierto, y uno de los más caracterizados, es el sistema denominado QS tipo AI-1, el cual está presente en varias bacterias Gram-negativas. El AI utilizado por estas bacterias es una molécula del tipo N-acil homoserina lactonas (AHL). Las AHLs son sintetizadas por una proteína sintasa del tipo LuxI a partir de S-adenosil-metionina y acil-ACP. Existen distintas clases de AHLs, las cuales difieren en la longitud de la cadena acilo, la presencia de insaturaciones u otros grupos funcionales dentro de esta cadena y la existencia de una modificación del tercer carbono del grupo acilo, que puede ser la adición de un grupo ceto o hidroxilo. Estos AIs difunden al medio extracelular a través de las membranas celulares o a través de un

transportador en el caso de las AHLs que poseen cadenas más grandes (Whitehead y col., 2001). Cuando se alcanza un cierto nivel umbral, las AHLs ingresan al citoplasma y son detectadas por una proteína receptora tipo LuxR, la cual dimeriza al tener su ligando unido. Este complejo dimérico (LuxR-AHL)₂ es un regulador transcripcional que se une a una secuencia presente en el DNA y modifica la transcripción de los genes blanco (Whitehead y col., 2001; Galloway y col., 2011). Dependiendo de las bacterias involucradas y las condiciones ambientales, el QS AI-1 regula los procesos de adherencia, maduración, control de la población y/o dispersión de la biopelícula (Irie y Parsek, 2008). En *Aeromonas hydrophila* el sistema *ahyIR*, que utiliza el AI C4-AHL, es requerido para la maduración de las biopelículas (Lynch y col., 2002). En *Pseudomonas aeruginosa* los sistemas *lasIR* y *rhIR* mediados por los AIs 3-oxo-C12-AHL y C4-AHL, respectivamente, son requeridos para la formación de biopelículas estructuradas, la resistencia al estrés químico dada por estas biopelículas y la dispersión de las células (Irie y Parsek, 2008). En *Acidithiobacillus ferrooxidans* el sistema de QS *afeIR*, el cual utiliza 9 AHLs diferentes, media la comunicación entre células de la misma especie, regulando la adherencia a sustratos sólidos como pirita o azufre y la posterior síntesis de EPS (Ruiz y col., 2008; González y col., 2013; Mamani y col., 2016), o con otros miembros del consorcio bacteriano de lixiviación de minerales (Valenzuela y col., 2007; González y col., 2013; Bellenberg y col., 2014), ya sea regulando la actividad metabólica de especies bacterianas oxidadoras de hierro, tales como *At. ferrivorans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidiferrobacter spp* (Bellenberg y col., 2014).

1.2.2. Vía del c-di-GMP

La vía del segundo mensajero nucleotídico diguanilato cíclico (c-di-GMP), descubierta inicialmente como un activador alostérico del complejo proteico celulosa sintasa de la bacteria *Komagataeibacter xylinus* (conocida anteriormente como *Gluconacetobacter xylinus*) (Weinhouse y col., 1997), es un mecanismo molecular de regulación fenotípica identificado exclusivamente en bacterias. Las diversas investigaciones han determinado que esta vía se encuentra presente en numerosos y diversos linajes de bacterias, siendo estudiada principalmente en bacterias Gram-negativas, en particular en γ -Proteobacterias, y en algunas bacterias Gram-positivas (Ryjenkov y col., 2005; Jenal y Malone, 2006; Tamayo y col., 2007; Hengge, 2009), aunque está descrita la carencia de esta vía en bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori* (Jenal y Malone, 2006; Shang y col., 2009).

1.2.2.1. Metabolismo del c-di-GMP

Los niveles intracelulares de c-di-GMP se regulan mediante las actividades enzimáticas de dos grupos de proteínas con actividades opuestas: las diguanilato ciclasas (DGCs) que sintetizan este mensajero y las fosfodiesterasas (PDEs) que lo degradan (Kirillina y col., 2004; Römling y col., 2005; Hengge, 2009). Cada una estas actividades reside en un dominio proteico particular que suele estar acompañado de uno o varios dominios transductores (DT) de señales citoplasmáticos o integrales de membrana que

suelen encontrarse en el extremo amino terminal de la proteína. Estos DT regulan la actividad enzimática o la interacción con otras proteínas o ligandos específicos. Entre los DTs identificados hasta ahora destacan el dominio PAS, que detecta los niveles de O₂ y el potencial redox (Chang y col., 2001), el dominio GAF, que une nucleótidos monocíclicos (Hurley, 2003) y el dominio regulador aceptor de fosfato REC (Aldridge y col., 2003; Hickman y col., 2005). Otros DTs incluyen el dominio sensor de luz azul BLUF y los dominios integrales de membrana CHASE, MASE1 y MASE2 (Schirmer y Jenal, 2009).

1.2.2.1.1. Diguanilato Ciclasas

El c-di-GMP es sintetizado a partir de 2 moléculas de GTP, con la liberación de 2 moléculas de pirofosfato, por proteínas con actividad DGC, las cuales se caracterizan por la presencia del dominio proteico GGDEF, denominado así por la secuencia aminoacídica altamente conservada Gly-Gly-Asp-Glu-Phe (Ausmees y col., 2001). Los experimentos por mutagénesis sitio-dirigida han revelado que este motivo es fundamental para la actividad catalítica (Ausmees y col., 2001). Las proteínas con dominios GGDEF sólo se encuentran codificadas en los genomas bacterianos (Galperin y col., 2001).

Los análisis cristalográficos y por mutagénesis sitio-dirigida han permitido la identificación de los aminoácidos que son fundamentales para la actividad DGC (Chan

y col., 2004; Wassmann y col., 2007) (Fig. A1). Un dominio GGDEF sólo puede unir una molécula de GTP, coordinado con iones Mg^{+2} , por lo que las DGCs sólo son funcionales como dímeros (Wassmann y col., 2007), aunque se han reportado la existencia de DGCs que son funcionales en estructuras de trímeros o tetrámeros (Chan y col., 2004; Ryjenkov y col., 2005).

La mayoría de las DGCs funcionales presentan en su secuencia uno o dos sitios de unión a c-di-GMP denominado como sitios de inhibición primario (Ip) y secundario (Is). El sitio Ip ha sido más caracterizado, determinando su motivo aminoacídico RxxD. Este motivo se encuentra unos 5 aminoácidos antes del motivo GGDEF. La unión de c-di-GMP a los sitios de inhibición cambia la de la proteína e inhibe la actividad DGC en forma no-competitiva, evitando la carencia de GTP (Chan y col., 2004; Christen y col., 2006).

1.2.2.1.2. Fosfodiesterasas

Existen 2 tipos de PDEs que son específicas para c-di-GMP, las cuales poseen motivos aminoacídicos y estructuras completamente diferentes, denominados dominios EAL o HD-GYP. El dominio EAL es más frecuente en los linajes bacterianos, por lo que se encuentra más caracterizado (Galperin y col., 2001).

Las PDE con dominio EAL reciben ese nombre debido a que poseen la secuencia aminoacídica altamente conservada Glu-Ala-Leu (Römling y col., 2005). Al igual que con las DGC, los análisis cristalográficos y de mutagénesis sitio-dirigida han permitido la identificación de los aminoácidos que son fundamentales para las actividad catalítica (Rao y col., 2008; Tchigvintsev y col., 2010) (Fig. A2). Las PDEs con dominio EAL degradan el c-di-GMP a pGpG (Schmidt y col., 2005), el cual es degradado posteriormente a 2 moléculas de GMP por acción de la oligoribonucleasa Orn (Orr y col., 2015). La actividad PDE del dominio EAL es dependiente de la unión de Mg^{+2} o Mn^{+2} al sitio activo y se reprime en la presencia de Ca^{+2} o Zn^{+2} (Bobrov y col., 2005; Tamayo y col., 2005; Tchigvintsev y col., 2010). Aunque se ha reportado que las proteínas con este dominio suelen encontrarse como dímeros u oligómeros de mayor orden (Bobrov y col., 2005; Tamayo y col., 2005; Tchigvintsev y col., 2010), la oligomerización no parece ser un requisito para la actividad del dominio *per se*, a diferencia de lo que se encuentra descrito para las DGCs (Schmidt y col., 2005).

Algunos genomas bacterianos carecen de genes codificantes para PDEs con dominio EAL aunque presenten genes codificantes para proteínas DGC funcionales (Galperin y col., 2001). Esto implica la existencia de otra clase de proteínas que cumpla la misma función de PDE específica para c-di-GMP. Después de diversos estudios, se predijo que el dominio proteico ampliamente distribuido filogenéticamente HD-GYP (Galperin y col., 2001), denominado así por la presencia de los motivos aminoacídicos His-Asp y Gly-Tyr-Pro, cumpliría el rol de PDE. Esta actividad PDE se determinó

experimentalmente con la proteína RpfG de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* (Ryan y col., 2006). Este análisis se realizó posteriormente con proteínas HD-GYP de *Pseudomonas aeruginosa* (Ryan y col., 2009) y *Borrelia burgdorferi* (Sultan y col., 2011). La estructura del dominio y los aminoácidos clave para la actividad se determinaron posteriormente por análisis cristalográficos (Fig. A3) (Lovering y col., 2011). Las PDEs con dominio HD-GYP, a diferencia de las PDEs con dominio EAL, degradan el c-di-GMP directamente hasta GMP, utilizando Fe^{+2} como cofactor (Dow y col., 2006; Ryan y col., 2006; Ryan y col., 2009).

1.2.2.2. Receptores de c-di-GMP

A diferencia de los elementos moleculares involucrados en el metabolismo del c-di-GMP, los posibles receptores que transducen los niveles intracelulares de este dinucleótido a cambios fenotípicos se encuentran menos caracterizados. El c-di-GMP puede adquirir conformaciones de monómero, dímero, tetrámero u otras según su concentración, la presencia de ciertos iones metálicos y la fuerza iónica del medio (Guan y col., 1993). Este hecho implicaría que no existe una conformación única de proteínas que puedan ser identificadas en su totalidad mediante técnicas de columnas de afinidad a c-di-GMP acoplado a secuenciación (Düvel y col., 2012).

Los distintos métodos experimentales han arrojado un número cada vez mayor de macromoléculas que son capaces de unir c-di-GMP con gran afinidad (Tabla 1). Cada

Tabla 1. Ejemplos de receptores de c-di-GMP identificados en bacterias.

	Organismo	Fenotipo regulado	Referencia
Dominios PilZ			
BcsA	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	Producción de celulosa	Weinhouse y col., 1997
YcgR	<i>Escherichia coli</i>	Motilidad	Paul y col., 2010
Alg44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Producción de alginato	Merighi y col., 2007
MrkH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Producción de pili y formación de biopelículas	Wilksch y col., 2011
Dominios catalíticos inactivos			
PelD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Producción de exopolisacárido Pel	Lee y col., 2007
PopA	<i>Caulobacter crescentus</i>	Ciclo celular	Duerig y col., 2009
LapD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Adherencia a superficies	Newell y col., 2009
Reguladores transcripcionales			
FleQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Motilidad, producción de polisacáridos	Hickman y Harwood, 2008
VpsT	<i>Vibrio cholerae</i>	Producción de polisacárido Vps	Krasteva y col., 2010
Clp	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virulencia	Chin y col., 2010
Bcam1349	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Producción de EPS y virulencia	Fazli y col., 2011
Complejos enzimáticos			
PNPasa	<i>Escherichia coli</i>	Procesamiento de RNA	Tuckerman y col., 2011
CckA	<i>Caulobacter crescentus</i>	Ciclo celular	Lori y col., 2015
MshE	<i>Vibrio cholerae</i>	Producción de pili y formación de biopelículas	Jones y col., 2015
Riboswitches de c-di-GMP			
Cdi1_3	<i>Clostridium difficile</i>	Motilidad	Soutourina y col., 2013
Vc2	<i>Vibrio cholerae</i>	Expresión génica	Sudarsan y col., 2008
Cdi2_4	<i>Clostridium difficile</i>	Agregación celular	Bordeleau y Burrus, 2015

una de las clases de receptores identificados posee una naturaleza, estructura y motivos de unión a c-di-GMP diferentes, dificultando la creación de modelos computacionales para identificación de nuevos receptores por análisis bioinformáticos (Düvel y col., 2012). Entre los receptores de c-di-GMP identificados hasta el momento se encuentran proteínas con dominio PilZ (Amikam y Galperin, 2006; Benach y col., 2007; Pratt y col., 2007; Ramelot y col., 2007), proteínas con dominios GGDEF y EAL catalíticamente inactivos (Friedman y Kolter, 2004; Newell y col., 2009), algunos reguladores transcripcionales (Hickman y Harwood, 2008; Krasteva y col., 2010; Tao y col., 2010; Chin y col., 2010; Fazli y col., 2011) y dos estructuras ribonucleicas denominadas riboswitches específicos para c-di-GMP (Sudarsan y col., 2008; Kulshina y col., 2009; Smith y col., 2009).

1.2.2.2.1. Dominio PilZ

El dominio PilZ fue identificado inicialmente en el extremo C-terminal de la subunidad A del complejo celulosa sintasa de *Komagataeibacter xylinus*, por lo que se propuso como el posible sitio de unión a c-di-GMP, ya que se sabía de antemano que la adición de c-di-GMP incrementaba hasta 200 veces la síntesis de celulosa (Ross y col., 1987). Esta hipótesis fue comprobada posteriormente mediante análisis bioinformáticos y técnicas experimentales (Amikam y Galperin, 2006; Ramelot y col., 2007). Gracias a mutaciones sitio dirigidas y a análisis cristalográficos, se ha podido determinar los aminoácidos clave para la interacción (Habazettl y col., 2011). La unión a c-di-GMP es

posible gracias a los motivos RxxxR y (D/N)xSxxG presentes en el extremo N-terminal del dominio (Benach y col., 2007; Schirmer y Jenal, 2009).

Los dominios PilZ ejercen su función a nivel de la regulación de la actividad enzimática (Weinhouse y col., 1997), la interacción con complejos proteicos (Ryjenkov y col., 2006; Merighi y col., 2007; Paul y col., 2010) o alteración de la actividad transcripcional (Wilksch y col., 2011). Las proteínas con dominio PilZ regulan fenotipos como la motilidad (Ryjenkov y col., 2006; Paul y col., 2010), la biosíntesis de alginato (Merighi y col., 2007), celulosa (Weinhouse y col., 1997) o fimbrias (Wilksch y col., 2011), la virulencia (McCarthy y col., 2008) y la formación de biopelículas (Pratt y col., 2007).

1.2.2.2.2. Dominios del metabolismo del c-di-GMP catalíticamente inactivos

Una vez que los aminoácidos claves de los dominios metabólicos del c-di-GMP fueron identificados, se observó que un número importante de proteínas DGC y PDE no poseían todos los residuos claves o eran catalíticamente inactivas. En base a estas evidencias se propuso que estas proteínas podrían actuar como un nuevo tipo de receptor específico para c-di-GMP. Entre las proteínas identificadas se encuentran PelD, PopA y LapD.

PelD es una proteína de membrana codificada en el operón *pel* de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual codifica para un complejo multiproteico involucrado a la síntesis del exopolisacárido Pel (Lee y col., 2007). Presenta tres dominios principales: un dominio con múltiples hélices transmembrana, un dominio GAF y el dominio de unión a c-di-GMP. El motivo de unión a c-di-GMP detectado en esta proteína es RxxD, el cual es idéntico al sitio de inactivación Ip de las proteínas DGC. La presencia de este motivo de unión así como la similitud estructural han llevado a la conclusión de que este receptor es una proteína con un dominio GGDEF inactivo (Lee y col., 2007). Esta idea ha sido corroborada por los análisis cristalográficos de la fracción soluble de PelD (Whitney y col., 2012).

PopA es una proteína citoplasmática que participa en la regulación del ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. Los análisis de secuencias revelaron que posee un dominio GGDEF inactivo. Cuando esta proteína une el c-di-GMP producido por la DGC PleD, migra al polo celular e interactúa con la proteína inhibidora de la replicación CtrA. Esta interacción permite que CtrA sea degradada por la proteasa ClpXP, lo cual permite el inicio de la replicación del DNA genómico (gDNA) (Duerig y col., 2009; Abel y col., 2011).

LapD es una proteína de membrana interna que participa en la adherencia celular, la agregación y formación de biopelículas en especies del género *Pseudomonas* (Newell y col., 2009; Cooley y col., 2015). Su función está relacionada con la mantención de la

integridad de las adhesinas LapA en *P. fluorescens* (Newell y col., 2009) o CdrA en *P. aeruginosa* (Cooley y col., 2015). El análisis de la secuencia aminoacídica reveló la presencia de cuatro dominios: un dominio periplasmático, un dominio regulador denominado HAMP, un dominio GGDEF y un dominio EAL, siendo estos dos últimos catalíticamente inactivos (Newell y col., 2009). Cuando existe una alta concentración local de c-di-GMP, LapD une este mensajero a través de su dominio EAL. La interacción c-di-GMP/ dominio EAL altera la conformación del dominio HAMP y permite la activación del dominio periplasmático de LapD. El dominio periplasmático activado interacciona y une a la proteasa periplasmática LapG, inactivándola. La inactivación de LapG impide la ruptura proteolítica de las adhesinas, asegurando la unión de las células a la superficie (Newell y col., 2011; Cooley y col., 2015).

1.2.2.2.3. Reguladores transcripcionales

Cuando comenzaron a realizarse experimentos sobre cambiar las concentraciones intracelulares de c-di-GMP se observó que existían cambios en los niveles de RNA de algunos genes relacionados a los fenotipos controlados por este segundo mensajero. Esto abrió la posibilidad de que existieran posibles reguladores transcripcionales cuya actividad fuera controlada por este dinucleótido. Los reguladores más caracterizados son FleQ (Hickman y Harwood, 2008), VpsT (Krasteva y col., 2010), Clp (Chin y col., 2010) y Bcam1349 (Fazli y col., 2011).

FleQ, descubierto en *P. aeruginosa*, es un regulador transcripcional que reprime la expresión de los genes relacionados a la síntesis de exopolisacáridos e induce la expresión de los genes relacionados con motilidad. Esta proteína fue el primer caso descrito de un regulador transcripcional cuya función se encuentra regulada por los niveles de c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008). Adicional al c-di-GMP, esta proteína también requiere ATP y la interacción con la proteína FleN (Dasgupta y Ramphal, 2001). Los análisis bioinformáticos predijeron la existencia de tres dominios: un dominio REC, un dominio AAA y un dominio HTH de unión a DNA, similar a los factores σ^{54} (Ghosh y col., 2010). Recientemente se ha determinado la estructura cristalográfica de esta proteína, permitiendo la identificación de los sitios de interacción con el ATP y el c-di-GMP, así como los aminoácidos clave (Matsuyama y col., 2016). También se identificó que esta proteína sería funcional como un hexámero en conformación anular. Uno de los sitios blancos de FleQ identificados es el promotor del operón *pel*. Cuando no hay c-di-GMP, este hexámero se une a dos sitios del promotor e impide la transcripción del RNA. Al unir c-di-GMP, este anillo cambia su y libera el sitio más cercano al punto de inicio de la transcripción, permitiendo la unión de la RNA polimerasa (Matsuyama y col., 2016).

La proteína VpsT es un regulador transcripcional que regula en forma positiva la expresión de los genes involucrados con la síntesis de los exopolisacáridos *vps* y reprime la motilidad. Este regulador está presente en diversos miembros del género *Vibrio*, incluyendo a *Vibrio cholerae*. Pertenece a la misma clase de reguladores maestros a la

que pertenece el regulador CsgD de *E. coli* y *Salmonella*. La afinidad de esta proteína por c-di-GMP ha sido determinada con una K_d de 3,2 μM . El motivo de unión a c-di-GMP presente en los diferentes ortólogos de VpsT es W[F/L/M][T/S]R. Al unir c-di-GMP, VpsT dimeriza por acción de un dominio REC degenerado y permite la interacción con las secuencias blanco en el DNA mediante el dominio HTH (Krasteva y col., 2010).

Clp es un regulador transcripcional de la familia CRP/FNR que posee identidad de secuencia y similitud estructural con la proteína de unión a AMP cíclico CRP, pero posee afinidad para c-di-GMP con una K_d de 0,16 a 0,22 μM (Tao y col., 2010). Las secuencias homólogas de Clp han sido descubiertas en los genomas de las bacterias patógenas de la familia Xanthomonadaceae (*Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*) (Leduc y Roberts, 2009; Tao y col., 2010; Chin y col., 2010). A diferencia del mecanismo descrito para otros reguladores tipo-CRP, Clp se encuentra unido a secuencias promotoras cuando no une un ligando. Al encontrarse unida a c-di-GMP, Clp regula en forma negativa procesos relacionados a la virulencia, como la síntesis de exopolisacáridos, la producción de celulasas extracelulares y la síntesis de la poligalacturonato liasa en el caso de *X. campestris* (Tao y col., 2010; Chin y col., 2010) y *X. axonopodis* (Leduc y Roberts, 2009).

La proteína Bcam1349 identificada en la bacteria patógena *Burkholderia cenocepacia* pertenece a la misma familia de reguladores transcripcionales que Clp. A diferencia de Clp, la unión de c-di-GMP aumenta la afinidad de la proteína por las secuencias blanco de DNA. La unión del complejo Bcam1349/c-di-GMP al DNA incrementa la expresión de genes relacionados a la síntesis de celulosa, a la producción de fimbrias y a la formación de biopelículas (Fazli y col., 2011).

1.2.2.2.4. Riboswitches específicos para c-di-GMP

Un riboswitch es un dominio estructural ribonucleico, el cual se encuentra en la región 5' no codificante de ciertos RNAs mensajeros, que regula en forma positiva o negativa la expresión post-transcripcional en respuesta a los niveles intracelulares de un ligando, ya sea por cambios en su estructura tridimensional, estabilidad o procesamiento (Sudarsan y col., 2008; Kulshina y col., 2009; Lee y col., 2010). Se compone de dos estructuras: una región de unión a ligando o aptámero y una región efectora o plataforma de expresión (Roth y Breaker, 2009).

En la actualidad se han descubierto dos clases de riboswitches específicos para c-di-GMP, denominados riboswitches de clase I y clase II, los cuales poseen diferencias estructurales y distintas afinidades por c-di-GMP. Los riboswitches clase I poseen una K_d de 10 pM (Smith y col., 2009), mientras que los riboswitches de clase II poseen una K_d cuyo valor varía entre 200 pM y 2 nM (Smith y col., 2011). Estos dominios se

encuentran frecuentemente en genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF o EAL, o en operones que codifican proteínas que median fenotipos que son regulados por c-di-GMP, como la biosíntesis del flagelo o la motilidad (Sudarsan y col., 2008).

Algunas bacterias tienen varios de estos riboswitches GEMM en su genoma, como *Geobacter uraniireducens*, que posee alrededor de 30, mientras que otras especies bacterianas no ha sido posible detectar alguna de las dos clases descritas (Sudarsan y col., 2008). Esto no descarta la posibilidad de que se encuentren nuevas clases de riboswitches que unan c-di-GMP.

1.2.2.3. Fenotipos regulados por c-di-GMP

A través de los distintos receptores descritos anteriormente, así como de posibles nuevos receptores que sean identificados en el futuro, el c-di-GMP puede ejercer su función a nivel de la transcripción (Hickman y Harwood, 2008; Sudarsan y col., 2008; Chin y col., 2010; Krasteva y col., 2010), la traducción (Sudarsan y col., 2008), la actividad (Merighi y col., 2007), la secreción (Monds y col., 2007; Jones y col., 2015) o la estabilidad de la proteína (Duerig y col., 2009). Es bien aceptado en la actualidad que los altos niveles intracelulares de c-di-GMP reprimen la motilidad y estimulan la formación de biopelículas. Sin embargo, los estudios han revelado que este segundo mensajero regula muchos más fenotipos que sólo la formación de biopelículas (Jonas y

col., 2009), por lo que el impacto global que posee este segundo mensajero en la fisiología bacteriana recién ha comenzado a descifrarse.

1.2.2.3.1. Síntesis de EPS

Al ser identificado como un activador de la síntesis de celulosa en bacterias (Ross y col., 1987), rápidamente se propuso que este segundo mensajero estaría relacionado al control de la formación de biopelículas. Los distintos trabajos revelaron que el c-di-GMP participa en la regulación de varias de las etapas de la formación de las biopelículas (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004; Thormann y col., 2006; Nakhamchick y col., 2008; Römling y col., 2013), ya sea en la adherencia inicial a las superficies (Thormann y col., 2006; Claret y col., 2007), la agregación celular (Römling y col., 2000), la secreción de los EPS (Ross y col., 1987; Weinhouse y col., 1997; Merighi y col., 2007) o la mantención de la integridad de la biopelícula (Newell y col., 2011; Cooley y col., 2015).

En *E. coli*, el c-di-GMP regula en forma positiva la producción de celulosa, fibras amiloides y poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (PGA). La producción de celulosa es mediada por una fina regulación de las actividades DGC y PDE, ya que se ha descrito que el promotor de los genes codificantes para la celulosa sintasa está siempre activo (Zogaj y col., 2001). Dentro de los reguladores participantes se encuentran: i) el factor sigma S (σ S), el cual es requerido para la expresión de siete proteínas GGDEF/EAL

(Weber y col., 2005), ii) CsgD, un regulador principal en la formación de biopelículas (Brombacher y col., 2006; Simm y col., 2009), iii) la proteína de unión a cAMP CRP, la cual unida a cAMP regula la formación de biopelículas (Jackson y col., 2002) y iv) la presencia de sRNAs que regulan los niveles de mRNA (Mika y Hengge, 2014). Estos módulos de control se transducen finalmente en el control de la actividad de la DGC DgcC (AdrA/YaiC), que produce el c-di-GMP que se une al dominio PilZ de BcsA. Adicionalmente, estos reguladores en conjunto con el c-di-GMP controlan la expresión de las fibras amiloides compuestas de subunidades de CsgA (Mika y Hengge, 2014). En el caso de la PGA, dos DGCs, DgcO y DgcZ, son necesarias para la formación de biopelículas dependientes de PGA. Mientras DgcO afecta a la transcripción del operón de biosíntesis de PGA, *pgaABCD*, la actividad de DgcZ estabiliza la síntesis de *pgaD* post-transcripcionalmente. Adicionalmente, el c-di-GMP se une a las proteínas PgaC y PgaD, lo cual estimula la interacción entre estas proteínas y promueve la actividad glicosil-transferasa (Tagliabue y col., 2010; Steiner y col., 2013).

En *P. aeruginosa*, los niveles de c-di-GMP controlan la biosíntesis de los exopolisacáridos alginato (Merighi y col., 2007), Pel (Lee y col., 2007) y Psl (Baraquet y Harwood, 2016). La actividad glicosil-transferasa del complejo que sintetiza alginato requiere de la unión de c-di-GMP a la proteína de membrana interna Alg44 a través del dominio PilZ presente en ésta (Merighi y col., 2007). En el caso de Pel, el c-di-GMP se une al motivo RxxD de PelD, lo cual permite que el complejo Pel sintetice Pel. La presencia de Pel fomenta el desarrollo del fenotipo de agregación multicelular (Lee y

col., 2007). La síntesis de Psl es regulada positivamente por c-di-GMP a nivel de la transcripción de genes *psl* (Baraquet y Harwood, 2016). Adicionalmente a la síntesis de EPS, el c-di-GMP participa en la mantención de la biopelícula al interactuar con LapD y prevenir la degradación proteolítica de la adhesina CtrA (Cooley y col., 2015).

1.2.2.3.2. Motilidad

Para que las células puedan pasar de un estado planctónico a uno sésil, deben regular la maquinaria involucrada con la motilidad, ya sea por swimming, swarming o twitching. La síntesis y el funcionamiento de flagelos o pilis requeridos para la motilidad son energéticamente costosos y son algo incompatible con el proceso de síntesis de grandes cantidades de EPS.

Se ha propuesto que para el caso de bacterias flageladas, el proceso de reducción de la motilidad debe darse en dos pasos: i) la reducción en la funcionalidad del aparato flagelar y, ii) la reducción en la transcripción de los genes flagelares, y por consiguiente la baja en la síntesis del aparato flagelar (Guttenplan y Kearns, 2013). Estas bajas en la expresión no llegan a niveles indetectables, ya que los flagelos son utilizados como un factor de adherencia a sustratos sólidos, especialmente durante las primeras etapas de formación de biopelículas (Chaban y col., 2015). Los experimentos han revelado que los niveles intracelulares de c-di-GMP participan en ambos pasos de la reducción de la motilidad (Ryjenkov y col., 2006; Wolfe y Visick, 2008; Guttenplan y Kearns, 2013).

En las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* está descrito que la reducción en la motilidad está dada por una baja en la actividad del aparato flagelar (Ryjenkov y col., 2006; Wolfe y Visick, 2008). Este cambio está mediado por la proteína YcgR, la cual posee un dominio PilZ funcional. Cuando los niveles de c-di-GMP se incrementan, YcgR une c-di-GMP e interactúa directamente con las proteínas FliG, FliM y MotA del cuerpo basal del flagelo, impidiendo la rotación de éste (Amikam y Galperin, 2006; Ryjenkov y col., 2006; Guttenplan y Kearns, 2013).

En la bacteria Gram-positiva *Clostridium difficile*, la inhibición de la motilidad se da a nivel de la transcripción de los genes del operón flagelar. La región 5' no codificante del RNA flagelar contiene un riboswitch GEMM del tipo I que une c-di-GMP. Cuando ocurre la unión del ligando, la estructura tridimensional del RNA se altera, causando que la transcripción termine en forma prematura (Sudarsan y col., 2008).

1.2.2.3.3. Virulencia

Otro de los fenotipos regulados por los niveles intracelulares de c-di-GMP que ha sido ampliamente estudiado es la regulación del fenotipo de virulencia en diversas bacterias patógenas de plantas o animales (Kulasakara y col., 2006; Ryan y col., 2007; Tamayo y col., 2007; McCarthy y col., 2008; Tamayo y col., 2008; Lai y col., 2009). Entre los fenotipos virulentos regulados por c-di-GMP se encuentran la adherencia e

invasión a las células del hospedero, la citotoxicidad, la secreción de factores de virulencia y la modulación de la respuesta inmune (Römling y col., 2013).

Los primeros indicios fueron detectados en *Vibrio cholerae*, en donde los niveles elevados de c-di-GMP reducen la expresión de la toxina del cólera en modelos de ratón (Tischler y Camilli, 2005). Adicionalmente, se determinó que la vía del c-di-GMP es necesario para la transición de la bacteria desde el hospedero hacia un estilo de vida libre y viceversa (Schild y col., 2007). En *X. campestris*, la producción y secreción de enzimas extracelulares con actividades celulasas y poligalacturonato liasas requeridas para la infección de plantas son inhibidas por la inactivación del regulador transcripcional Clp al unir c-di-GMP (Tao y col., 2010; Chin y col., 2010). Otras bacterias incluyen a *P. aeruginosa* (Kulesakara y col., 2006), *Anaplasma phagocytophilum* (Lai y col., 2008), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Ahmad y col., 2011) y cepas patógenas de *E. coli* (Claret y col., 2007; Spurbeck y col., 2012).

1.2.2.3.4. Progresión del ciclo celular

Recientemente se ha determinado que el ciclo biológico de algunas bacterias es dependiente de los niveles intracelulares de c-di-GMP. El ciclo más estudiado pertenece a la α -Proteobacteria *Caulobacter crescentus*, en donde el c-di-GMP afecta el desarrollo y la diferenciación celular (Duerig y col., 2009; Lori y col., 2015). Esta bacteria posee un ciclo replicativo asimétrico en donde una célula planctónica flagelada debe adherirse

a un sustrato sólido como primer paso para la división. La adherencia al sustrato sólido se da a través de una estructura similar a un tallo. Esta célula adherida replica su material genético y genera dos células hijas diferenciadas: una célula flagelada mótil y una célula adherida. Se ha determinado la fluctuación de la cantidad de c-di-GMP a través del ciclo celular: los niveles de c-di-GMP son bajos en la célula mótil, aumentan durante la diferenciación celular y finalmente llegan a un nivel intermedio previo a la división (Abel y col., 2013).

Cuando la célula se encuentra adherida, se activa la actividad quinasa de la proteína DivJ, la cual se encuentra ubicada en el polo celular más cercano al tallo. La actividad quinasa de DivJ fosforila a las proteínas PleD y DivK. PleD es una proteína con actividad DGC que produce la mayor parte del c-di-GMP durante la diferenciación celular (Paul y col., 2004). DivK es una proteína regulatoria que interactúa con el complejo proteico DivL/CckA. (Childers y col., 2014). La proteína CckA (Central cell cycle kinase A) es una quinasa/fosfatasa que fosforila y activa al inhibidor de la replicación CtrA a través de la fosfotransferasa ChpT (Chen y col., 2009). DivL/CckA interacciona directamente con DivK-P y con el c-di-GMP producido por PleD, activando la actividad fosfatasa de CckA para desfosforilar a CtrA, inactivándola (Lori y col., 2015). Adicionalmente, el c-di-GMP promueve la degradación de CtrA a través de la interacción con el receptor de c-di-GMP PopA y la proteasa ClpXP (Duerig y col., 2009; Abel y col., 2011).

1.2.2.3.5. Otros fenotipos regulados por c-di-GMP

Entre los otros fenotipos que experimentalmente se ha demostrado que están influenciados por los niveles intracelulares de c-di-GMP se encuentran la regulación de la esporulación y el metabolismo secundario en *Streptomyces coelicolor* (Tran y col., 2011; Hull y col., 2012), el comportamiento predatorio en *Bdellovibrio bacteriovorus* (Hobley y col., 2012) el desarrollo de heterocistos en *Anabaena sp.* (Neunuebel y Golden, 2008), la quimiotaxis en *Pseudomonas putida* (Sarand y col., 2008) y la resistencia a condiciones de estrés en *Mycobacterium smegmatis* (Kumar y Chatterji, 2008) o *Pseudomonas aeruginosa* (Klebensberger y col., 2008).

1.3. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Uno de los principales fenotipos regulados por las vías del QS y del c-di-GMP es la síntesis de la matriz extracelular de las biopelículas. Esta matriz está compuesta de diferentes clases de sustancias poliméricas, las cuales definen la arquitectura y distribución de las células dentro de la biopelícula. La estructura, la composición y la cantidad de EPS de una biopelícula son dependientes de diversos factores tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura, la naturaleza del sustrato, la fase de crecimiento y los microorganismos participantes (Davey y O'Toole, 2000; Thomas y Dieckmann, 2002; Branda y col., 2005; Moons y col., 2009). Dentro de los roles en los que participan estos EPS se encuentran la estructuración de la biopelícula, la prevención

de la desecación, la interacción de las células con otras células o con sustratos y la protección contra agentes externos nocivos, tales como sustancias tóxicas o depredadores (Vu y col., 2009; Fleming y Wingender, 2010; Whitfield y col., 2015).

El estudio de la naturaleza de los EPS puede involucrar diferentes metodologías, tanto destructivas, como la hidrólisis ácida y la espectrometría de masas (Chowdhury y col., 2011), como no destructivas, como el NMR (Vu y col., 2009) y el análisis de unión de lectinas fluorescentes (FLBA). Esta última técnica consiste en el uso de proteínas de unión a carbohidratos específicos denominadas lectinas para caracterizar la distribución *in situ* de EPS glicoconjugados en las biopelículas (Zippel y Neu, 2011). Ambos enfoques son adecuados para detectar la presencia de polisacáridos, junto con proteínas, lípidos, ácidos urónicos, sustancias húmicas y ácidos nucleicos como los principales componentes de los EPS, siendo los dos primeros los más abundantes (Fleming y Wingender, 2010).

1.3.1. Proteínas

Durante el proceso de formación de biopelículas se produce un gran cambio en el proteoma total de la célula, produciéndose gran cantidad de proteínas que son secretadas. La mayoría de las proteínas identificadas en las biopelículas están relacionadas con la estructura de la biopelícula y la adherencia hacia los sustratos u otras células. En bacterias, estas estructuras proteicas corresponden a pili (Wilksch y col.,

2011; Jones y col., 2015), fimbrias (Barnhart y Chapman, 2006), fibras amiloides (Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b), flagelo (Chaban y col., 2015) y adhesinas (Hinsa y col., 2003), las cuales interaccionan con superficies abióticas, componentes de la matriz extracelular o células ya sean de la misma especie u otra (Fong y Yildiz, 2015). Adicionalmente, también se producen y secretan enzimas con actividad hidrolasa (proteasa, glicosidasa, lipasa, fosfatasa, DNasa o RNasa) o liasa que permiten la utilización de nuevos nutrientes o facilitan el mantenimiento de la dinámica dentro de la biopelícula (Fleming y Wingender, 2010; Fong y Yildiz, 2015).

1.3.2. Exopolisacáridos

Tal como dice su nombre, los exopolisacáridos son polímeros compuestos de residuos glicosídicos que son secretados fuera de la célula. De todos los componentes presentes en los EPS de las biopelículas, los exopolisacáridos son los más abundantes y con la mayor variación estructural, ya que se componen de diferentes monómeros y suelen poseer ramificaciones, modificaciones de oxidación o reducción de residuos glicosídicos, epimerizaciones y/o adiciones covalentes de grupos funcionales como fosfatos, N-acilos, lípidos, proteínas o aminoácidos. Todas estas modificaciones están asociadas a la persistencia de las biopelículas bacterianas y a la interacción entre las células u otros EPS presentes en la biopelícula (Vu y col., 2009; Whitfield y col., 2015).

1.3.2.1. Celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal compuesto de subunidades de β -D-glucopiranosido unidos a través de enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) que puede interactuar con otras cadenas lineales del mismo polímero para formar estructuras filamentosas rígidas o cristalinas. Está catalogada como uno de los polímeros orgánicos más abundantes del planeta (Römling y Galperin, 2015). Este EPS es sintetizado a partir de UDP-Glucosa por el complejo multiproteico denominado Celulosa Sintasa. La actividad glicosil-transferasa de este complejo es dependiente de los niveles de c-di-GMP, el cual se une al dominio PilZ presente en la proteína BcsA del complejo (Weinhouse y col., 1997; Römling y Galperin, 2015).

A pesar de que este EPS comparte una estructura basal común, el número y la organización de los genes que codifican para las proteínas relacionadas a la síntesis de la celulosa varía entre los diferentes linajes bacterianos (Römling y Galperin, 2015). Adicionalmente, está descrito que algunas de estas bacterias que sintetizan celulosa modifican la estructura y propiedades de ésta mediante la adición de diferentes grupos funcionales (Römling y Galperin, 2015). Entre las bacterias que sintetizan celulosa como un componente de sus biopelículas se encuentran *Komagataeibacter xylinus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium leguminosarum* (Zogaj y col., 2001; Römling y Galperin, 2015).

1.3.2.2. Alginato

El alginato es un polímero con carga neta negativa que se compone principalmente de monómeros de ácido β -D-Manurónico y ácido α -L-Gulónico. Este heteropolímero ha sido caracterizado principalmente en cepas patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* con fenotipo de colonia mucosa aisladas desde pacientes con fibrosis quística infectados (Lyczak y col., 2000). La síntesis de este polímero está bajo el control de un operón que contiene 13 genes (Franklin y col., 2011).

El precursor de este polímero es sintetizado por la acción de las proteínas AlgA, AlgC y AlgD, las cuales convierten la Fructosa-6-P a GDP-Manuronato. Este precursor es polimerizado inicialmente como un homopolímero de Manuronato por la proteína Alg8 (Franklin y col., 2011). La actividad Glicosil-transferasa es controlada por la proteína de membrana Alg44, la cual une c-di-GMP a través de su dominio PilZ y estimula la biosíntesis (Merighi y col., 2007). A medida que el polímero cruza el periplasma, comienza a ser acetilado en los grupos hidroxilo presentes en los carbonos 2 o 3 del manuronato por el complejo proteico compuesto por AlgF, AlgI y AlgJ (Franklin y col., 2011). La epimerización de algunos residuos de β -D-manuronato a α -L-gulonato es llevada a cabo por la proteína periplasmática AlgG (Franklin y col., 1994). Esta epimerización altera la estructura tridimensional del polímero hacia una conformación aleatoria, impidiendo una interacción estrecha entre las cadenas del polímero y contribuyendo a la consistencia mucoide (Franklin y col., 2011).

1.3.2.3. Pel

Pel es un exopolisacárido que fue caracterizado inicialmente en cepas del género *Pseudomonas*, incluyendo *P. aeruginosa* PA14 y PAO1 (Vasseur y col., 2005; Mann and Wozniak, 2012). Este EPS está involucrado principalmente en la formación de fenotipos celulares agregativos y de biopelículas más robustas, además de la captación de hierro dependiente de pioverdina en diversas cepas de *P. aeruginosa*, incluidas cepas patógenas (Friedman and Kolter, 2004; Mann and Wozniak, 2012; Visaggio y col., 2015).

La síntesis de este EPS es dependiente de los genes presentes en el operón compuesto de 7 genes denominados *pel*ABCDEFG. Ninguno de los genes identificados codifica para proteínas relacionadas a la síntesis de posibles precursores, por lo que se supone que los azúcares utilizados en su biosíntesis derivan del metabolismo central (Vasseur y col., 2005; Franklin y col., 2011).

La actividad glicosil-transferasa del complejo, la cual es llevada a cabo por la proteína citoplasmática PelF (Ghafoor y col., 2013), se encuentra regulada positivamente por los niveles intracelulares de c-di-GMP a través de la proteína de membrana interna PelD (Lee y col., 2007). Adicionalmente, la expresión transcripcional de los genes del complejo Pel se encuentra regulada por el regulador transcripcional FleQ, el cual cambia

su afinidad por el DNA en forma dependiente de los niveles de c-di-GMP (Baraquet y col., 2012).

Durante un tiempo la composición exacta y la estructura tridimensional de este EPS fueron tema de intensa investigación. Siendo descrito inicialmente como rico en glucosa, recientemente se ha determinado que este exopolisacárido se compondría principalmente de motivos de N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina. Algunos de estos residuos glicosídicos serían desacetilados por la proteína PelA (Colvin y col., 2013), lo que dejaría a este EPS con una carga neta positiva. En *P. aeruginosa*, está descrito que la carga positiva le permite interactuar con el DNA extracelular secretado, lo cual permite estabilizar la estructura de la biopelícula (Jennings y col., 2015).

1.4. Biopelículas y Biolixiviación

1.4.1. Biolixiviación

Se define como biolixiviación al proceso natural de solubilización de sulfuros metálicos, el cual se encuentra mediado por el metabolismo energético de algunas bacterias y arqueas (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005). Este proceso biológico ha sido aplicado en la industria de la minería para la obtención de minerales valiosos como cobre, molibdeno u oro desde depósitos con baja cantidad de metal, o definido en minería como de baja ley (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005) los cuales no pueden

ser tratados por las metodologías tradicionales como la pirometalurgia, ya que el costo monetario, ambiental y laboral de la extracción es mucho mayor que la ganancia obtenida por el metal extraído (Acevedo y col., 1993; Rawlings, 1997; Castellanos, 2008; Gentina y Acevedo, 2013).

En Chile, el proceso de biolixiviación es utilizado a escala industrial principalmente para la extracción de cobre. La producción y exportación de cobre es el principal sustento económico del país. De todo el cobre extraído, lo que corresponde a lo menos unas cinco millones de toneladas de metal, un 5-10 % es obtenido a través de la biolixiviación microbiana (Gentina y Acevedo, 2013).

1.4.1.2. Microorganismos lixiviantes

Para optimizar el proceso de biolixiviación desde un punto de vista biológico es necesario determinar que microorganismos son los que participan en este fenómeno. Todos los microorganismos involucrados en la solubilización de sulfuros metálicos comparten ciertas características que les permiten subsistir bajo estas condiciones:

i) Quimiolitotrofia

Estos microorganismos obtienen toda la energía metabólica y poder reductor necesario a través de la oxidación del ión ferroso y/o de los compuestos

reducidos de azufre presentes en los minerales, como el sulfuro, el azufre, el tiosulfato y el tetrionato (Bosecker, 1997). Adicionalmente, la mayor parte de las bacterias descritas (*Acidithiobacillus*, *Acidiferrobacter* y *Leptospirillum*) son autótroficas, es decir, realizan fijación de CO₂ atmosférico para la producción de biomasa, mientras que las arqueas estudiadas y algunas bacterias como *Sulfobacillus* requieren de la presencia de algunos compuestos orgánicos para su crecimiento. También se ha descrito que algunos de estos microorganismos son diazotróficos, es decir, son capaces de fijar N₂ atmosférico, mientras que el resto obtiene el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos principalmente a partir del amonio (NH₄⁺).

ii) Acidofilia extrema

El proceso de oxidación de los compuestos reducidos de azufre, tales como el sulfuro, el azufre elemental, el tiosulfato o los politionatos, hasta ácido sulfúrico y la hidrólisis causada por los diferentes metales de transición presentes producen un entorno extremadamente ácido con un valor de pH entre 0 y 3. Las membranas y paredes celulares de estos microorganismos deben repeler el exceso de protones presentes en el medio para evitar la acidificación del citoplasma y la denaturación de las proteínas. En *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se ha sugerido que la porina Omp40 impediría el flujo libre de protones desde el medio extracelular hacia el periplasma (Guiliani y Jerez, 2000).

iii) Elevada resistencia a metales

El bajo pH del medio permite que los cationes metálicos se mantengan en solución a concentraciones extremadamente altas. Esto representa un serio problema de intoxicación por metales como el hierro, el cobre, el níquel, el cromo o el arsénico, así como el estrés oxidativo derivado. Estos organismos son naturalmente resistentes a metales por las propiedades de sus membranas que repelen el exceso de cargas positivas. Adicionalmente, muchos de los genomas secuenciados de microorganismos biomineros presentan varios elementos genéticos relacionados a la resistencia a metales (Dopson y col., 2003; Maezato y col., 2012; Navarro y col., 2013).

Entre los diferentes microorganismos que han sido descritos como miembros del consorcio biominero se incluyen bacterias Gram-negativa de los géneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* y *Acidiferrobacter*, bacterias Gram-positiva de los géneros *Sulfobacillus*, y *Acidimicrobium*, arqueas Crenarcheotas del género *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera*, y arqueas Euryarcheotas del género *Ferroplasma*, (Goebel y Stackebrandt, 1994). Entre todos estos microorganismos, los miembros más estudiados de este consorcio son las bacterias del género *Acidithiobacillus* (Williams y Kelly, 2013), que actualmente posee 7 especies descritas: *At. ferrooxidans* (Temple and Colmer 1951), *At. ferrivorans* (Hallberg y col., 2010), *At. ferridurans* (Hedrich y Johnson, 2013), *At. ferriphilus* (Falagan y Johnson, 2016), *At. caldus* (Hallberg y Lindström,

1994), *At. albertensis* (Bryant y col., 1988) y *At. thiooxidans* (Waksman and Joffe 1922). Todos los miembros de este género son capaces de oxidar distintos compuestos reducidos de azufre inorgánicos (RISCs) para obtener energía metabólica y poder reductor. Adicionalmente, *At. ferrooxidans*, *At. ferrivorans*, *At. ferridurans* y *At. ferriphilum* son capaces de oxidar el ion ferroso (Fe^{+2}) como fuente energética.

Para la utilización de un sustrato sólido por parte de los microorganismos biolixiviantes, es necesario que éstos puedan adherirse y formar una biopelícula estable sobre su superficie. Se ha descrito que este fenotipo de formación de biopelículas es una etapa clave para la optimización del proceso de biolixiviación y la subsecuente proliferación microbiana (Gehrke y col., 1998). La razón de la importancia de la formación de biopelículas en biolixiviación se debe a que el mecanismo de interacción entre sustrato mineral oxidable y los microorganismos es principalmente indirecto (Schippers y Sand, 1999; Sand y col., 2001): la interfase entre el EPS y el mineral es el sitio principal donde ocurre la disolución de los sulfuros insolubles, ya que los polisacáridos con carga negativa acomplejan el ion férrico, aumentando su concentración local. Este hierro férrico reacciona con el sulfuro metálico, permitiendo la liberación de compuestos reducidos de azufre, ión ferroso y otros cationes metálicos (Rawlings, 2004; Africa y col., 2013). Por el contrario, en el caso de sustratos como el azufre elemental se requiere de un contacto más directo: los EPS secretados deben mantener a las células unidas fuertemente al sustrato con el fin evitar la difusión

innecesaria de las proteínas secretadas que son requeridas para la activación inicial del azufre previo a su metabolización (Zhang y col., 2008).

1.4.2. Formación de Biopelículas en *Acidithiobacillus*

1.4.2.1. Antecedentes

A pesar de la diversidad de los microorganismos, las investigaciones sobre la formación de biopelículas en sulfuros metálicos y la composición de EPS en microorganismos biolixivantes se han centrado principalmente en *At. ferrooxidans*. Se ha descrito que los EPS de células de *At. ferrooxidans* crecidas en pirita son enriquecidos en ácidos urónicos, mientras que en sustratos no polares, como por ejemplo azufre elemental, los EPS se encuentran enriquecidos en componentes hidrófobos (Gehrke y col., 1998).

Algunos trabajos han reportado inicialmente que podrían existir diferencias significativas relacionadas con la cinética de crecimiento y el estado fisiológico de las sub-poblaciones celulares planctónicas y adheridas de *At. ferrooxidans* (Espejo y Romero, 1987;. Konishi y col., 1995). Inicialmente se sugirió que el estado fisiológico de las células planctónicas cultivadas en un sustrato oxidable sólido como el azufre elemental debería ser cercano a un estado de muerte celular (Espejo y Romero, 1987). Sin embargo, recientemente varios estudios centrados en el metabolismo energético

comparando células planctónicas cultivadas en medios con azufre elemental o ión ferroso como sustratos energéticos han sido reportados y no hacen válida esta primera hipótesis (Yarzabal y col., 2004; Ramírez y col., 2004; Bruscella y col., 2007; Quatrini y col., 2009; Vera y col., 2013).

Diferentes investigaciones se han centrado en la identificación de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la formación de biopelículas de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Estos estudios permitieron en primer lugar la caracterización de un tipo de sistema QS AI-1 funcional, que produce varias AHLs como AIs (Farah y col., 2005; Valenzuela y col., 2007). La adición exógena de estos AIs en el medio estimula la adherencia, la formación de biopelículas y la síntesis de EPS sobre cupones de azufre elemental, granos de piritita y filtros flotantes de policarbonato (Ruiz y col., 2008; González y col., 2013; Bellenberg y col., 2014). En *At. ferrooxidans*, un 42,5 % de los genes regulados por QS se relacionan a la síntesis de exopolisacáridos y a la formación de biopelículas (Mamani y col., 2016).

Adicional al sistema de QS, una vía del c-di-GMP funcional fue identificada en *At. ferrooxidans* ATCC 23270. A través de la detección y medición de c-di-GMP total de extractos celulares, se encontró que los niveles intracelulares de este segundo mensajero eran mayores en las células adheridas de cultivos en azufre o piritita en comparación con sus contrapartes planctónicas, lo que sugiere fuertemente un papel en la formación de biopelículas sobre estos sustratos sólidos (Ruiz y col., 2007; Ruiz y col., 2012).

Para otros miembros del género *Acidithiobacillus*, hay muy poca información acerca de la formación de biopelículas, la naturaleza del EPS y de su papel en la biolixiviación. Para caracterizar mejor el papel de algunas otras especies de *Acidithiobacillus* durante la colonización mineral, esta tesis doctoral se centra en la bacteria azufre-oxidante *At. thiooxidans*.

1.4.3.2. Formación de biopelículas en *Acidithiobacillus thiooxidans*

A pesar del hecho de que comparte el mismo nicho ecológico, *At. thiooxidans* presenta algunas fuertes diferencias fisiológicas con *At. ferrooxidans*. *At. thiooxidans* sólo es capaz de obtener energía metabólica y poder reductor a partir de compuestos reducidos de azufre tales como azufre elemental, tiosulfato, tetrionato y algunos sulfuros solubles en ácido como la covelita (CuS), la galena (PbS) y la blenda (ZnS) (Pistorio et al 1994; Schippers y Sand 1999; Kelly y Wood 2000), mientras que *At. ferrooxidans* pueden crecer también en ion ferroso, pirita (FeS₂) o calcopirita (CuFeS₂) (Kelly y Wood 2000).

Por otro lado, *At. thiooxidans* es incapaz de adherirse a la pirita si este mineral no es previamente electro-oxidado (Lara y col., 2010) o pre-colonizado con una biopelícula activa de bacterias hierro-oxidantes tales como *At. ferrooxidans* o *Leptospirillum* sp. (Bellenberg y col., 2014), pero tiene la capacidad de adherirse a diferentes conformaciones de azufre elemental, sean amorfas o cristalinas (Schaeffer y col., 1963).

Los análisis bioinformáticos de la secuencia genómica de la cepa tipo de *At. thiooxidans* ATCC 19377 mostró la presencia de varios genes putativos que codifican proteínas que estarían participando en la adherencia a sustratos sólidos, la formación de biopelículas y la síntesis de EPS (Valdés y col., 2011). Sin embargo, la regulación del fenotipo de formación de biopelículas o cómo los componentes del EPS median la adherencia bacteriana a la superficie del sustrato están poco estudiadas. En la búsqueda de posibles mecanismos moleculares que controlaran la formación de biopelículas, nuestro laboratorio se propuso investigar las vías del QS y del c-di-GMP, tal como habíamos hecho previamente para *At. ferrooxidans*. Los análisis bioinformáticos revelaron que esta bacteria carece del sistema QS tipo AI-1 canónico (Valdés y col., 2008). Sin embargo, se ha reportado de que *At. thiooxidans* es capaz de producir AHLs, lo que sugiere que una comunicación de célula a célula podría ocurrir en esta especie (Ruiz y col., 2008; Bellenberg y col., 2014).

Ante la falta de una vía canónica de QS en *At. thiooxidans*, se decidió enfocar en estudiar la vía del c-di-GMP en esta bacteria. Los resultados de los análisis bioinformáticos, PCR en tiempo real, análisis de extractos celulares enriquecidos en nucleótidos y experimentos de complementación heteróloga permitieron a nuestro grupo identificar la presencia de una vía funcional c-di-GMP en *At. thiooxidans* (Díaz, 2010; Díaz y col., 2013; Díaz, 2014). Al realizar la búsqueda de posibles proteínas efectoras de c-di-GMP en *At. thiooxidans* ATCC 19377, se pudo identificar la presencia de varios genes que codifican para las putativas proteínas de pili y fimbrias, así como

componentes de putativos complejos proteicos involucrados en la biosíntesis de EPS, incluyendo una proteína tipo PelD, la cual formaría parte complejo de un membrana involucrada en la biosíntesis de un EPS tipo-Pel.

Estos antecedentes nos hacen pensar en las siguientes preguntas: 1) ¿la composición de este EPS, así como la regulación de su biosíntesis serán similares a lo descrito para *P. aeruginosa*? y 2) ¿cuál es el rol que este EPS estaría cumpliendo en la formación de biopelículas sobre sustratos como el azufre? En base a estas preguntas, se desarrolló esta investigación.

2. Hipótesis

En base a los antecedentes entregados anteriormente es posible proponer la siguiente hipótesis: **“La bacteria oxidante de azufre *Acidithiobacillus thiooxidans* es capaz de producir el exopolisacárido tipo-Pel, el cual es una estructura clave para la formación de biopelículas por esta bacteria acidófila”**.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Caracterizar las vías moleculares de la regulación de la producción del exopolisacárido Pel y el rol de éste en la adherencia celular a sustratos sólidos como azufre elemental en la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Caracterizar los elementos genéticos del operón *pel* mediante análisis bioinformáticos y por PCR.
- 3.2.2. Caracterizar los componentes del EPS desde células de *At. thiooxidans* crecidas en azufre.
- 3.2.3. Analizar por qRT-PCR la expresión transcripcional de los genes del operón *pel* en células planctónicas y adheridas de *At. thiooxidans* crecidas en azufre.
- 3.2.4. Analizar el efecto de moléculas de Quorum Sensing (QS) en la producción de EPS y la transcripción del operón *pel* en *At. thiooxidans*.
- 3.2.5. Desarrollar una cepa mutante de *At. thiooxidans* deficiente en la proteína efectora PelD y evaluar su adherencia a azufre elemental.
- 3.2.6. Integrar los resultados al nivel de la discusión para la definición de modelos de síntesis y regulación del EPS Pel.

4. Materiales y Métodos

4.1. Cepas y condiciones de cultivo

Todas las cepas bacterianas y plasmidios utilizados en este trabajo se encuentran en la tabla A1 (Anexo 1, pág. 127). Las cepas de *Acidithiobacillus thiooxidans* fueron crecidas rutinariamente en medio líquido Mackintosh (MAC) (Mackintosh, 1975) pH 4,5 suplementado con 1 mM KH_2PO_4 , 1mM MgSO_4 , 20 μM FeSO_4 y 5 % de azufre elemental en perlas (S^0) o con 5 g/l de tiosulfato de sodio pentahidrato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) como posibles sustratos energéticos, a una temperatura de 30 °C con agitación orbicular. Para el crecimiento en medio sólido, el medio fue suplementado con tiosulfato de sodio como fuente energética, 1 mM MgSO_4 adicional, 8 mg/l Verde de Bromocresol (sal sódica) (Starosvetsky y col., 2013) y 0,88 % Phytigel (Sigma®) (Castro, 2013). Las cepas de *Escherichia coli* fueron crecidas rutinariamente en medio líquido LB (10 g/l Triptona, 5 g/l Extracto de levadura, 5 g/l NaCl, pH 7,0) a 37 °C. Para el medio sólido, se adicionó 1,5 % p/V Agar. Cuando fuese necesario, los medios fueron suplementados con los siguientes antibióticos: 100-200 $\mu\text{g/ml}$ Kanamicina en el caso de *At. thiooxidans*, y 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamicina y 50 $\mu\text{g/ml}$ Trimetropin para *E. coli*. Para el almacenamiento a largo plazo, las cepas de *At. thiooxidans* fueron centrifugadas y resuspendidas en 7 % DMSO, mientras que las cepas de *E. coli* fueron resuspendidas en 30 % Glicerol. Todas las suspensiones bacterianas fueron almacenadas a -80 °C.

4.2. Análisis bioinformáticos

La secuencia genómica de *At. thiooxidans* ATCC 19377 fue obtenida de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Una vez obtenida la secuencia de PelD, se procedió a realizar un análisis del contexto genómico del gen *pelD*. Las secuencias aminoacídicas de los ortólogos de PelD fueron seleccionadas de la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando como base la secuencia de la proteína PelD de *P. aeruginosa* PA14. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas utilizando el algoritmo ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las figuras de los alineamientos múltiples de PelD fueron realizadas mediante Espript 3.0 (<http://escript.ibcp.fr/EScript/EScript/>).

4.3. Análisis de los niveles de RNA del operón *pel*

Para determinar si los putativos genes *pel* se expresaban, se procedió a un experimento de qRT-PCR. Se prepararon matraces con medio líquido y 5% p/V de azufre en cupones, los cuales fueron inoculados con 10^7 células/ml. Los cupones de azufre se hicieron derritiendo azufre en polvo y depositándolo en un portaobjetos. Después de 5 días de incubación, se recolectaron las subpoblaciones celulares planctónicas y adheridas para la extracción del RNA total. Las células planctónicas fueron recolectadas por centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos. Las células adheridas fueron recolectadas con 0,05 % Triton X-100 en H₂SO₄ acuoso (pH 2,0) en un

vortex durante 10 min. El sobrenadante resultante fue centrifugado a 6000 x g por 15 minutos para recuperar las células. Este sedimento fue resuspendido en 1 ml de H₂SO₄ acuoso (pH 2,0) y centrifugado 2 veces a 100 x g por 5 minutos para separar las células del azufre. Una vez que las subpoblaciones fueron recuperadas, éstas fueron incubadas en 1 ml de RNALater®. Cuando se procedió a la extracción, las muestras fueron centrifugadas a 10000 x g durante 5 minutos y lavadas con 1 ml de H₂SO₄ acuoso (pH 2,0), centrifugando nuevamente.

Para realizar la lisis celular, las muestras fueron resuspendidas en 700 µl de solución de lisis (20 mM acetato de sodio pH 5,5, 1 mM EDTA, 0,5 % p/V SDS y 1 % V/V β-mercaptoetanol). La extracción de RNA se realizó en base al protocolo de extracción con fenol caliente (Ruiz y col., 2007). El RNA obtenido se trató mediante digestión con DNasa I previo a la síntesis de cDNA. El cDNA se sintetizó con 1 µg de RNA purificado y 500 ng de hexámeros aleatorios como partidores utilizando la enzima transcriptasa reversa Improm-II (Promega®). Para la reacción de RT-PCR se utilizó como templado 100 ng de DNA genómico de *At. thiooxidans* o 1 µl de cada solución 1/20 de cDNA sintetizado a partir del RNA purificado en un volumen final de reacción de 20 µl al cual se le añadió 200 µM de cada dNTP, 5 % V/V DMSO y 0,5 µM de cada partidor (Tabla A2), los cuales hibridaban dentro del gen para los experimentos de RT-PCR o en las zonas intergénicas para averiguar si la expresión del cluster génico es como un operón. Todos los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al

1,5% p/V en TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA) y teñido usando GelRed®.

Para determinar los niveles cuantitativos de la expresión transcripcional de los genes a estudiar, se utilizó la técnica de qPCR usando como sistema reportero la molécula fluorescente SYBR Green. Para la calibración se utilizaron soluciones de DNA genómico de *At. thiooxidans* ATCC 19377, el cual fue purificado por el método descrito en Aljanabi y Martinez (1997), en un rango de concentración desde 100 ng/μl hasta 100 fg/μl, lo que equivale entre 3×10^7 y 30 copias de DNA/μl. Se preparó una mezcla de reacción en que se utilizaron 0,1 μM para cada partidor y como templado 1 μl de una solución de DNA genómico de concentración conocida, 1 μl de una dilución 1/30 de cDNA sintetizado a partir del RNA purificado o 1 μl de H₂O para el control negativo en un volumen final de reacción de 10 μl. La normalización de los resultados se realizó midiendo los niveles de expresión de los genes 16S y *map* (Nieto y col., 2009).

4.4. Extracción y análisis de EPS

La extracción se basó en la agitación mediante vórtex de los cupones utilizados como sustrato energético. Los cupones fueron lavados suavemente una vez con H₂SO₄ acuoso pH 2,0 y una vez con 10 mM KH₂PO₄ pH 4,5 para eliminar células planctónicas. Después los cupones fueron agitados en vórtex 2 veces en 0,05 % Triton X-100 en 10 mM KH₂PO₄ pH 4,5 durante 10 min por vez. La suspensión fue centrifugada una vez a

1000 x g a 4 °C por 5 min para eliminar el azufre y una segunda vez a 16000 x g a 4 °C por 10 min para eliminar las células. El sobrenadante fue incubado con etanol y ultracentrifugado a 100000 x g a 4 °C por 1 h para eliminar el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 300 µl de Tris 20 mM, 1 mM EDTA, pH 7,4 y almacenado a -20 °C. A cada muestra se le determinó el contenido de carbohidratos (Dubois y col., 1956), proteínas (Bradford, 1976), ácidos urónicos (Filisetti–Cozzi y Carpita, 1991), hierro (Fortune y Mellon, 1938), lípidos (Cheng y col., 2011) y ácidos nucleicos mediante espectrofotometría. Los datos fueron normalizados contra peso húmedo de células.

4.5. Visualización de azúcares de superficie en biopelículas

Para la visualización de azúcares, aproximadamente 1×10^7 cel/ml fueron crecidas en 50 ml de medio MAC utilizando azufre en cupones como sustrato energético. Los cultivos fueron incubados durante un total de 120 h. Los cupones fueron lavados suavemente vez con H₂SO₄ acuoso pH 2,0, una vez con 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) y tres veces con agua desionizada. Los cupones fueron incubados con lectinas conjugadas con TRITC a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 h. Las muestras fueron lavadas con agua y teñidas con 0,01 % DAPI en 2% formaldehído como medio de contraste para ser visualizadas mediante microscopía de epifluorescencia. Se fotografiaron 10 áreas diferentes en 3 cupones diferentes. El criterio de selección de fenotipos fue en base a los patrones que se repetían a lo menos en el 70 % de las fotos.

4.6. Ensayo de adherencia en *At. thiooxidans*

Para los ensayos de adherencia, aproximadamente 1×10^8 cel/ml fueron crecidas en 50 ml de medio MAC utilizando cupones de azufre como sustrato energético durante un total de 120 h. A distintos períodos de tiempo durante la incubación, los cupones fueron extraídos del matraz y lavados suavemente vez con H_2SO_4 acuoso pH 2,0, una vez con 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) y tres veces con agua desionizada. El exceso de líquido fue eliminado y las muestras fueron fijadas mediante una incubación en 4 % formaldehído durante la noche. Las muestras fijadas fueron secadas a punto crítico, cubiertas en oro y preparadas para su posterior visualización por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido SEM, Facultad de Física, Pontificia Universidad Católica de Chile).

Para determinar el efecto de la adición exógena de AHLs sobre la adherencia y formación de biopelículas, se procedió a incubar células de la cepa ATCC 19377 en presencia de ya sea C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL o C10-AHL a una concentración de 5 μ M cada una. Los cupones fueron extraídos a diferentes tiempos de incubación, lavados con H_2SO_4 acuoso pH 2,0, solución tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) y finalmente con agua desionizada. Las muestras fueron teñidas con 0,01 p/V % DAPI en 2 p/V % formaldehído para ser visualizadas mediante microscopía de epifluorescencia. Al igual que con la visualización de azúcares mediante el uso de lectinas conjugadas a moléculas

fluorescentes, el fenotipo seleccionado para los análisis comparativos era el cual se repetía en el 70 % de todas las fotografías.

4.7. Construcción del plasmidio suicida para mutar *pelD*

A partir de gDNA purificado de la cepa ATCC 19377 se procedió a clonar dos fragmentos de 800 bp ubicados río arriba y río debajo de la región de *pelD* que se pretendió escindir. La región río arriba fue amplificada utilizando partidores con sitios de restricción para las endonucleasas *SacI* y *HindIII*, mientras que para la región río abajo se utilizaron sitios *XmaI* y *XbaI* (Tabla A2). Los fragmentos fueron purificados a partir de geles de 1 p/V % agarosa en solución TAE 1X y ligados al vector pGEM-T Easy (Promega®). Estas ligaciones fueron utilizadas para transformar *E. coli* JM109. Posteriormente, los fragmentos fueron escindidos con las correspondientes enzimas de restricción y purificados. Paralelamente, el plasmidio pSKM2 fue digerido con *HindIII* y *XmaI* para purificar el cassette de resistencia a Kanamicina. Los fragmentos purificados fueron ligados al vector pOT, el cual fue cortado con *SacI* y *XbaI* y posteriormente tratado con fosfatasa alcalina previo a la ligación. La ligación final fue usada para transformar *E. coli* JM109 para obtener el plasmidio suicida pOT-*AttpelD::kan^R*. La identidad de las construcciones fue chequeada mediante PCR de colonia convencional, análisis de restricción y secuenciación (MACROGEN®).

4.8. Conjugación entre *At. thiooxidans* y *E. coli*

Las células de *E. coli* HB101 fueron transformadas mediante electroporación con los plasmidios pR388 y pOT-*AttpelD::kan^R* y seleccionadas mediante la resistencia a Ampicilina, Kanamicina y Trimetropin en medio LB. Para la pre-adaptación de *E. coli*, 50 ml de medio MAC suplementado con tiosulfato, 0,5 mM D-Glucosa, 0,05 % Extracto de levadura, 50 µM Ácido diaminopimélico y los antibióticos correspondientes fueron inoculados con 1% de un cultivo de noche de *E. coli* en medio LB con antibióticos. Las células fueron incubadas a 37 °C durante la noche previa a la conjugación. Las células de *At. thiooxidans* ATCC 19377 fueron crecidas en 400 ml de medio MAC con tiosulfato durante 5 días previo a la conjugación.

Para realizar la conjugación, las células de ambos cultivos fueron recolectadas por centrifugación a temperatura ambiente y posteriormente lavadas 2 veces con medio MAC pH 4,5 estéril. Las células de cada especie fueron resuspendidas separadamente en 250 µl de medio MAC pH 4,5 y mezcladas en proporción 1:1 v/v. Alícuotas de 100 µl de esta mezcla celular fueron depositadas sobre filtros de policarbonato estéril (Whatman®) y filtradas con vacío. Los filtros con células fueron depositados en placas con medio sólido MAC con tiosulfato, 0,5 mM D-Glucosa, 0,05 % Extracto de levadura y 50 µM Ácido diaminopimélico. Las placas se incubaron a 28 °C durante 5 días.

Luego de la incubación, los filtros fueron recuperados y depositados separadamente en matraces con 400 ml de medio MAC pH 4,5 con tiosulfato y 200 µg/ml Kanamicina para seleccionar a las cepas transconjugantes de *At. thiooxidans*. Los cultivos fueron incubados a 28 °C durante una semana. La concentración final de células en el medio después de la recuperación se determinó mediante una cámara de conteo Petroff-Hausser. Finalmente, los cultivos de *At. thiooxidans* fueron diluidos apropiadamente, y 100 µl de esta suspensión diluida fueron plaqueados en medio MAC sólido conteniendo 100 µg/ml Kanamicina. Las placas se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias.

4.9. PCR de macrocolonia

Después de la obtención de colonias resistentes, se procedió a realizar una primera selección para comprobar la adquisición del gen *Kan^R* y la pérdida del gen *pelD*, en base al protocolo de PCR de colonia. Para realizar este análisis, las colonias transconjugantes fueron resuspendidas en 10 µl de medio MAC e inoculadas en placas numeradas de medio MAC sólido con Kanamicina. Este paso es necesario debido al diminuto tamaño de las colonias. Luego del período de incubación, un fragmento de la macrocolonia fue resuspendida en 100 µl de solución conteniendo 25 mM Tris-HCl, 3 mM KCl, pH 7,5 para neutralizar el ácido producido por las bacterias. La suspensión bacteriana fue incubada a 100 °C por 10 min y centrifugada a 16000 x g por 2 min para eliminar los restos celulares. 5 µl de este lisado se utilizaron como templado para la reacción de PCR

en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 5 % DMSO, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 0,2 μ M de partidores, 1,5 mM MgCl₂ y 0,2 mM de cada dNTP. El programa de la reacción fue de 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 90 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2 % en TAE 1 X.

4.10. Construcción de las sondas *pelD* y Kan^R

Las sondas específicas para los genes *pelD* y Kan^R fueron construidas mediante PCR convencional. En un volumen de 50 μ l se incubaron 100 ng de DNA genómico para *pelD* o 50 ng de plásmido pKMS2 para *kan^R* con 5 % DMSO, 0,2 μ M de partidores específicos, 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM dCTP, 0,13 mM dTTP y 0,07 mM Dig-11-dUTP. El programa de la reacción fue de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 90 s a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1 % en TAE 1 X. Estos productos de PCR fueron purificados desde los geles y resuspendidos en 50 μ l de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) y guardados a -20 °C, protegidos de la luz. La cuantificación y pureza de las sondas se verificó por medición de absorbancia a 260 nm mediante Nanodrop y por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

4.11. Southern Blot

Para comprobar que los posibles transconjugantes candidatos fueran mutantes nulos en el gen *pelD*, se procedió a realizar un análisis por Southern Blot (Sambrook, 1989). En resumen, 10 µg de gDNA, ya sea de la cepa parental o cepas mutantes o 1 µg de construcciones plasmidiales pOT (controles positivos para *pelD* o *kan^R*) fueron digeridos durante 1 h con *BamHI* para *kan^R* o *SphI* para *pelD* en un volumen de reacción de 20 µl. Las digestiones fueron corridas a 40 V en un gel de agarosa al 1 % en TBE 1 X (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA). El gel fue teñido usando GelRed® y fotografiado. Posteriormente el gel fue incubado en 0,25 M HCl durante 30 min, seguido de 3 lavados con H₂O destilada, 2 incubaciones con solución denaturante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) por 20 min, 2 incubaciones con solución neutralizante (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, 10 mM EDTA, pH 7,2) por 20 min y un lavado con solución de transferencia SSC 10 X (1,5 M NaCl, 150 mM Citrato trisódico, pH 7,0). El DNA fue transferido a una membrana de Nylon con carga positiva (IMMOBILON-NY⁺) durante la noche. La membrana fue lavada con solución SSC 2 X (dilución 1/5 de SSC 10 X en H₂O desionizada) y secada a temperatura ambiente. El DNA se fijó a la membrana mediante una incubación a 80 °C durante 2 horas. La membrana se lavó con SSC 2 X y con H₂O destilada previo a la pre-incubación. La preincubación se realizó en DIG Easy Hyb Buffer (ROCHE®) a 42 °C durante 30 min. La incubación de la membrana se realizó en 10 ml de una solución de DIG Easy Hyb Buffer conteniendo 25 ng/ml de la sonda marcada a 42 °C durante la noche. Una vez incubada, la membrana fue incubada 2 veces

con 50 ml de SSC 2 X, 0,1 % p/V SDS a temperatura ambiente por 15 min y 2 veces con 50 ml de SSC 0,1 X, 0,1 % p/V SDS a 68 °C por 15 min con el objetivo de eliminar el exceso de sonda y las uniones inespecíficas de ésta.

Previo a la incubación con el anticuerpo anti-DIG, la membrana se lavó una vez con 50 ml de tampón Ab (100 mM Ácido Maleico, 100 mM NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,5) y posteriormente fue incubada en 100 ml de solución de bloqueo (5 % p/V de leche descremada en polvo en tampón Ab) por 30 min. Luego de lavar la membrana dos veces en tampón Ab, ésta fue incubada por 30 min en 100 ml de una dilución 1/5000 de anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche®) en solución tampón Ab. Luego de la incubación, la membrana se lavó dos veces con tampón Ab para remover el exceso de anticuerpo y eliminar interacciones inespecíficas, y una vez con tampón AP (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) para activar a la fosfatasa alcalina. Finalmente, la membrana fue incubada en 10 ml de solución de revelado (330 µg/ml NBT (Nitroblue Tetrazolium) y 165 µg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) en tampón AP) a temperatura ambiente hasta la aparición de señal sobre la membrana. Una vez revelada, la membrana fue lavada una vez con agua destilada y secada a temperatura ambiente, para luego ser fotografiada.

4.12. Análisis proteómico.

4.12.1. Obtención de proteínas del sobrenadante

Las células fueron incubadas en 500 ml de medio MAC con azufre elemental como sustrato durante un período de 5 días. Una vez crecidas las células, la fracción líquida del cultivo fue centrifugada para obtener el sobrenadante. Para la recuperación de las proteínas secretadas, los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados a través de un filtro de 0,22 μm para eliminar las células y material particulado presente. Estos filtrados fueron mezclados en proporción 1:1 con solución PRMM (50 μM Rojo de Pirogalol, 160 μM Na_2MoO_4 , 1 mM oxalato de sodio, 50 mM ácido succínico, 20 % Metanol, pH 2,0 ajustado con HCl). Posteriormente, el pH de la mezcla fue ajustado a 2,8 con NaOH. La precipitación de proteínas se realizó por una incubación a temperatura ambiente por 2 h, seguido de una incubación a 4 °C durante la noche. Los precipitados fueron recolectados por filtración en filtros de nitrocelulosa. Los filtros fueron incubados con acetona 100 % para disolver la nitrocelulosa y recuperar el precipitado, centrifugando a 6000 x g a 4 °C durante 15 min y descartando el sobrenadante. Las proteínas recuperadas fueron lavadas una vez más con acetona 100 % y finalmente lavadas con solución de acetona 60% V/V en agua, repitiendo las centrifugaciones. Después de evaporar el solvente por incubación a temperatura ambiente por 20 min, las proteínas fueron resuspendidas en 500 μl de 20 mM Tris pH 7,4 y luego separadas en dos partes iguales de 250 μl . Una de las fracciones fue precipitada nuevamente con acetona, lavada y resuspendida en 250 μl de 8 M Urea,

2 M Tiourea, 4 % p/V CHAPS y 10 mM DTT, con el fin de ser utilizada para chequear la calidad de la preparación mediante electroforesis SDS-PAGE unidimensional. Todas las muestras de proteínas fueron almacenadas a -20 °C (Caldwell y Lattemann, 2004; Pagliai, 2007).

4.12.2. Electrofororesis

Para preparar las muestras a cargar en los geles de proteínas, un volumen de solución de proteínas fue recolectado y mezclado con 0,5 volúmenes de solución de carga 3X (150 mM Tris-HCl pH 6,8, 3 mM EDTA, 12 % p/V SDS, 6 % V/V β -ME, 37,5 % V/V Glicerol y 0,03 % p/V Azul de Bromofenol) antes de cargar. Las muestras de proteínas provenientes de las extracciones de EPS fueron calentadas a 95 °C en esta solución de carga 1X por 10 min, con el objetivo de desnaturalizar las muestras.

La electroforesis de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5 % p/V usando una solución de corrida compuesta de 25 mM Tris, 192 mM Glicina y 0,1 % p/V SDS con un voltaje constante de 150 V. Después de la electroforesis, los geles se lavaron una vez con agua destilada y fueron posteriormente teñidos con 0,05 % Azul de Coomassie R-250 en solución fijadora (50 % metanol, 10 % ácido acético, 40 % agua) durante 1 h. El desteñido de los geles se realizó mediante varios lavados consecutivos con solución de desteñido (5 % metanol, 7 % ácido acético, 88 % agua) y finalmente con agua destilada antes de ser registrado mediante fotografía.

4.12.3. Preparación para Análisis por espectrometría de masas.

Las fracciones de las muestras de secretoma que permanecieron resuspendidas en la solución de Tris fueron dializadas en contra de esta misma solución antes de ser congeladas a -80 °C para ser liofilizadas. Estos liofilizados fueron enviados a Plateforme de Protéomique Clinique, Sys2Diag (CNRS/Alcediag - UMR 9005, Montpellier, Francia) para su análisis y la identificación de proteínas que poseían expresión diferencial entre las cepas. En primer lugar, las proteínas fueron corridas a 16577 V.h para separarlas por punto isoeléctrico en un rango de pH de 3 a 10. Después se separaron por peso molecular en una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % bajo condiciones denaturantes. Los geles fueron teñidos con plata para revelar las proteínas.

Con respecto a las muestras de proteínas de EPS, se procedió a extraer directamente desde el gel las bandas que mostraran diferente expresión entre las condiciones analizadas. Estos fragmentos de geles fueron secados mediante el uso de Speedvac a una temperatura de 37 °C por 120 min. Los geles secos fueron almacenados a -80 °C hasta su envío a Plateforme de Protéomique Clinique, Sys2Diag (CNRS/Alcediag - UMR 9005, Montpellier, Francia) para su secuenciación e identificación.

4.13. Análisis comparativo de la resistencia mecánica de las biopelículas formadas por las cepas de *At. thiooxidans* silvestre y mutante $\Delta pelD$.

Para realizar este análisis comparativo, las células fueron incubadas en medio líquido con cupones de azufre como sustrato energético. Los cupones fueron incubados en una solución acuosa de 0,05 % V/V Triton X-100 en H₂SO₄ acuoso (pH 2,0) y agitados en un vórtex durante un período total de 10 min con el fin de medir la resistencia mecánica de la biopelícula mediante conteo celular. En períodos de 60, 150, 300, 450 y 600 s se extrajeron alícuotas para contar el número de células liberadas mediante una cámara de conteo Petroff-Hausser. Previo al conteo, las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 1000 x g por 3 min para eliminar el polvo de azufre y cualquier otro material particulado generado durante la agitación. Cada muestra de células fue contada al microscopio en duplicado. Los resultados obtenidos fueron expresados como el número promedio total de células liberadas por gramo de azufre total utilizado en cada experimento.

5. Resultados

5.1. Caracterización del operón *pel* de *At. thiooxidans*

Cuando se identificó el putativo gen *pelD* en el genoma de la cepa ATCC 19377 de *At. thiooxidans*, se procedió a analizar el contexto genómico para identificar un posible operón. El cluster génico identificado posee algunas diferencias con respecto al operón *pel* de *P. aeruginosa* PA14: los genes *pelA* y *pelB* se encuentran divididos, cada una de las divisiones estaría codificando un dominio de la proteína, y al final del operón se encuentra un putativo gen codificante para una UDP-glucosa-4-epimerasa tipo *wcaG* (Fig. 2). Al analizar los genomas disponibles de las bacterias que habitan en los entornos minerales ácidos, se encontró que los genes involucrados en la síntesis de Pel sólo estaban presentes en los genomas de *At. thiooxidans* y *At. caldus*, los cuales son *Acidithiobacillus* que son incapaces de oxidar hierro (Tabla 2).

Una vez determinada la estructura del operón *pel*, se procedió a averiguar si estos genes *pel* se encontraban presentes en los genomas de otras cepas de *At. thiooxidans* que no estaban secuenciadas. Para realizar esto, se procedió a extraer el gDNA a partir de las cepas de colección de laboratorio DSM 504, DSM 622, Thio2 y DSM 9463 para realizar un análisis comparativo por PCR utilizando los partidores diseñados en base a la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC 19377. Los resultados de estos análisis

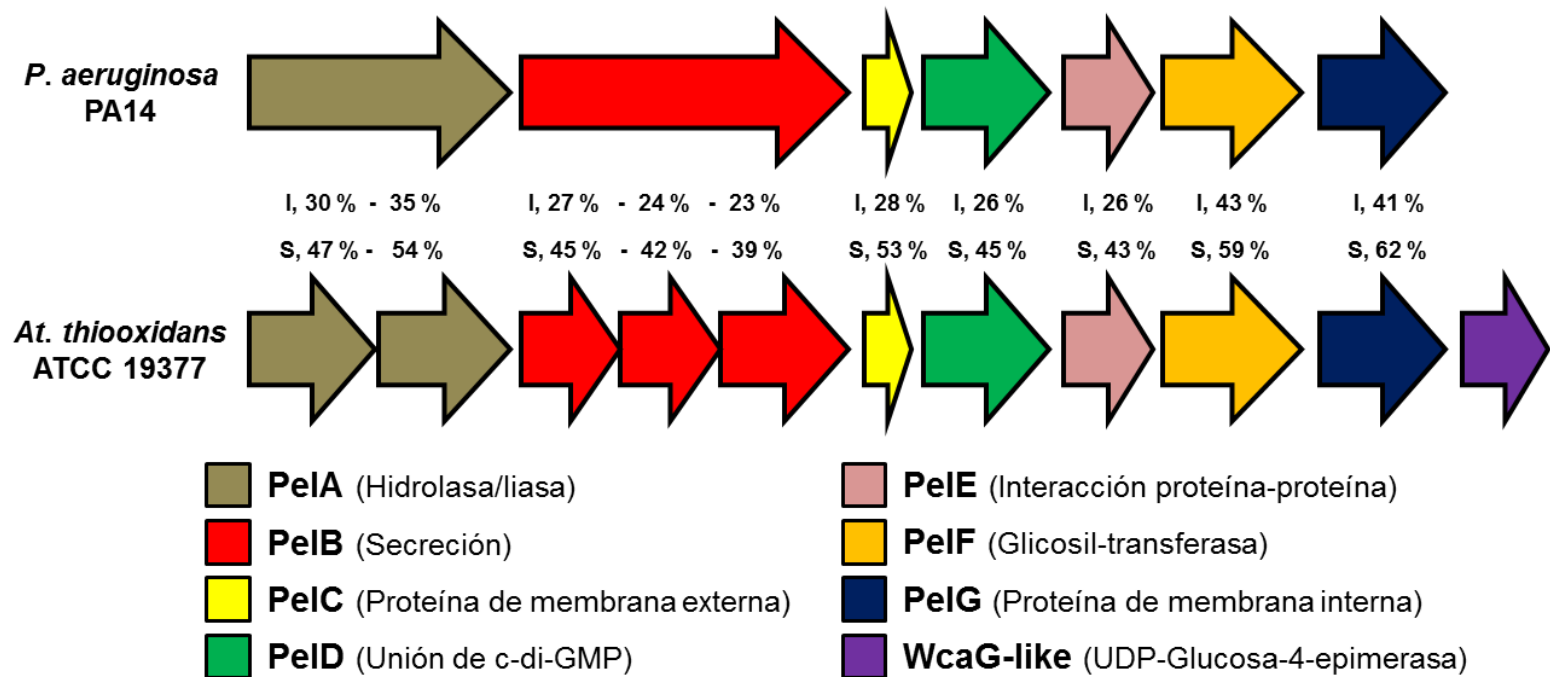


Figura 2. Comparación estructural entre el putativo operón *pel* identificado en *At. thiooxidans* ATCC 19377 y el operón *pel* canónico de *P. aeruginosa* PA14. Las secuencias aminoacídicas de los productos génicos fueron comparadas para obtener los porcentajes de identidad y similitud.

Tabla 2. Presencia/ausencia del operón *pel* en los genomas secuenciados de diferentes bacterias presentes en entornos minerales ácidos.

Bacteria	Clase	Operón <i>pel</i>
<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756	Acidithiobacillia	+
<i>Acidithiobacillus caldus</i> SM-1	Acidithiobacillia	+
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3	Acidithiobacillia	-
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	Acidithiobacillia	-
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 53993	Acidithiobacillia	-
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> A01	Acidithiobacillia	+
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377	Acidithiobacillia	+
<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	α -Proteobacteria	-
<i>Acidiphilium multivorum</i> AIU301	α -Proteobacteria	-
<i>Acidiphilium</i> sp. PM	α -Proteobacteria	-
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> CAGRF5319	Nitrospira	-
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> ML-04	Nitrospira	-
<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>	Nitrospira	-
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> C 2-3	Nitrospira	-
<i>Leptospirillum rubarum</i>	Nitrospira	-
<i>Leptospirillum</i> sp. Grupo II/III	Nitrospira	-
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSM 10331	Actinobacteria	-
<i>Acidithiomicrobium</i> sp. P2	Actinobacteria	-
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> DSM 446	Bacilli	-
<i>Alicyclobacillus hesperidum</i> URH17-3-68	Bacilli	-
<i>Alicyclobacillus pohliae</i> DSM 22757	Bacilli	-
<i>Sulfobacillus acidophilus</i> DSM 10332	Bacilli	-
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> DSM 9293	Bacilli	-

mostraron que los elementos del operón *pel* se encuentran en la mayoría de las cepas analizadas (Fig. 3). La cepa DSM 9463 sólo presentó amplificación en el gen tipo *wcaG*. Todas las cepas dieron amplificaciones con el par de partidores basados en el rDNA 16S específicos para *At. thiooxidans*, los cuales fueron utilizados como controles de amplificación y de identidad. La presencia del operón en varias cepas sugiere que este set de genes da una cierta ventaja en la formación de biopelículas sobre el azufre.

5.2. Determinación de la composición de los EPS de *At. thiooxidans* ATCC 19377

Entender la composición de los EPS en una biopelícula permite elucidar posibles interacciones de la célula bacteriana con su ambiente. Para cumplir este objetivo, se decidió realizar dos aproximaciones experimentales: una técnica destructiva mediante un análisis químico de los EPS totales y una técnica no destructiva en base al análisis de unión a lectinas conjugadas a moléculas fluorescentes (Zippel y Neu, 2011).

En la primera aproximación, se procedió a extraer los EPS totales de las subpoblaciones celulares planctónicas y adheridas a partir de cultivos en azufre elemental y medir el contenido de carbohidratos, proteínas, ácidos urónicos, lípidos, hierro y DNA extracelular (Tabla 3). El análisis reveló que la producción normalizada de EPS total de la subpoblación adherida era 4 veces mayor que aquella en la subpoblación planctónica (Tabla A3).

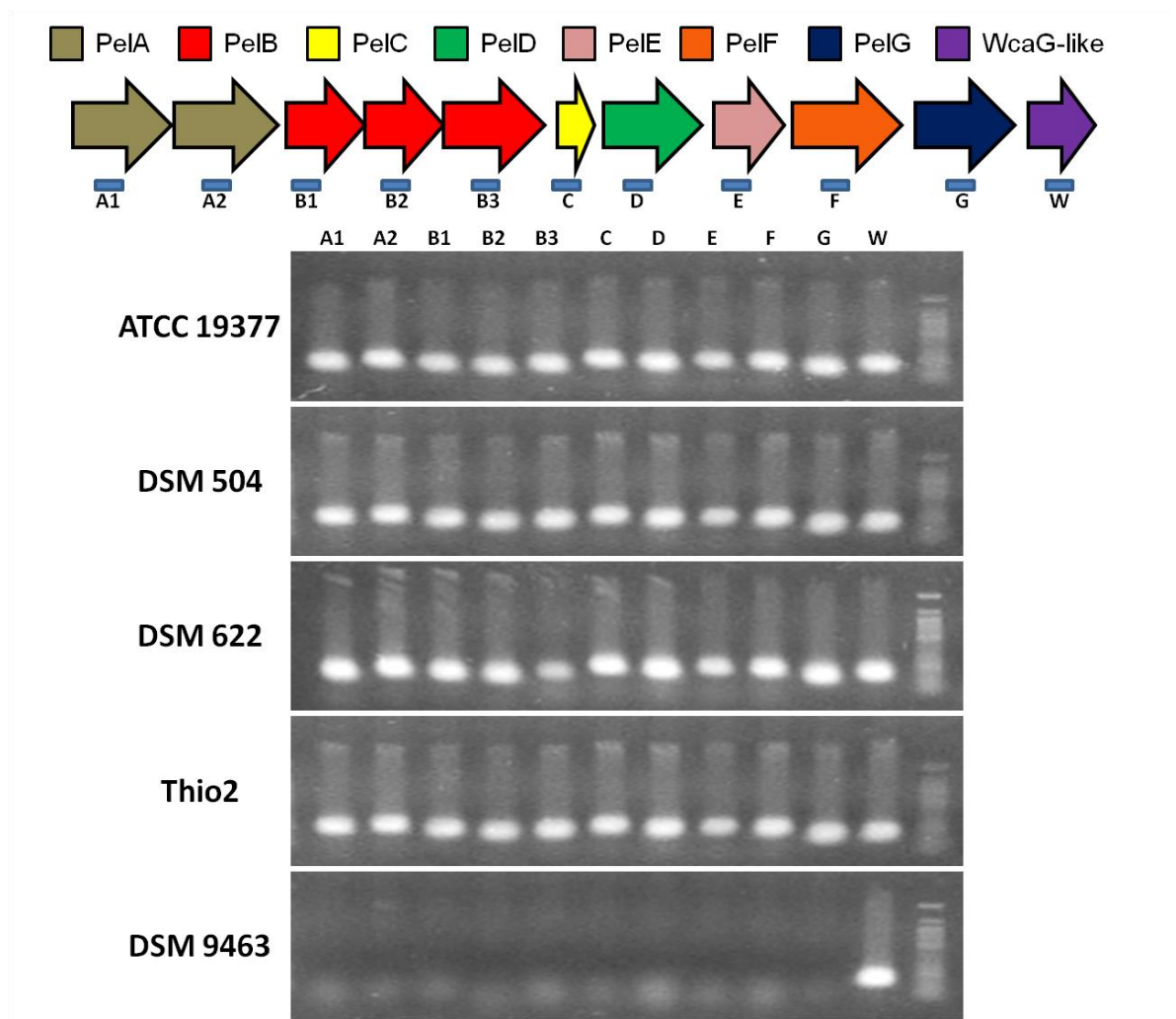


Figura 3. Presencia/ausencia del operón *pel* en diferentes cepas de *At. thiooxidans*. Los distintos DNAs fueron analizados por PCR usando partidores para cada uno de los elementos génicos del operón *pel* de la cepa ATCC 19377.

Tabla 3. Composición de los EPS extraídos desde las sub-poblaciones planctónicas y adheridas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 crecido en azufre elemental.

	Células Planctónicas ($\mu\text{g}/\text{mg EPS}_{\text{total}}$)	Células Adheridas ($\mu\text{g}/\text{mg EPS}_{\text{total}}$)
Carbohidratos	571,67 \pm 66,57	646,52 \pm 30,45
Proteínas	65,68 \pm 7,92	99,43 \pm 10,50
Ácidos Urónicos	168,96 \pm 15,39	109,97 \pm 10,95
Lípidos	144,21 \pm 26,19	141,99 \pm 16,65
Hierro	1,20 \pm 0,12	1,06 \pm 0,15
DNA extracelular	48,28 \pm 4,23	1,03 \pm 0,06

Al comparar las dos subpoblaciones se apreció un aumento en la proporción de carbohidratos y proteínas totales en los EPS de la subpoblación adherida con respecto a la subpoblación planctónica (Tabla 3), con un incremento de 57 a 65 % para los carbohidratos y de un 6,5 a 10% para las proteínas. También se observó que la subpoblación adherida posee una menor proporción de ácidos urónicos y DNA extracelular en el EPS total, mientras que la producción de moléculas de naturaleza lipídica no presentó diferencias significativas entre ambas subpoblaciones (Tabla 3). El aumento en la producción de exopolisacáridos y proteínas totales indica que estos elementos orgánicos están involucrados en los procesos de adherencia y formación de biopelículas estructuradas sobre el azufre, tal como fue descrito para *At. ferrooxidans* (Gehrke y col., 1998).

En el caso de la aproximación no destructiva para analizar los EPS presentes en las biopelículas de *At. thiooxidans*, se utilizaron proteínas de unión a carbohidratos llamadas lectinas, las cuales se encontraban conjugadas a una molécula fluorescente para su detección por EFM. Debido a que las lectinas son específicas en el ligando que unen, ya sea por tipo de azúcar o configuración estructural de éstas, es posible determinar en una primera aproximación que tipo de azúcares de superficie que están presentes en la muestra. Después de probar varias lectinas, se determinó que las células de *At. thiooxidans* crecidas en azufre son capaces de unir las lectinas BPA, GS-II, ConA y AAL (Fig. 4), las cuales son específicas para los azúcares N-acetil-D-Galactosamina, N-

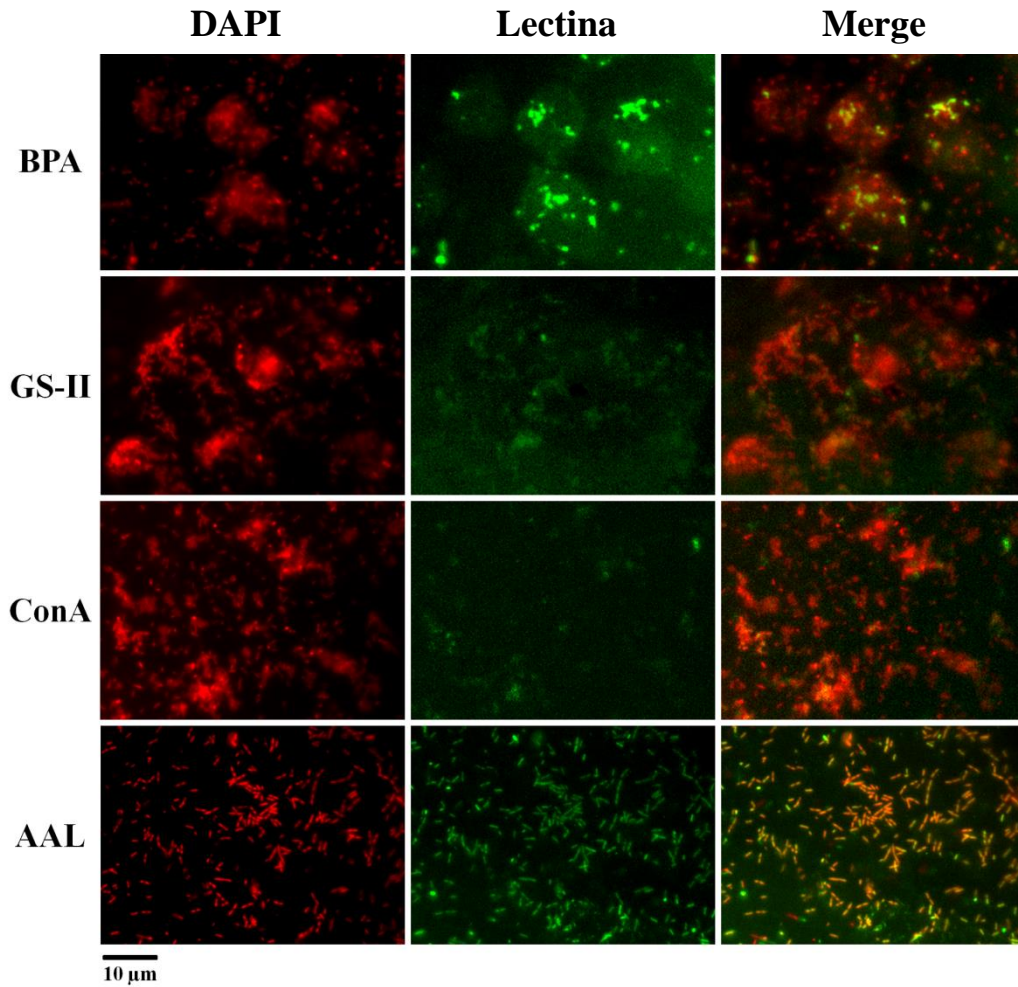


Figura 4. Caracterización de la presencia de azúcares de superficie en *At. thiooxidans* ATCC 19377 mediante ensayo de unión a lectinas. Las muestras fueron incubadas durante 1 h con las diferentes lectinas y posteriormente con DAPI como medio de contraste.

acetil-D-Glucosamina, D-Manosa y L-Fucosa, respectivamente. La presencia de las dos azúcares N-acetiladas se corresponde con la composición monomérica descrita para el exopolisacárido Pel de *P. aeruginosa* (Jennings y col., 2015), lo que podría indicar que Pel de *At. thiooxidans* estaría cumpliendo una función similar a la descrita en la literatura para el Exopolisacárido Pel de *P. aeruginosa*, relacionado principalmente con los fenotipos de agregación celular y de estructuración de la biopelícula (Friedman y Kolter, 2004; Mann y Wozniak, 2012).

5.3. Análisis compartivos (células adheridas/células planctónicas) de los niveles de mRNA de los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG*.

Las células de *At. thiooxidans* fueron incubadas en azufre elemental con agitación por 5 días para realizar un análisis de RNA total. Los genes seleccionados para el análisis por qRT-PCR fueron *pelA*, *pelD* y *wcaG*, los cuales codifican para la proteína de membrana con actividad desacetilasa PelA, la proteína de membrana interna de unión a c-di-GMP PelD y la enzima citoplasmática UDP-glucosa-4-epimerasa WcaG, respectivamente.

Previo al análisis individual de cada uno de los genes seleccionados, se decidió realizar un PCR para dilucidar si los genes del “cluster” génico *pel* se transcribían como un operón. El cDNA obtenido se sometió a un PCR convencional utilizando partidores que hibridan con los extremos de cada gen y amplifican las regiones intergénicas. Como

control positivo de amplificación a partir del cDNA se utilizaron partidores que hibridan en el rDNA 16S, mientras que se utilizó gDNA como control positivo de las regiones intergénicas. Al analizar las reacciones de PCR por electroforesis en gel de agarosa, se observó que sólo las regiones intergénicas del operón presentaron amplificación a partir de las muestras de cDNA, indicando que este cluster génico se expresa como un operón (Fig. 5).

Los genes analizados *pelA*, *pelD* y *wcaG* presentaron un aumento en sus niveles de expresión transcripcional en las células adheridas con respecto a sus contrapartes planctónicas de alrededor de 4,5, 6,7 y 2,2 veces, respectivamente (Tabla 4). Aunque estos genes están formando parte de un putativo operón, los niveles de transcripción aumentaron en forma independiente entre sí, siendo el gen *pelD* el que presentó una mayor aumento en la expresión transcripcional en células adheridas con respecto a las planctónicas, lo que sugeriría la existencia de mecanismo de control independientes adicionales para cada uno de los genes.

Estos datos de qPCR se correlacionan con los resultados obtenidos mediante el ensayo de unión de lectinas, lo que sugiere fuertemente que *At. thiooxidans* ATCC 19377 codifica y expresa un complejo de síntesis de exopolisacárido Pel que es funcional e indica que Pel de *At. thiooxidans* estaría participando en alguna etapa de la formación de biopelículas sobre la superficie de azufre sólido.

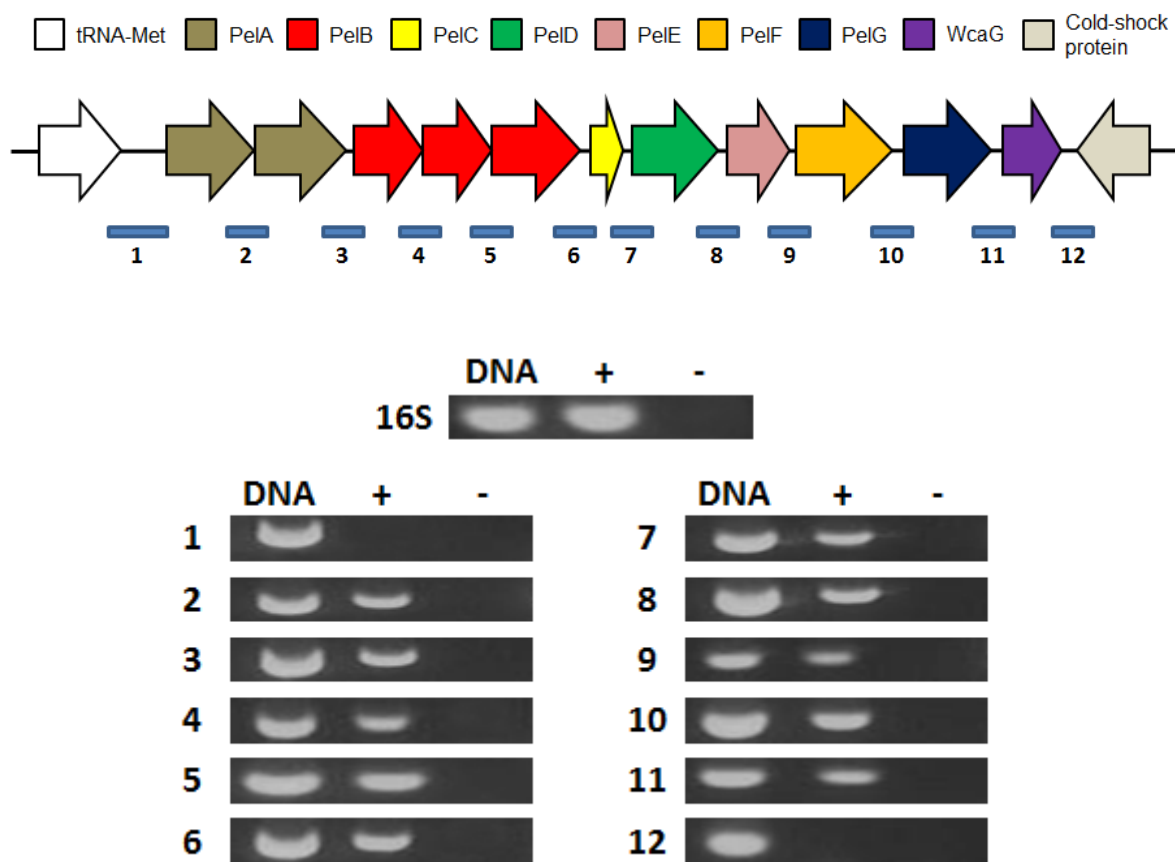


Figura 5. Comprobación de la estructura y expresión operónica del conjunto de genes *pel* de *At. thiooxidans* ATCC 19377. Las muestras de gDNA (DNA), cDNA (+) o RNA sin tratar (-) fueron ensayadas con partidores que hibridan en las zonas entre los ORFs. Como control positivo se utilizó el gen codificante para el rDNA16S. Todos los fragmentos amplificados poseen alrededor de 200 pb, con excepción del fragmento 1 que es de aproximadamente 500 pb.

Tabla 4. Número normalizado de transcritos de los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* de las subpoblaciones planctónicas y adheridas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 crecido en azufre elemental.

Gen	Células Planctónicas	Células Adheridas	Razón A/P
<i>pelA</i>	$(9,44 \pm 2,50) \times 10^3$	$(4,28 \pm 0,43) \times 10^4$	$4,53 \pm 1,65$
<i>pelD</i>	$(8,73 \pm 2,30) \times 10^3$	$(5,84 \pm 0,84) \times 10^4$	$6,69 \pm 2,72$
<i>wcaG</i>	$(5,72 \pm 1,00) \times 10^3$	$(1,26 \pm 0,15) \times 10^4$	$2,20 \pm 0,65$

5.4. La presencia de las moléculas de QS tipo-AHL aumenta la adherencia de las células de *At. thiooxidans* sobre azufre y los niveles de RNA de *pel*.

En diversas especies bacterianas, el QS es uno de los mecanismos moleculares que regula el fenotipo de formación de biopelículas. Al igual que en varias bacterias Gram-negativa, un sistema de QS mediado por moléculas tipo AHL fue identificado en *At. ferrooxidans* ATCC 23270 (Farah y col., 2005). Adicionalmente, se ha descrito que las distintas AHLs producidas por *At. ferrooxidans* alteran la adherencia, la producción de EPS y la tasa de oxidación de pirita de sí misma (González y col., 2013; Bellenberg y col., 2014; Mamani y col., 2016) y de otras especies bacterianas oxidadoras de hierro que pertenecen a la comunidad acidófila lixivante (Bellenberg y col., 2014). Sin embargo, se desconoce los efectos que poseen estas AHLs en las bacterias oxidadoras de azufre presentes en la comunidad.

Para intentar responder esta interrogante, se analizó el efecto de la adición exógena de AHLs en el medio de crecimiento con azufre elemental sobre los fenotipos de adherencia y formación de biopelículas de *At. thiooxidans* ATCC 19377. Las células fueron incubadas en presencia de distintas AHLs para evaluar el proceso de formación de biopelículas. Aunque *At. thiooxidans* no posee los genes canónicos para las proteínas involucradas en la síntesis y la transducción de señales para AHLs (Valdes y col., 2008), la presencia de señales tipo C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL y C10-AHL fueron caracterizadas inicialmente en los sobrenadantes de cultivos de *At. thiooxidans* en azufre elemental

mediante el uso de la cepa reportera para AHLs *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZL4) (Ruiz y col., 2008). Por lo tanto, se decidió analizar el efecto de estas AHLs en forma independiente en ensayos de análisis de formación de biopelículas. La adición exógena de cada una de estas moléculas al medio de cultivo provocó un aumento en la adherencia de las células al sustrato sólido con respecto al control. Adicionalmente, cada una de las AHLs añadidas produjo una variación propia en la estructura de la biopelícula: la molécula 3-oxo-C8-AHL produjo un aumento en la formación de microcolonias, mientras que C8-AHL y C10-AHL sólo provocaron un fenotipo con mayor adherencia a la superficie (Fig. 6).

Una vez detectado el cambio fenotípico en la adherencia y la estructura de la biopelícula sobre azufre elemental, se procedió a analizar si estos cambios expresados por las células de *At. thiooxidans* tenían alguna correlación con la expresión de los genes *pel*. Para realizar esto, las células de *At. thiooxidans* fueron incubadas en azufre elemental por 5 días en presencia de 5 μ M de 3-oxo-C8-AHL, ya que produjo el cambio fenotípico más notorio, para realizar un análisis de RNA total por qPCR. Al analizar los niveles de mRNA, los genes *pelA* y *pelD* en células planctónicas aumentaron el número de copias unas 2,84 y 2,16 veces, respectivamente, mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de *pelA* y *pelD* en las células adheridas. Los análisis de los niveles de expresión de *wcaG* no revelaron la presencia de cambios en los niveles RNA (Tabla 5). Estos resultados abalan la hipótesis de posibles

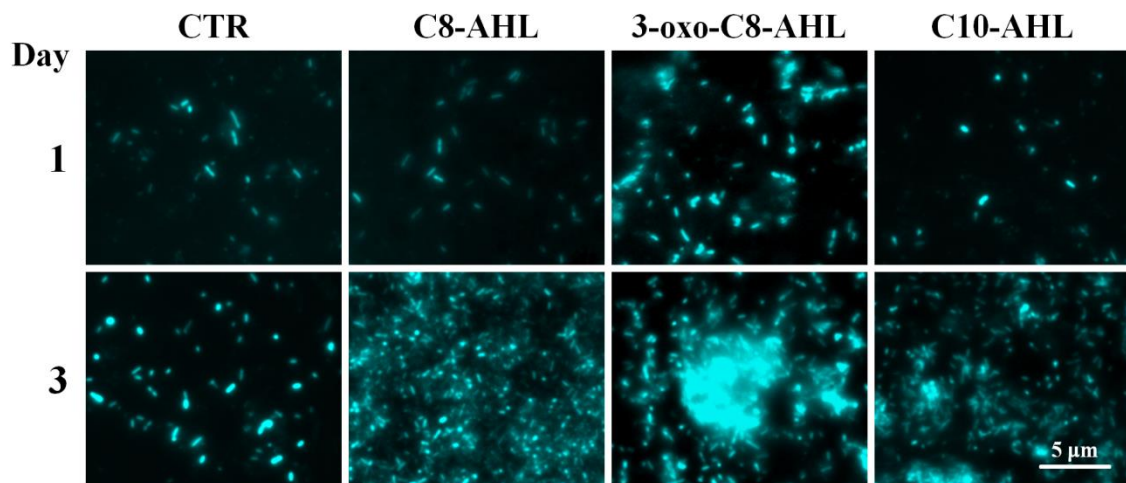


Figura 6. Análisis del efecto de la presencia de ciertas AHLs en la adherencia de *At. thiooxidans* ATCC 19377 a cupones de azufre elemental. Los cultivos fueron incubados con agitación suave a 30 °C. La barra representa 5 μm para todas las imágenes.

Tabla 5. Comparación de la cantidad de transcritos de los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* de las sub-poblaciones planctónicas (P) y adheridas (A) de *At. thiooxidans* ATCC 19377 crecido en azufre elemental en presencia (+) o ausencia (-) de 5 μ M de 3-oxo-C8-AHL.

Gen	Control	3-oxo-C8-AHL	Razón +/-
<i>pelA</i>			
P	$(9,44 \pm 2,50) \times 10^3$	$(2,68 \pm 0,46) \times 10^4$	$2,84 \pm 0,62$
A	$(4,28 \pm 0,43) \times 10^4$	$(4,75 \pm 0,67) \times 10^4$	$1,11 \pm 0,27$
<i>pelD</i>			
P	$(8,73 \pm 2,30) \times 10^3$	$(1,89 \pm 0,56) \times 10^4$	$2,16 \pm 0,61$
A	$(5,84 \pm 0,84) \times 10^4$	$(6,09 \pm 0,70) \times 10^4$	$1,04 \pm 0,27$
<i>wcaG</i>			
P	$(5,72 \pm 1,00) \times 10^3$	$(8,30 \pm 2,00) \times 10^3$	$1,45 \pm 0,60$
A	$(1,26 \pm 0,15) \times 10^4$	$(1,39 \pm 0,28) \times 10^4$	$1,10 \pm 0,35$

regulaciones individuales para cada uno de los genes, además de la regulación de la expresión transcripcional a través de su promotor.

5.5. Desarrollo de una de cepa mutante nula $\Delta pelD$ en *At. thiooxidans* ATCC 19377 mediante recombinación homóloga.

Está descrito en *P. aeruginosa* que la mutación nula de *pelD* bloquea la síntesis de Pel e impide la agregación celular (Lee y col., 2007). En base a estos antecedentes, se procedió a la creación de una cepa mutante nula $\Delta pelD$ en *At. thiooxidans* y analizar su adherencia a la superficie de azufre elemental, así como la formación de biopelículas.

Antes de realizar las mutaciones, se analizó la secuencia aminoacídica para determinar si la proteína PelD de *At. thiooxidans* era funcional. Al comparar las secuencias aminoacídicas de PelD entre diferentes bacterias mostró que el ortólogo de *At. thiooxidans* ATCC 19377 tiene los aminoácidos clave para ser funcional (Fig. 7).

El proceso de desarrollo de una cepa mutante que sea viable en *At. thiooxidans* resultó un proceso muy complicado, ya es difícil aplicar un protocolo reproducible que permita insertar un DNA foráneo a través de sus membranas en forma eficiente. Otro gran problema es la selección de marcadores que seleccionen a los mutantes doble recombinantes requeridos. Una metodología para favorecer a las células que presentaron un segundo evento de recombinación es a través de selección negativa, la cual se basa

en que el vector suicida posee adicionalmente un gen que codifica una proteína que genera un compuesto tóxico para la célula a partir de un precursor añadido al medio de cultivo (Reyrat y col., 1998). Al realizarse un segundo evento de recombinación, este segundo gen se pierde y la célula es incapaz de metabolizar el compuesto precursor. Lamentablemente, los pocos estudios acerca del metabolismo central de *At. thiooxidans* y la falta de precursores que sean resistentes al pH ácido de los medios de cultivo y que puedan cruzar la membrana citoplasmática dificultan la aplicación de esta técnica, por lo que es necesario analizar un gran número de clones para identificar el segundo evento de recombinación. En base a los resultados obtenidos en el análisis de cepas se puede deducir que el porcentaje de éxito en el desarrollo de esta cepa mutante nula $\Delta pelD$ es menor al 0,5 %.

Uno de los puntos críticos en la construcción de esta cepa mutante es verificar si la mutación fue específica, por lo que fue necesario analizar cada clon transformante para diferenciar si existió un evento de recombinación alélica o sólo una integración del plasmidio en el genoma. Para confirmar el reemplazo alélico, se realizó un primer corte a través de un PCR de macrocolonia, para luego corroborar estos resultados con PCR convencional sobre DNA purificado y análisis mediante Southern Blot. Después de haber analizado unos 200 clones diferentes por la metodología PCR de colonia, se encontraron 4 clones que no presentaban amplificación para el gen *pelD*. Estos cuatro transformantes fueron analizados por PCR sobre DNA purificado para corroborar la estos resultados. Adicionalmente, el análisis por PCR reveló que no hubo deleciones de

otros genes del operón *pel* (Fig. 8). Paralelamente, se realizó un análisis de las cepas por Southern Blot utilizando sondas específicas para *kan^R* (Fig. 9A) y *pelD* (Fig. 9B). Los resultados revelaron que estos clones seleccionados inicialmente por el PCR de colonia perdieron el gen *pelD* e incorporaron el gen *kan^R* en su genoma (Fig. 9), por lo que se consideran doble recombinantes.

5.6. Caracterización fenotípica del mutante $\Delta pelD$

5.6.1. Formación de biopelículas y producción de EPS sobre azufre elemental

Se realizaron ensayos comparativos de adherencia y formación de biopelículas sobre cupones de azufre elemental. Las células tanto de la cepa silvestre como de la cepa $\Delta pelD$ fueron incubadas sobre cupones de azufre elemental a diferentes tiempos y tratadas para ser observadas por SEM. Previamente, se procedió a ver si la ausencia de *pelD* afectaba la viabilidad celular en azufre elemental. Aunque la curva de crecimiento en medio de cultivo con azufre no presentaron cambios entre las diferentes cepas (Fig. 10), el análisis por microscopía electrónica de barrido mostró que la estructura de la biopelícula desarrollada por la cepa silvestre (Fig. 11A) es diferente a aquella desarrollada por la cepa mutante $\Delta pelD$ (Fig. 11B), ya que en esta última se presenció una mayor cantidad de redes de estructuras filamentosas, similares a las fibras presentes en biopelículas de *E. coli* (Fig. 11C).

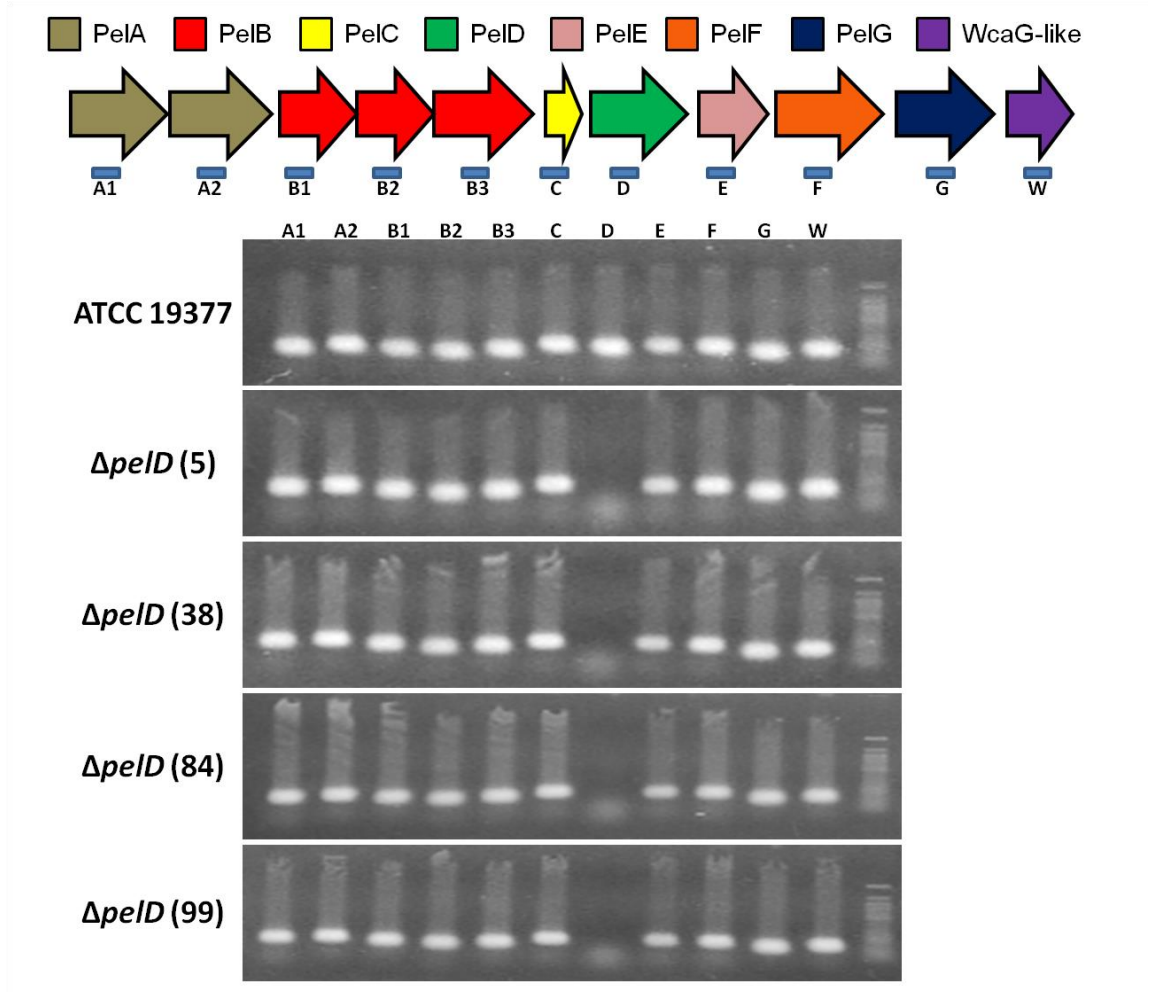


Figura 8. Comprobación de la mutación específica de *pelD* mediante PCR. Los distintos gDNAs fueron analizados usando los partidores para cada uno de los elementos génicos del operón *pel* de la cepa parental ATCC 19377.

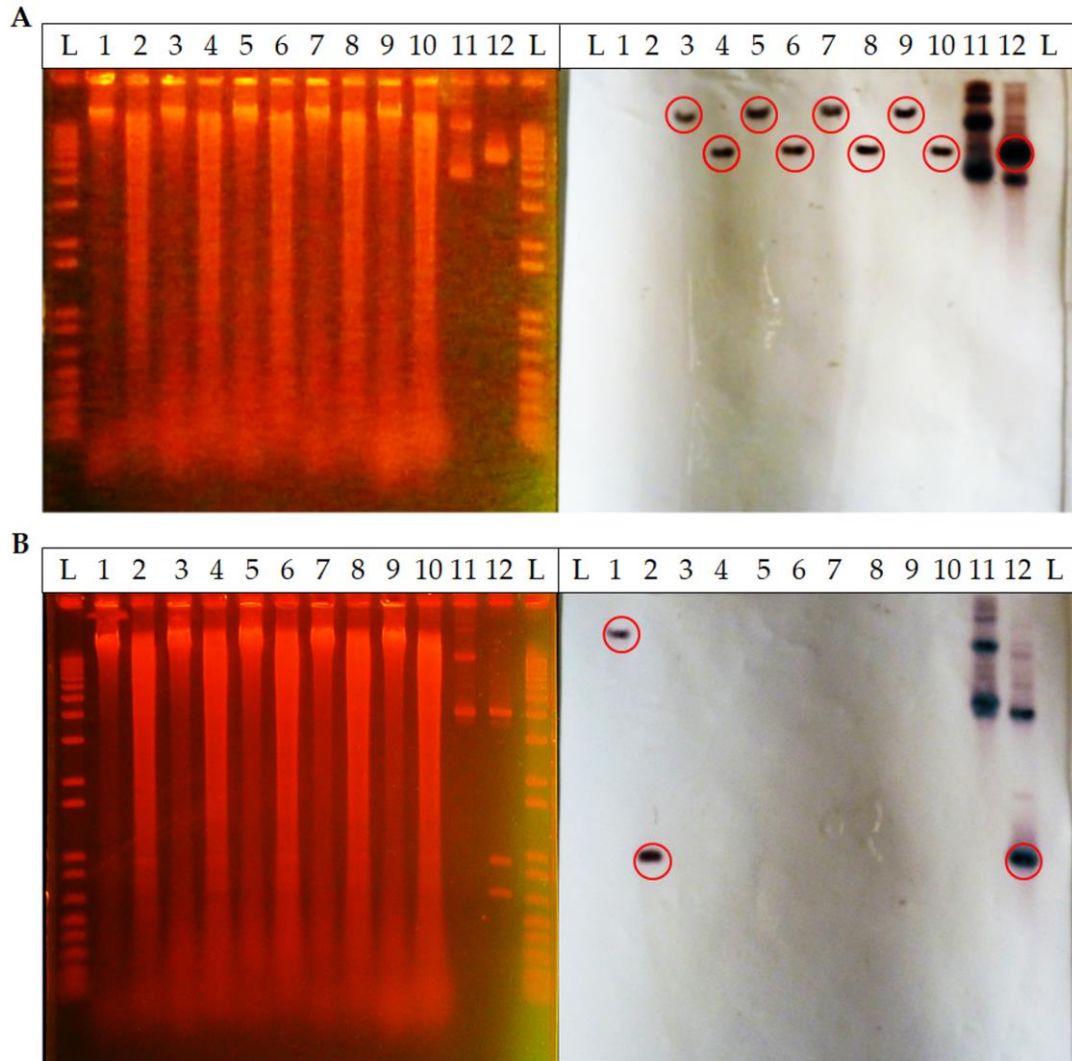


Figura 9. Comprobación de la delección del gen *pelD* en *At. thiooxidans* mediante Southern Blot. 10 μ g de gDNA no digerido (números impares) o digeridos por *Bam*HI (A) o *Sph*I (B) (números pares) se separaron por electroforesis fueron teñidos con GelRed® (paneles izquierdos). Los fragmentos de ADN se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para experimentos de hibridación con dos sondas de ADN marcadas con digoxigenina específicas *kan*^R (A) y *pelD* (B). Los resultados positivos para las sondas *kan*^R y *pelD* corresponden a los fragmentos de restricción de 6 kb y 900 pb, respectivamente (círculos rojos). L: marcador de peso molecular; 1-2: DNA de cepa ATCC 19377; 3-4: Δ *pelD*_c05 5-6: Δ *pelD*_c38; 7-8: Δ *pelD*_c84; 9-10: Δ *pelD*_c99; 11-12: control positivo, plásmidos pOT que albergan genes *kan*^R (A) o *pelD* (B).

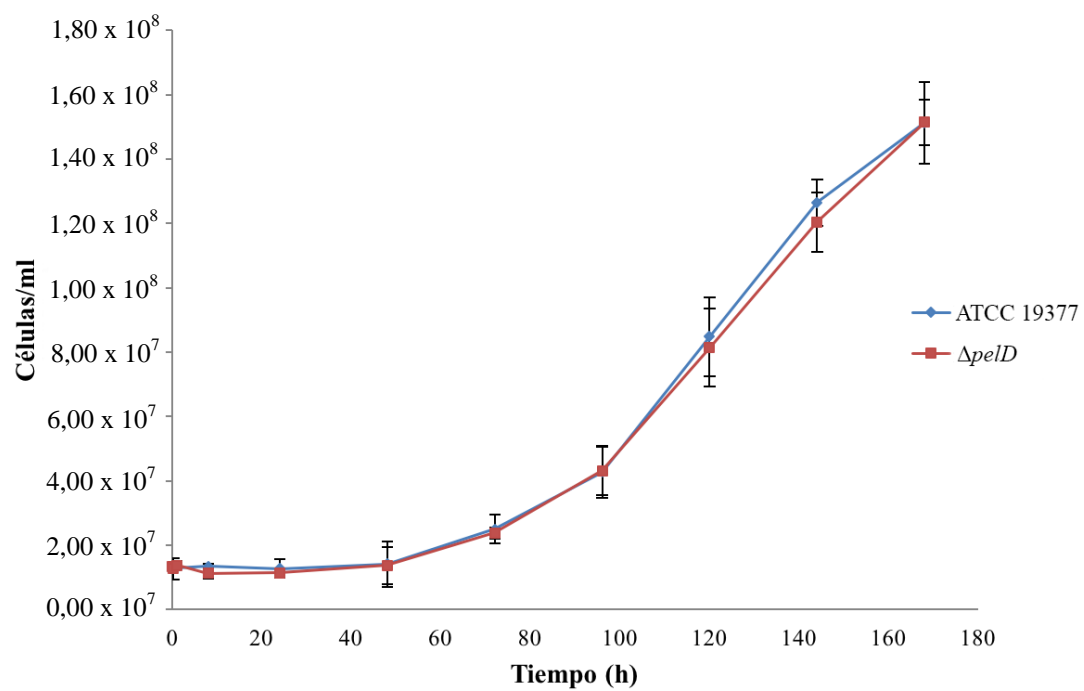


Figura 10. Curvas de crecimiento en azufre elemental de las cepas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 parental y mutante derivada $\Delta pelD$.

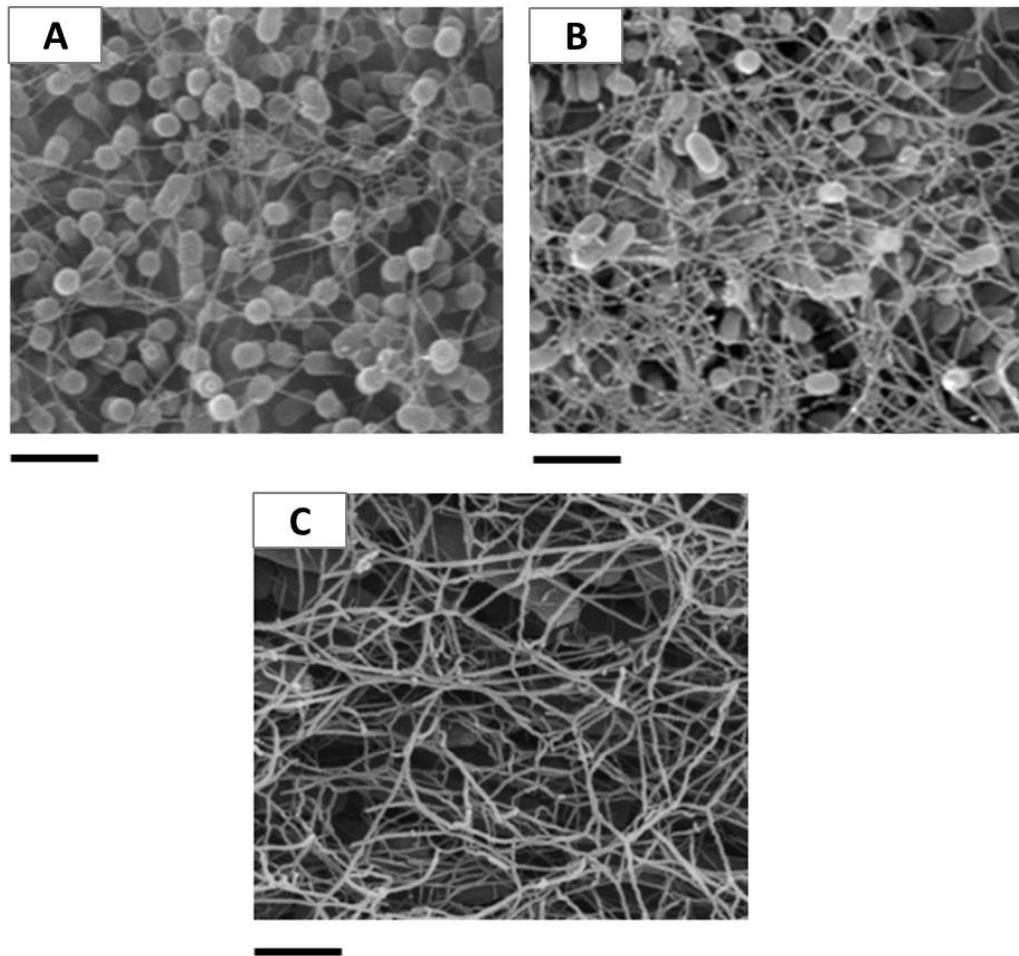


Figura 11. Análisis mediante microscopía electrónica de barrido de la estructura de las biopelículas sobre azufre elemental de *At. thiooxidans* $\Delta pelD$. Comparada con la cepa parental ATCC 19377 (A), la cepa mutante $\Delta pelD$ derivada (B) produce una mayor cantidad de estructuras filamentosas en su matriz, en una organización similar a las fibras de las biopelículas de *E. coli* (C). Ambas cepas de *At. thiooxidans* fueron incubadas sobre cupones de azufre elemental con suave agitación durante 120 h. Las barras inferiores representan 2 μ m. La imagen C proviene de Serra y col. (2013a).

Al comparar entre clones, se presenci6 que 6stos presentaban diferentes grados de complejidad en la red. Se desconoce cuales serían las causales de esta diferencia fenotípica, ya que los clones no presentaron diferencias segun los análisis de PCR (Fig. 8, pág. 81) y Southern Blot (Fig. 9, pág. 82).

En una aproximación más cuantitativa, se procedió a extraer los EPS en células planctónicas y adheridas de la cepa mutante $\Delta pelD$ de *At. thiooxidans* con el objetivo de medir los niveles de azúcares y proteínas presentes y a realizar un análisis comparativo entre la esta cepa y la cepa parental ATCC 19377. Aunque la producción de EPS totales fue mayor en ambas muestras de células adheridas con respecto a las planctónicas, se observó que la razón carbohidratos/proteínas de la cepa mutante $\Delta pelD$ se encuentra alterada, con una disminución en el contenido de carbohidratos presentes en los EPS de unas 3 veces con respecto a la cepa parental y un incremento en el contenido de proteínas de alrededor de 3 veces (Tabla 6). Adicionalmente, el análisis de azúcares de superficie, utilizando las lectinas que dieron resultados positivos en las biopelículas de la cepa parental ATCC 19377, mostr6 que la cepa mutante $\Delta pelD$ pierde la capacidad de unir las lectinas BPA y GS-II, indicando una carencia de N-acetil-galactosamina y de N-acetil-glucosamina en la superficie de la biopelícula (Fig. 12), lo cual lleva a la idea de que estas 2 azúcares son los posibles mon6meros de este exopolisacárido. Por otro lado, no se observaron cambios en la unió de las lectinas ConA y AAL a la superficie de las biopelículas de la cepa mutante $\Delta pelD$ (dato no mostrado), lo cual indica que no hay alteraciones en otras vías de síntesis de exopolisacáridos.

Tabla 6. Comparación en la cantidad de azúcares y proteínas presentes en los EPS de las cepas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 y $\Delta pelD$.

	ATCC 19377	$\Delta pelD$
<u>Carbohidratos</u> ($\mu\text{g}/\text{mg EPS}_{\text{total}}$)		
células planctónicas	571,67 \pm 66,57	145,35 \pm 15,93
células adheridas	646,52 \pm 30,45	276,57 \pm 35,78
<u>Proteínas</u> ($\mu\text{g}/\text{mg EPS}_{\text{total}}$)		
células planctónicas	65,68 \pm 7,92	215,30 \pm 19,87
células adheridas	99,43 \pm 10,50	335,85 \pm 22,31

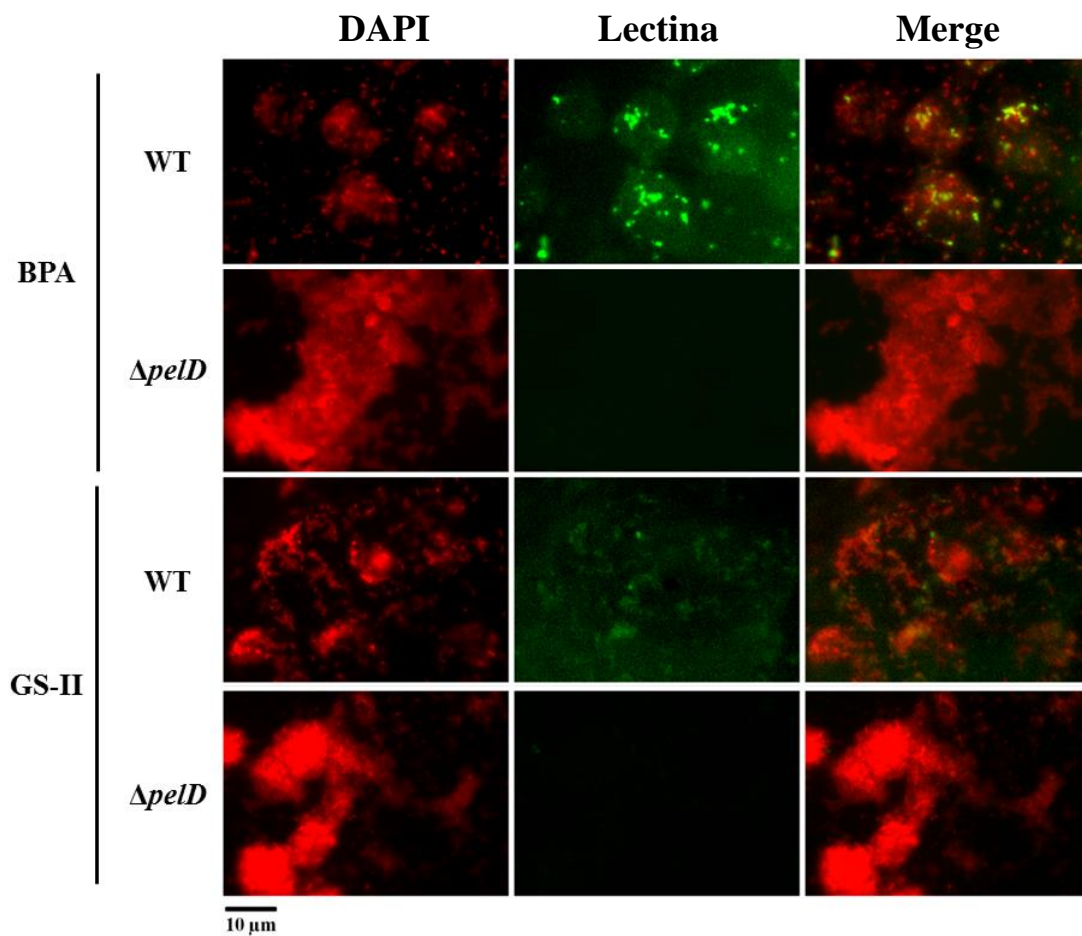


Figura 12. Análisis de los azúcares de superficie mediante el uso de lectinas y microscopía de fluorescencia. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora con las diferentes lectinas y posteriormente con DAPI como medio de contraste. La mutación $\Delta pelD$ genera un cambio en la composición de los azúcares de superficie, desapareciendo azúcares reconocidos por la lectina BPA.

5.6.2 Interrelación molecular entre QS y el operon *pel* de *At. thiooxidans*

En primer lugar se realizó un estudio transcriptómico midiendo los niveles de RNA de los genes *pelA* y *wcaG* del operón *pel* mediante qPCR. Se reveló que en la cepa mutante, los niveles de mRNA son mayores para *pelA* y *wcaG* en células adheridas con respecto a las células planctónicas (Tabla 7). Sin embargo, el nivel de expresión de ambos genes es menor en alrededor de un orden de magnitud en la cepa mutante comparado en la cepa parental ATCC 19377 (Tabla 8). La adición de la molécula de QS 3-oxo-C8-AHL al sobrenadante de los cultivos de la cepa mutante no afectó los niveles de expresión de *wcaG* en las subpoblaciones planctónicas y adheridas (Tabla 9), pero provocó un incremento de unas 4 veces en los niveles de transcrito de *pelA* en las células planctónicas de la cepa $\Delta pelD$ (Tabla 9). Sin embargo, a pesar del incremento en los niveles de mRNA gatillados por la señal de QS, las células de la cepa mutante $\Delta pelD$ fueron incapaces de responder fenotípicamente a la presencia de 3-oxo-C8-AHL a diferencia de la cepa parental (Fig. 13).

Este conjunto de resultados reafirma el rol esencial de la proteína PelD para la síntesis del exopolisaccárido Pel y revela por primera vez en *At. thiooxidans* una interrelación molecular entre el QS, el Exopolisaccárido Pel y la formación de Biopelículas.

Tabla 7. Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *pelA* y *wcaG* de las sub-poblaciones celulares planctónicas y adheridas de *At. thiooxidans* $\Delta pelD$ crecido en azufre elemental.

Gen	Células Planctónicas	Células Adheridas	Razón A/P
<i>pelA</i>	$(4,96 \pm 1,50) \times 10^2$	$(4,37 \pm 0,46) \times 10^3$	$8,81 \pm 3,59$
<i>wcaG</i>	$(1,48 \pm 0,20) \times 10^3$	$(4,22 \pm 0,58) \times 10^3$	$2,85 \pm 0,78$

Tabla 8. Comparación de los niveles de expresión de *pelA* y *wcaG* entre las cepas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 silvestre (WT) y $\Delta pelD$ en células planctónicas (P) y adheridas (A).

Gen	WT	$\Delta pelD$	Razón wt/ $\Delta pelD$	
<i>pelA</i>	P	$(9,44 \pm 2,50) \times 10^3$	$(4,96 \pm 1,50) \times 10^2$	$19,03 \pm 7,32$
	A	$(4,28 \pm 0,43) \times 10^4$	$(4,37 \pm 0,46) \times 10^3$	$9,79 \pm 0,27$
<i>wcaG</i>	P	$(5,72 \pm 1,00) \times 10^3$	$(1,48 \pm 0,20) \times 10^3$	$3,86 \pm 1,20$
	A	$(1,26 \pm 0,15) \times 10^4$	$(4,22 \pm 0,35) \times 10^3$	$2,99 \pm 0,60$

Tabla 9. Efecto de la presencia de 3-oxo-C8-AHL en los niveles de expresión de *pelA* y *wcaG* en células planctónicas (P) y adheridas (A) de células de *At. thiooxidans* $\Delta pelD$ crecidas en azufre elemental.

Gen	Control	3-oxo-C8-AHL	Razón +/-	
<i>pelA</i>	P	$(4,96 \pm 1,50) \times 10^2$	$(2,03 \pm 0,50) \times 10^3$	$4,09 \pm 1,12$
	A	$(4,37 \pm 0,46) \times 10^3$	$(4,77 \pm 0,70) \times 10^3$	$1,17 \pm 0,29$
<i>wcaG</i>	P	$(1,48 \pm 0,20) \times 10^3$	$(1,87 \pm 0,30) \times 10^3$	$1,26 \pm 0,37$
	A	$(4,22 \pm 0,35) \times 10^3$	$(4,76 \pm 0,58) \times 10^3$	$1,13 \pm 0,23$

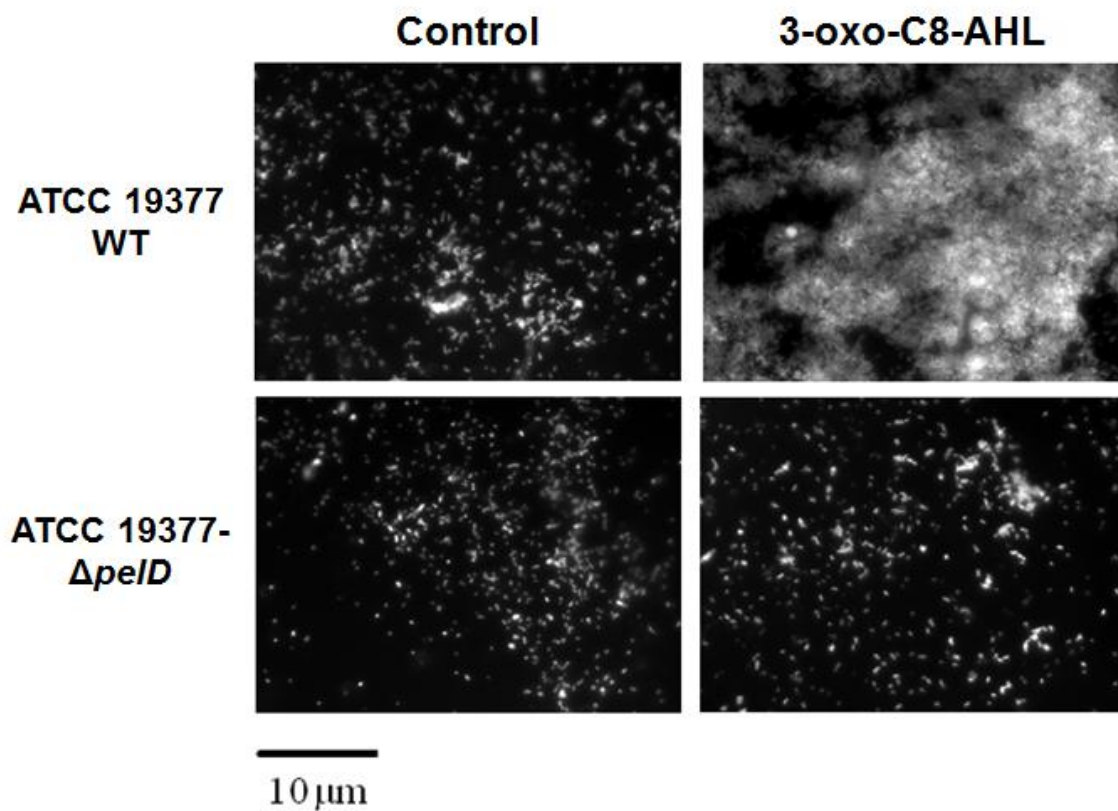


Figura 13. Efecto de la mutación $\Delta pelD$ en la adherencia a azufre mediada por la molécula de QS 3-oxo-C8-AHL en *At. thiooxidans* ATCC 19377. Las cepas fueron incubadas en medio líquido con cupones de azufre con agitación suave a 30 °C. La imágenes mostradas muestran una incubación de 3 días. La barra representa 10 μm para todas las imágenes.

5.6.3. Análisis comparativo de la propiedad mecánica de la biopelícula desarrollada por las cepas silvestre y mutante de *At. thiooxidans*

Para evaluar la resistencia mecánica de las biopelículas de *At. thiooxidans* sobre cupones de azufre, se procedió a someter a éstas a un estrés mecánico mediante agitación con vortex en presencia de una baja concentración del detergente suave Triton X-100, y la posterior cuantificación de la liberación de las células a la fase líquida, con el objetivo de ver en forma indirecta cual es la influencia de Pel en la fortaleza estructural de la biopelícula. Aunque se obtuvo un gran número de células mediante este método, no es posible determinar el porcentaje de liberación de células con respecto al total, ya que la agitación en el vórtex destruye completamente los cupones de azufre.

Las muestras tomadas a distintos tiempos revelaron que los cupones obtenidos de los cultivos con la cepa mutante $\Delta pelD$ liberaron en promedio un 30 % más de células que las biopelículas tratadas de la cepa parental ATCC 19377 durante el período de tiempo de 10 min (Fig. 14). Las diferencias fueron más notorias hacia el final de la incubación. Este resultado obtenido estaría sugiriendo que Pel tiene un rol, aunque no fundamental, en la resistencia mecánica y fortaleza estructural de la biopelícula.

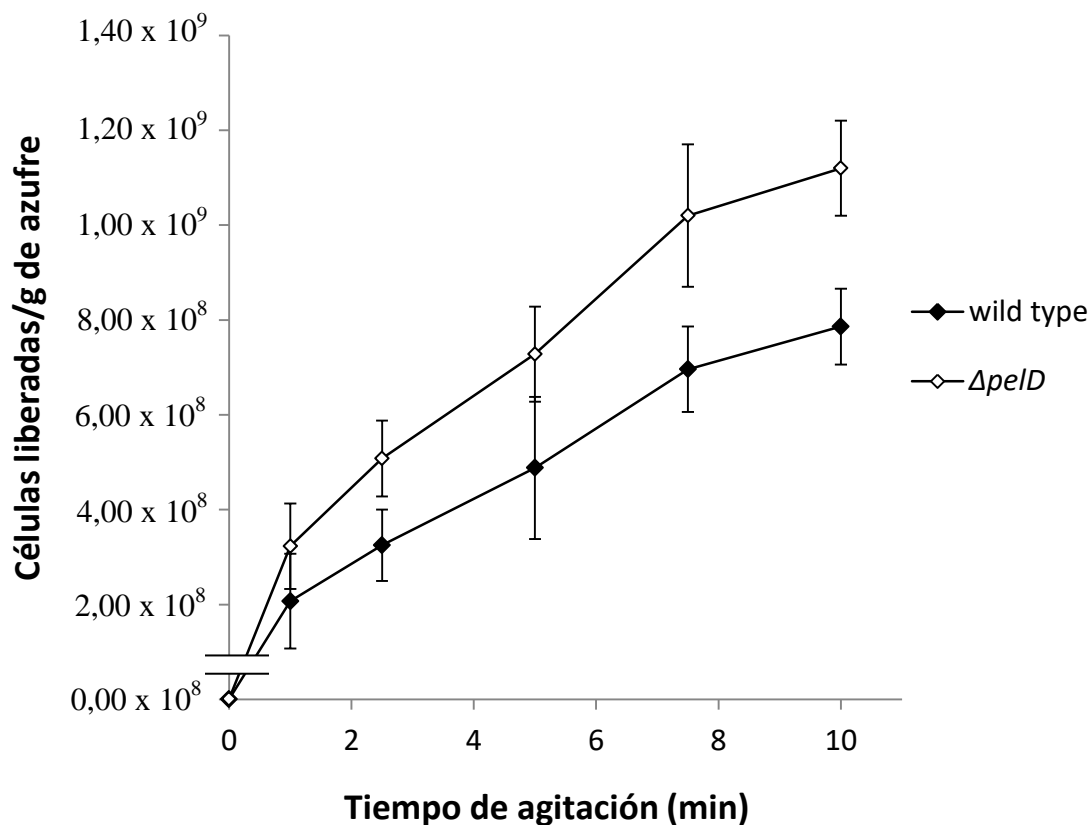


Figura 14. Efecto de la eliminación de *pelD* en la resistencia mecánica de las biopelículas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 sobre cupones de azufre. Los cupones fueron agitados en un vortex con 0,05 % V/V Triton X-100 durante un período total de 10 min. El número de células liberadas fue determinado por conteo celular en una cámara de conteo Petroff-Hausser y normalizado por el peso del azufre sólido.

5.7. Estudios proteómicos comparativos entre los secretomas de las cepas ATCC 19377 silvestre y $\Delta pelD$ de *At. thiooxidans*.

Al observar la gran cantidad de estructuras filamentosas en las biopelículas de la cepa mutante $\Delta pelD$, surge la pregunta de su posible composición. Se ha descrito que las estructuras filamentosas presentes en biopelículas de *Escherichia coli* son fibras amiloides y flagelos (Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b). Debido a la similitud estructural se podría inferir que las fibras presentes en las biopelículas de *At. thiooxidans* también son de naturaleza proteica. Para probar esta hipótesis se procedió a purificar las proteínas a partir del sobrenadante de cultivos y de los EPS de las células adheridas en azufre elemental de las cepas silvestre ATCC 19377 y mutante $\Delta pelD$ de *At. thiooxidans*. Antes de cada inoculación, se procedió a realizar un análisis mediante PCR de una fracción del cultivo para descartar contaminación cruzada (Fig. A4).

5.7.1. Análisis proteómico del EPS mediante electroforesis unidimensional (1D)

Mediante electroforesis 1D bajo condiciones denaturantes fue posible identificar a la altura de aproximadamente 15-17 kDa una banda sobreproducida en la cepa $\Delta pelD$ respecto a la cepa control (Fig. 15). Dada la gran diferencia entre ambas cepas, se procedió a cortar la banda sobreproducida a partir de estos geles para poder secuenciar e identificar cualquier proteína que estuviera presente en esa región. El análisis peptídico

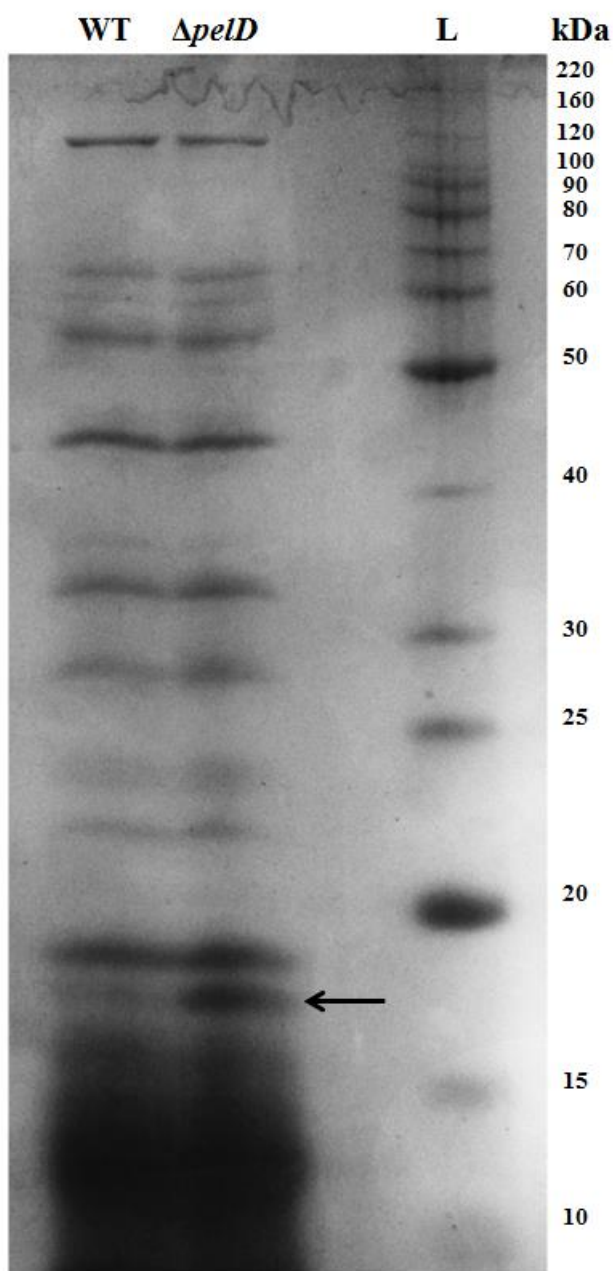
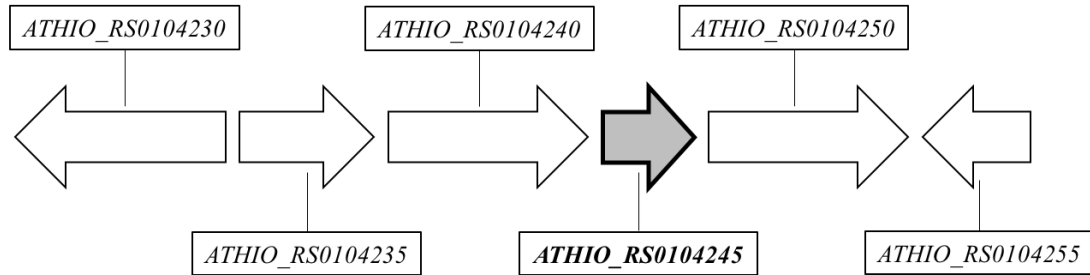


Figura 15. Análisis comparativo de los patrones de proteínas extracelulares obtenidas de biopelículas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 silvestre (WT) y mutante $\Delta pelD$. Las proteínas obtenidas fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 12,5% p/V bajo condiciones denaturantes. La flecha indica la banda sobreexpresada. Se cargaron alrededor de 80 μ g de proteínas totales por cada carril.

en triplicado mediante LC-MS-MS permitió identificar una proteínas que era unas 100 veces más abundantes que cualquier otra proteína identificada. Los péptidos únicos de esta proteína (Tabla A3) permitieron identificar al producto del gen *ATHIO_RS0104245* dentro el genoma de *At. thiooxidans* presente en la base de datos. Éste codifica para una proteína hipotética o con función desconocida de unos 180 aminoácidos, la cual posee un péptido señal en el N-terminal que es cortado entre los residuos 23 y 24. El punto isoelectrónico calculado para el péptido maduro es de 8,8. Al analizar el contexto genómico de este locus para dilucidar alguna posible función, se reveló que se encuentra río abajo de un gen codificante para una proteína con actividad DGC/PDE y río arriba de un gen codificante para una 3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa (Fig. 16). Al revisar la presencia del gen *ATHIO_RS0104245* en los genomas de otras cepas de *At. thiooxidans* presentes en las bases de datos, se encontraron varios ortólogos, como por ejemplo en las cepas DXS-W (*A6M23_04215*), BY-02 (*A6O24_03915*) DMC (*A6O26_10105*) y A02 (*A6P07_08385*). Al comparar el contexto genómico de estos ortólogos se observó que presentan la misma configuración que la descrita para la cepa ATCC 19377.

El análisis bioinformático de la proteína DGC/PDE codificada por *ATHIO_RS0104240* reveló que es una proteína citoplasmática que posee tres dominios organizados en el orden GAF-GGDEF-EAL. Los dominios involucrados en el metabolismo del c-di-GMP presentan todos los aminoácidos requeridos para la unión de sustratos y la catálisis, por lo que se predice como una proteína bifuncional.



Locus	Proteína
<i>ATHIO_RS0104230</i>	Tiorredoxina-disulfuro reductasa
<i>ATHIO_RS0104235</i>	Helicasa SNF2
<i>ATHIO_RS0104240</i>	Proteína DGC/PDE bifuncional
<i>ATHIO_RS0104245</i>	Proteína hipotética
<i>ATHIO_RS0104250</i>	3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa
<i>ATHIO_RS0104255</i>	Proteína hipotética

Figura 16. Contexto genómico del locus *ATHIO_RS0104245*. En la tabla se indican que proteínas están codificadas por cada uno de los genes.

5.7.2. Análisis proteómico del secretoma mediante electroforesis bidimensional (2D)

Si las fibras encontradas en las biopelículas de *At. thiooxidans* mediante SEM (Fig. 11, pág. 84) son de naturaleza proteica, entonces éstas forman parte del secretoma total de la bacteria. En forma paralela al estudio del EPS, las proteínas presentes en los sobrenadantes fueron precipitadas con Rojo de Pirogalol, lavadas y resuspendidas en solución Tris, para luego ser dializadas en contra de esta misma solución, con el objetivo de eliminar sales e impurezas. Estas muestras de proteínas fueron cuantificadas, liofilizadas y finalmente analizadas por electroforesis en 2D. Al comparar las réplicas con la muestra FS WT1 (Fig. 17), se identificaron 12 posibles sitios que cambiaban sus niveles de intensidad entre ambas cepas. Por lo tanto, las proteínas presentes en esos sitios fueron tratadas y analizadas. Las proteínas presentes en los puntos de interés fueron digeridas con tripsina y los péptidos recuperados fueron secuenciados y cuantificados por espectrometría de masas (Plateforme de Protéomique Clinique, Sys2Diag – CNRS/Alcediag - UMR 9005, Montpellier, Francia).

El análisis de los sitios no reveló un patrón claro en el cambio del perfil de proteínas presentes en el sobrenadante de la cepa mutante. Se analizaron 12 proteínas, de las cuales 6 presentaron un incremento de la cantidad de proteínas en la cepa mutante, mientras que las otros 6 presentaron una disminución en la cantidad de proteínas. De las 12 proteínas identificadas, 4 son de función desconocida (*A6M23_02765*, *A6M23_16955*, *A6P07_17400* y *A6M23_17770*). La proteína codificada por el locus

A6M23_02765 presentó el mayor incremento en la cepa mutante, con un valor de 3,4 veces. Otra de las proteínas incrementadas en la cepa mutante nula fue la enzima tetracionato hidrolasa (TTH), con un incremento de 1,9 veces.

Entre las proteínas que presentaron reducción en su cantidad en los sobrenadantes de la cepa mutante se encuentran una Serina proteasa (*A6M23_11295*) con una decremento de 2,3 veces y dos proteínas de función desconocida *A6P07_17400* y *A6M23_17770*, con una reducción de 1,6 y 1,4 veces, respectivamente (Tabla 10). Algunas de las proteínas identificadas, tal como la TTH poseen puntos isoeléctricos altos (Tabla A4).

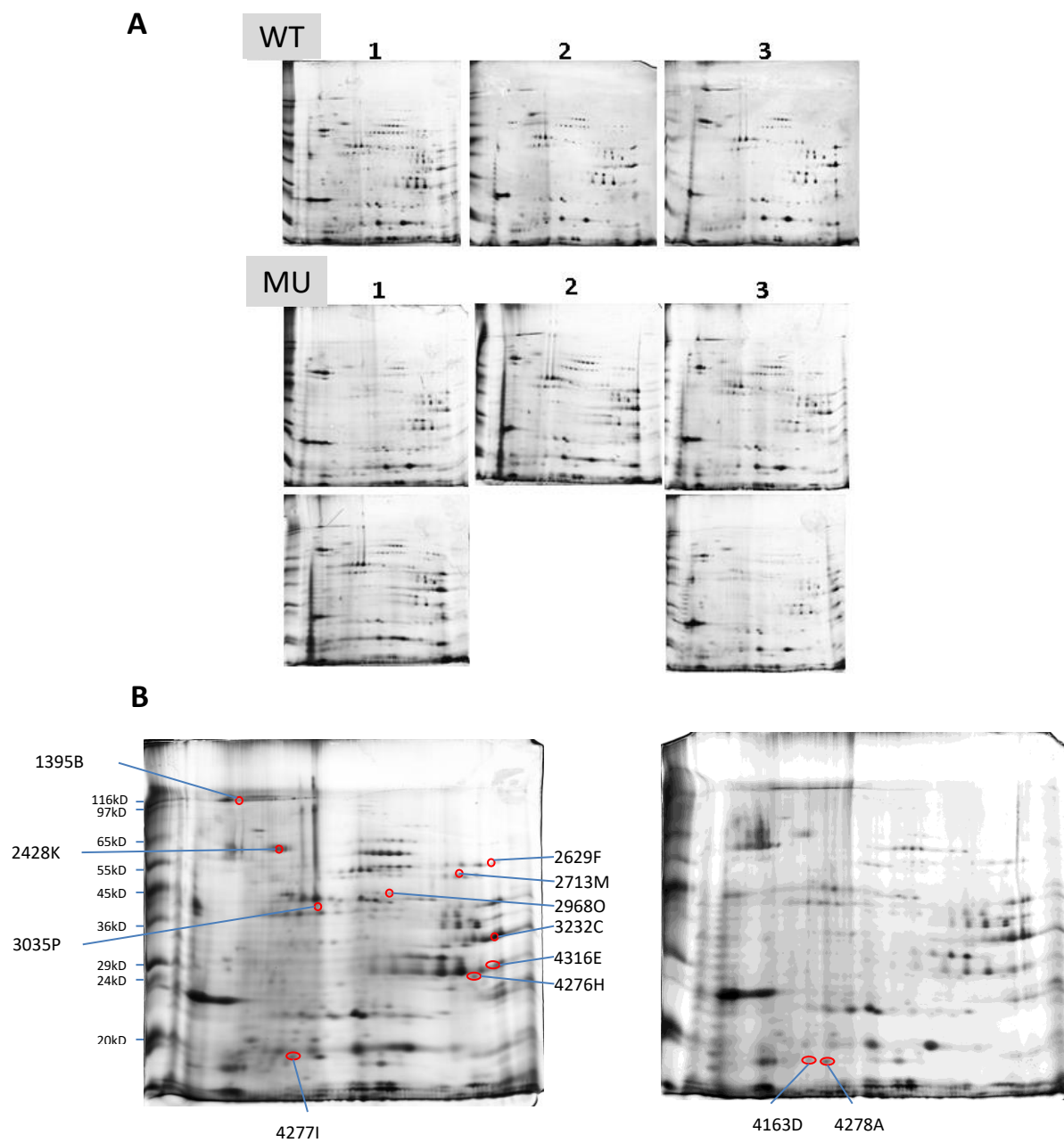


Figura 17. Análisis de los geles 2D de las proteínas del sobrenadante de *At. thiooxidans* ATCC 19377 silvestre (WT) y mutante $\Delta pelD$ (MU). (A) Imágenes usadas para la selección de proteínas con expresión diferencial. (B) Áreas seleccionadas para el análisis por espectrometría de masas. Cada uno de los geles posee un rango de pH de 3 (izquierda) a 10 (derecha) en la primera dimensión y luego fue corrido en condiciones denaturantes en la segunda dimensión en poliacrilamida al 12 % para luego ser teñido con plata. Se cargaron 30 μ g de proteínas por cada electroforesis.

Tabla 10. Proteínas identificadas por MS/MS en los sitios seleccionados en la electroforesis 2D. Se anotan las veces de cambio entre las cepas $\Delta pelD$ y WT de *At. thiooxidans* ATCC 19377.

Expresión aumentada en $\Delta pelD$ vs WT			Expresión reducida en $\Delta pelD$ vs WT		
Spot	Proteína	Cambio	Spot	Proteínas	Cambio
1395B	<u>Proteína no caracterizada</u> (A6M23_02765)	3,4 ↑	2713M	<u>Serina proteasa</u> (A6M23_11295)	2,3 ↓
3232C	<u>Proteína de unión a fosfato PstS</u> (A6P07_03430)	2,4 ↑	4277I	<u>Glicina descarboxilasa subunidad H</u> (A0A1C2IIM2_ACITH)	2,2 ↓
4278A	<u>Proteína de ensamble del cluster Fe-S IscU</u> (A6M23_20470)	2,3 ↑	2428K	<u>Chaperonina de 60 kDa</u> (A0A1C2IQ55_ACITH)	1,7 ↓
4316E	<u>Proteína no caracterizada</u> (A6M23_16955)	2,0 ↑	3035P	<u>Proteína no caracterizada</u> (A6P07_17400)	1,6 ↓
2629F	<u>Tetrionato hidrolasa</u> (A6P07_15480)	1,9 ↑	4276H	<u>Peptidilprolil isomerasa</u> (A6M23_15785)	1,5 ↓
4163D	<u>Proteína de shock térmico Hsp20</u> (A6M23_14405)	1,5 ↑	2968O	<u>Proteína no caracterizada</u> (A6M23_17770)	1,4 ↓

6. Discusión

6.1. El operón *pel* y las bacterias del consorcio lixivante.

Cuando se identificaron y comenzaron a caracterizar las proteínas metabólicas de una vía del c-di-GMP funcional en *At. thiooxidans* (Díaz, 2010; Díaz y col., 2013; Díaz, 2014), se procedió a la búsqueda de posibles proteínas receptoras que pudieran detectar los cambios en la concentración de este mensajero y transducir las señales a un cambio fenotípico. Uno de las proteínas identificadas presentó identidad con la proteína de membrana PelD que forma parte de un complejo proteico involucrado en la síntesis de exopolisacárido Pel descrito inicialmente en la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa* (Lee y col., 2007). Este exopolisacárido participa en la agregación celular y en la formación y mantención de las biopelículas de *Pseudomonas* (Friedman and Kolter, 2004; Lee y col., 2007; Mann and Wozniak, 2012; Visaggio y col., 2015).

Al analizar la secuencia genómica río arriba y río abajo del gen se identificó un putativo operón *pel* con algunas variaciones estructurales al operón canónico descrito en *P. aeruginosa* (Fig. 3, pág. 62). La diferencia más interesante que fue detectada entre ambos operones es la presencia de un gen adicional ubicado río abajo que codifica para una proteína citoplasmática con actividad UDP-glucosa-4-epimerasa. Este gen también se encuentra presente en el operón *pel* de *At. caldus*. Es probable que esta enzima esté participando en alguno de los pasos de la síntesis del precursor del polisacárido, convirtiendo la UDP-glucosa en UDP-galactosa. La existencia de esta enzima se

correlacionaría con el resultado obtenido con los ensayos de unión a lectinas que mostraron la capacidad de las células de unir la lectina BPA, la cual posee afinidad por el azúcar N-acetil-galactosamina (Fig. 4, pág. 68). Esta lectina también se une a las biopelículas de *At. caldus* cuando esta bacteria es crecida sobre cupones de azufre elemental (dato no mostrado). La presencia de N-acetil-galactosamina y de N-acetil-glucosamina, según lo visto con la lectina GS-II (Fig. 4, pág. 68) coincide con la composición descrita para el exopolisaccárido Pel de *P. aeruginosa* (Jennings y col., 2015). Adicionalmente, se observó una mayor señal de BPA comparando con aquel con GS-II en las biopelículas de *At. thiooxidans*. Esto implicaría que existe una mayor proporción de N-acetil-galactosamina que de N-acetil-glucosamina en la composición de Pel de *At. thiooxidans*. Este resultado también se condice con la descripción de la composición de Pel en *P. aeruginosa* (Jennings y col., 2015).

Posteriormente se procedió a analizar bioinformáticamente las secuencias genómicas de los miembros de la comunidad bacteriana presente en los entornos minerales ácidos disponibles en las bases de datos para definir la representación de este operón. Los análisis revelaron que el operón *pel* sólo está presente en los genomas de las bacterias oxidantes de azufre *At. thiooxidans* y *At. caldus* (Tabla 2, pág. 63). Sin embargo, el operón Pel no estaría presente en todas las cepas de *At. thiooxidans*, según lo que indican los resultados obtenidos por PCR sobre el gDNA de la cepa 9463 (Fig. 3, pág. 65), aunque este resultado también podría deberse a que la secuencia de la cepa 9463 sea muy diferente a las otras cepas analizadas. Para aclarar esta duda es necesario

realizar la secuenciación del genoma de la cepa DSM 9463 y comparar la secuencia con la cepa tipo mediante bioinformática.

6.2. EPS y *At. thiooxidans*

A pesar de la posible relevancia que este Pel pueda tener en las biopelículas, éste no es el único exopolisacárido que *At. thiooxidans* es capaz de sintetizar. El análisis de la secuencia genómica de la cepa ATCC 19377 reveló la presencia de un putativo operón *bcs* compuesto de 4 genes que codifican para un complejo multiproteico con actividad celulosa sintasa organizados en una configuración *bcsABSZ* (Fig. 18A). Al analizar los genomas de diferentes especies del género *Acidithiobacillus*, se encontró que este operón también está presente en los genomas de *At. caldus* y *At. ferrivorans*. Está descrito en varias bacterias que la celulosa es un componente estructural importante de las biopelículas (Römling y Galperin, 2015), por lo que se abre la hipótesis que estas 3 especies de *Acidithiobacillus* también sintetizan celulosa durante la formación de biopelículas sobre sustratos sólidos.

Al realizar una comparación de este operón con otros operones bacterianos relacionados a la biosíntesis de celulosa ya descritos en la literatura, se observa que la estructura es similar al tipo IIIb de operones de síntesis presente en la α -Proteobacteria quimioorganoheterótrofa *Acidiphilium cryptum* JF-5 (Römling y Galperin, 2015) (Fig. 18B), la cual comparte el mismo ambiente que los *Acidithiobacillus*. No obstante, existe

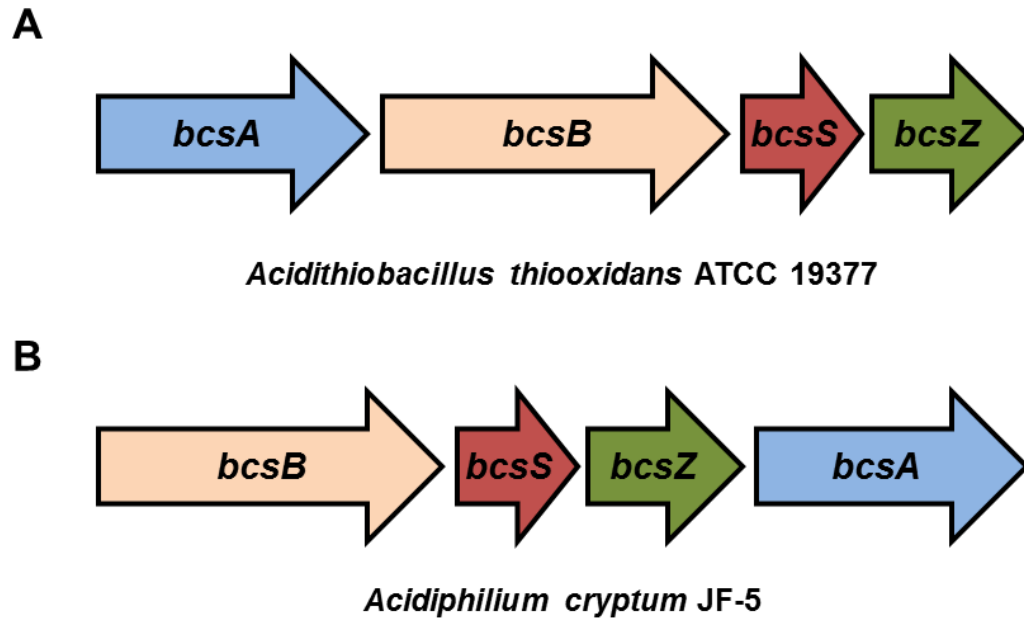


Figura 18. Estructura del putativo operón *bcs* de biosíntesis de celulosa identificado en *At. thiooxidans* ATCC 19377. Se compara la organización de este operón (A) con el operón *bcs* identificado en *Acidiphilium cryptum* JF-5 (B).

una diferencia estructural entre ambos operones: en *A. cryptum* el gen *bcsA* se encuentra al final del operón, por lo que la configuración del operón es *bcsBSZA*. La similitud estructural entre ambos operones permite formular la hipótesis de que un evento de transferencia horizontal de genes pudiese haber ocurrido entre un ancestro de *Acidithiobacillus* y una α -Proteobacteria tipo *Acidiphilium*.

Otro componente estructural importante de las biopelículas son las estructuras filamentosas de naturaleza proteica, las cuales están constituídas por pilis, fimbrias, fibras amiloides y/o flagelos (Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b; Chaban y col., 2015). Estas proteínas cumplen un rol de adhesinas que permiten la unión a distintas superficies y mantienen la integridad de la estructura de la biopelícula (Fleming y Wingender, 2010). El genoma de la cepa ATCC 19377 codifica 5 proteínas de ensamble de pili con dominio PilZ (*ATHIO_RS16400*, *ATHIO_RS0105675*, *ATHIO_RS0109125*, *ATHIO_RS0110790* y *ATHIO_RS0114620*) y 6 proteínas pilina tipo IV (*ATHIO_RS17100*, *ATHIO_RS0106075*, *ATHIO_RS0106080*, *ATHIO_RS0106085*, *ATHIO_RS0113585* y *ATHIO_RS0113590*), las cuales podrían participar en las distintas etapas de la formación de biopelículas, ya sea interaccionando con el sustrato energético, otros EPS presentes o las células vecinas.

Al comparar la producción de EPS totales entre las células planctónicas y las células adheridas se apreció un aumento en la producción total de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos urónicos (Tabla A3), los cuales participan en diferentes etapas

del ensamblaje de la biopelícula. Sin embargo, las células de la subpoblación adherida poseen una mayor proporción de exopolisacáridos y proteínas, y una menor proporción de ácidos urónicos (Tabla 3, pág. 66). La mayor producción de proteínas podría estar relacionada con la secreción de diferentes adhesinas tipo pili o fimbrias que permiten la unión al sustrato sólido, tal como ha sido descrito en *E. coli* (Barnhart y Chapman, 2006) o *Vibrio cholerae* (Jones y col., 2015). Los lípidos producidos por las células adheridas incrementan la superficie hidrofóbica y aseguran una mejor adherencia a la superficie del azufre, tal como se describió en *At. ferroxidans* (Gehrke y col., 1998). Adicionalmente, algunos de estos lípidos podrían estar actuando como biosurfactantes que facilitan la disolución del azufre elemental para su posterior activación, tal como fue descrito en Jones y Starkey (1961). La secreción de ácidos urónicos podría estar relacionada con la producción de una cápsula y de los lipopolisacáridos, los cuales permitirían mantener la estructura de la biopelícula, la interacción con otras células y la protección frente a elementos ambientales dañinos (Fleming y Wingender, 2010).

Finalmente, el incremento del nivel de carbohidratos podría ser relacionado con la síntesis de exopolisacáridos como Pel, celulosa y otros. Estos exopolisacáridos secretados tienen relación con la adherencia al sustrato y con el ensamblaje y mantenimiento de la estructura tridimensional de la biopelícula bacteriana (Sutherland, 2001; Flemming y Wingender, 2010; Colvin y col., 2011; Jennings y col., 2015). Adicionalmente, se ha descrito que muchos de los carbohidratos secretados en las biopelículas participan en las interacciones con otras especies pertenecientes a los

dominios Bacteria, Archaea o Eukarya (Augimeri y col., 2015). Por ejemplo, en bacterias del género *Rhizobium*, el polisacárido unipolar UPP y la producción subsiguiente de celulosa bacteriana son requeridas en las etapas de colonización en las raíces de leguminosas (Ausmees y col., 1999; Laus y col., 2006; Augimeri y col., 2015). En *E. coli*, la producción de celulosa, de ácido colánico y de PGA son requeridos para la adherencia a las células del hospedero, la maduración de la biopelícula y el desarrollo multicelular (Augimeri y col., 2015). En *Aliivibrio fischeri* (ex *Vibrio fischeri*), la celulosa bacteriana y el exopolisacárido Vps participan en la interacción célula-superficie y la maduración de la biopelícula durante la colonización de los epitelios del calamar hawaiano *Euprymna scolopes* (Bassis y Visick, 2010; Augimeri y col., 2015). En base a esta evidencia, es posible proponer que los distintos polisacáridos producidos por *At. thiooxidans* también pueden cumplir el rol de interactuar con otros microorganismos dentro de la biopelícula en estado natural, ya sean microorganismos hierro-oxidantes [primeras evidencias mostradas en Bellenberg y col., (2014)], azufre-oxidantes o quimioorganoheterótrofos.

Aunque se obtuvo una producción mayor de EPS totales en células adheridas (Tabla A3), lo cual se corresponde en parte con una mayor expresión transcripcional de los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* (Tabla 4, pág. 72) del operón *pel* y del gen *bcsA* del operón de síntesis de celulosa (Fig. A5), la producción de exopolisacáridos totales es bastante baja cuando se compara con bacterias como *Salmonella* serovar Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa* o *Komagataeibacter xylinus*. Una posible explicación a esta

diferencia en la producción de exopolisacáridos podría ser la cantidad de carbono disponible para la formación de biomasa. *At. thiooxidans* obtiene carbono principalmente a través de la fijación de CO₂ por la vía del ciclo de Calvin (Waksman y col., 1922; Valdés y col., 2008), lo cual es muy limitante debido a que la concentración de este gas presente en la atmósfera es de alrededor de 400 ppm (NOAA; <https://www.esrl.noaa.gov/>) y su fijación es energéticamente costosa, ya que la generación de una molécula de hexosa a partir de 6 moléculas de CO₂ requiere de 18 moléculas de ATP. Debido a estas limitaciones la célula debe racionar entre el crecimiento y el mantenimiento celular, la respuesta a estrés, la reparación de las estructuras celulares dañadas y la producción de exopolisacáridos. Otro factor importante que regula la producción de estos EPS y el grosor final de la biopelícula es la accesibilidad al O₂ atmosférico. Este gas es requerido como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria para la generación de ATP y está bien descrito que en el interior de biopelículas gruesas se crean entornos anaerobios (Costerton y col., 1995; Davey y O'Toole, 2000), lo que impide la oxidación óptima del azufre en la configuración de contacto estrecho célula-sustrato energético sólido.

6.3. Exopolisaccárido Pel

Los experimentos de qPCR revelaron un aumento de la expresión transcripcional de los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* en las células adheridas con respecto a las células planctónicas (Tabla 4, pág. 72). Este aumento en la expresión se pueden correlacionar

con el incremento detectado de los niveles intracelulares de c-di-GMP en las células adheridas a azufre elemental con respecto a las células planctónicas (Díaz y col., 2013). No obstante, las señales ambientales que gatillan los cambios de las actividades DGC y PDE totales, ya sea a un nivel transcripcional, traduccional o de regulación de la actividad enzimática, aún no han sido identificadas en *At. thiooxidans*. Tal como se ha descrito en otras bacterias, factores como la concentración de oxígeno (Tuckerman y col., 2009), los niveles de fosfato en el medio (Monds y col., 2007) y la presencia de moléculas de QS (Ueda y Wood; 2009) podrían actuar como señales.

Según se reporta con esta tesis, la adición exógena de moléculas de QS C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL y C10-AHL (Fig. 6, pág. 75) favorecen las etapas iniciales de la formación de biopelículas en *At. thiooxidans*. Además la adición de 3-oxo-C8 AHL incrementó la transcripción de los genes *pelA* y *pelD* (Tabla 5, pág. 76). Finalmente, los experimentos de adherencia sobre cupones de azufre en presencia de la 3-oxo-C8 AHL de la cepas ATCC 19377 silvestre y mutante $\Delta pelD$ mostraron que el efecto positivo de esta molécula sobre la formación de biopelícula requiere de la presencia del exopolisacárido Pel (Fig. 13, pág. 90), revelando por primera vez una relación molecular entre el control de la síntesis del exopolisacárido Pel y el sistema de QS. Bajo condiciones naturales, éstas AHLs son producidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, otro miembro del consorcio biolixivante (Farah y col., 2005). Por otro lado, Bellenberg y col. (2014) demostraron que las especies de *Acidithiobacillus* que oxidan solamente azufre como *At. thiooxidans* son colonizadores secundarios. Estas AHLs producidas

entonces por el colonizador primario de tipo hierro oxidantes *At. ferrooxidans* fomentaría la colonización secundaria por células de *At. thiooxidans* sobre la superficie de la pirita u otros concentrados minerales que se encuentren parcialmente oxidados mediante la regulación de la producción del exopolisacárido Pel. Debido a la ausencia de gen codificante para el receptor clásico de AHLs tipo LuxR que regule la transcripción de genes blanco ya sea en forma directa o indirecta (Valdés y col., 2008), la cascada molecular por la cual se transduce la señal AHL hacia la síntesis de Pel es aún un tema de investigación.

Una posible explicación podría ser que la transducción de señales gatillada por QS altere la actividad DGC/PDE de la célula e incremente los niveles de c-di-GMP (Hengge, 2009). Dos marcos de lectura abierto codificando para proteínas FleQ ha sido identificados en el genoma de la cepa ATCC 19377 (Valdés y col., 2011). Por ende, un posible mecanismo que podría explicar parte del incremento en la expresión es debido a la alteración de la afinidad de la proteína represora FleQ por la secuencia promotora de los genes *pel* al aumentar la concentración de c-di-GMP, tal como se ha descrito en *P. aeruginosa* (Hickman y Harwood, 2008; Matsuyama y col., 2016).

La falta de cambios significativos en los niveles de RNA de los genes estudiados en las células adheridas cuando se adicionó la molécula de QS 3-oxo-C8-AHL (Tabla 5, pág. 76) implica que la inducción por AHLs de la transcripción de los genes blanco *pelA* y *pelD* tiene un límite de saturación. Otro resultado importante es que el gen *wcaG* no

respondió a la presencia de 3-oxo-C8 AHL, lo que sugiere la existencia de un sistema de control transcripcional que es independiente del QS.

Finalmente, la actividad glicosil transferasa del complejo multiproteico Pel se encontraría favorecida por el incremento de los niveles de c-di-GMP, tal como está descrito en *P. aeruginosa* (Lee y col., 2007). El incremento de la actividad de biosíntesis de Pel se correlacionaría con el incremento de EPS totales en células adheridas (Tabla 3, pág. 66).

6.4. PelD y la estructura de la biopelícula de *At. thiooxidans*

Luego de comprobar que la mutación $\Delta pelD$ no afectaba la viabilidad de las células bajo las condiciones analizadas al comparar las curvas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante (Fig. 10, pág. 84), se analizó mediante microscopia electrónica de barrido la formación de biopelícula en ambas cepas. Se observaron cambios en la presencia de algunas azúcares de superficie (Fig. 12, pág. 87) y un aumento en la producción de estructuras filamentosas que rodean a las células (Fig. 11, pág. 84), pero no parece haber cambios en la tasa de adherencia celular a la superficie. Este resultado permite la generación de 2 hipótesis: 1) el exopolisacárido Pel participa en definir la estructura de la biopelícula, tal como ha sido descrito en *P. aeruginosa* por Colvin y col. (2011), y 2) que además del exopolisacárido Pel (ver sub-capítulo anterior) existen otros elementos moleculares participarían en el desarrollo inicial de la biopelícula por *At.*

thiooxidans. Los candidatos más factibles para la adherencia inicial al azufre elemental serían estructuras de naturaleza proteica, ya sean pili, flagelo, fimbria, fibra amiloide o adhesina tal como se ha demostrado en otras bacterias (Hinsa y col., 2003; Barnhart y Chapman, 2006; Wilksch y col., 2011; Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b; Chaban y col., 2015; Jones y col., 2015). Estos elementos proteináceos podrían funcionar como un andamio para la celulosa bacteriana, tal como está descrito en *E. coli* (Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b), por lo que también podría ser partícipe en la adherencia al sustrato sólido, tal como ha sido demostrado en bacterias del género *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Augimeri y col., 2015).

Una posible explicación del fenotipo de incremento del número de estructuras filamentosas presentes en las biopelículas de la cepa $\Delta pelD$ es que se trata de un tipo de mecanismo compensatorio para mantener la integridad estructural de la biopelícula. Esto ha sido descrito en el caso de *Bacillus subtilis*, donde la proteína TasA es secretada al medio extracelular y forma fibras amiloides, lo que provee integridad estructural a las biopelículas cuando no hay otros EPS presentes (Romero y col., 2010). Aún así, en *At. thiooxidans* esta compensación no parece ser suficiente para mantener la mismas propiedades mecánicas, ya que las biopelículas de la cepa $\Delta pelD$ liberaron más células cuando fueron tratadas con agitación en vórtex en presencia de Triton X-100 (Fig. 14, pág. 92). Según este resultado, las células de la cepa $\Delta pelD$ se encuentran menos adheridas entre sí que en la cepa parental. Ésto se condice con la información descrita en *P. aeruginosa* de que el exopolisacárido Pel participa en la agregación celular y en la

robustez de la biopelícula (Friedman and Kolter, 2004; Mann and Wozniak, 2012; Jennings y col., 2015). Aunque bajo condiciones de laboratorio no se hayan dado grandes cambios fenotípicos, es posible que bajo condiciones naturales la eliminación de Pel tenga efectos más nocivos sobre las células de *At. thiooxidans*.

6.5. Análisis proteómico de *At. thiooxidans*

Cuando se analizaron las biopelículas sobre los cupones de azufre por microscopía electrónica de barrido, se encontró una mayor expresión de estructuras filamentosas en la cepa $\Delta pelD$ que la cepa parental (Figs. 11A y 11B, pág. 84). Al comparar estas imágenes de las biopelículas de *At. thiooxidans* con las biopelículas de *E. coli* (Fig. 14C, pág. 85; Serra y col. 2013a) no se aprecian diferencias significativas en el aspecto de estas fibras. Está descrito en *E. coli* que además de celulosa, la composición de la biopelícula involucra diferentes estructuras filamentosas de naturaleza proteínica tal como fibras amiloides y flagelos (Serra y col., 2013a; Serra y col., 2013b). Por lo tanto, se abre la hipótesis de que las estructuras filamentosas presentes en las biopelículas de la cepa mutante de *At. thiooxidans* puedan contener proteínas dentro de su composición. La primera evidencia que podría ayudar a comprobar esta hipótesis se basa en las diferencias encontradas entre las proporciones entre azúcares y proteínas presentes en los EPS extraídos a partir de las cepas de *At. thiooxidans*, en donde se apreció un incremento en la cantidad de proteínas en los EPS de la cepa $\Delta pelD$ (Tabla 6, pág. 86).

En base a esta idea, se procedió a extraer y analizar las proteínas presentes en los secretomas y la superficie de las biopelículas de ambas cepas de *At. thiooxidans*.

6.5.1. Proteínas del Secretoma

Aunque no logró encontrar un patrón definido en las proteínas identificadas en los sitios de interés, se identificó que algunas estas proteínas presentan un punto isoeléctrico alto (Tabla A5), el cual es una adaptación para mantener su estructura tridimensional al pH muy ácido del medio. Entre las proteínas identificadas se encontró la enzima tetrionato hidrolasa (TTH), la cual fue identificada en el sitio 2629F (Tabla 10, pág. 100). Esta proteína se encuentra 1,9 veces más expresada en la cepa mutante $\Delta pelD$ que la cepa silvestre ATCC 19377.

A pesar de ser identificada inicialmente como una proteína periplasmática en bacterias, se ha descrito microorganismos que secretan TTH al medio extracelular en base a diferentes estímulos. En el caso descrito para *At. ferrooxidans* ATCC 23270, la secreción de TTH al medio permite la generación de glóbulos de azufre a partir de tiosulfato como un mecanismo de respuesta frente a la anaerobiosis del medio (Beard y col., 2011). Por otro lado, la arquea azufre-oxidante *Acidianus ambivaliens* DSM 3772 secreta TTH al medio extracelular como un requisito para poder metabolizar el tetrionato, ya que cuando la arquea es crecida en azufre elemental no es posible detectar esta proteína en el medio extracelular (Protze y col., 2011). En el caso de la

cepas de *At. thiooxidans*, es probable que el aumento en la producción de TTH sea un mecanismo para compensar el estrés generado por la ausencia de Pel.

6.5.2. Proteínas extraídas desde las biopelículas

Cuando se analizaron las proteínas presentes en la biopelícula, uno de los cambios más notorios en la expresión se dio a nivel de una de una proteína de alrededor de 15 kDa que estaba muy expresada en la cepa mutante $\Delta pelD$ (Fig. 18, pág. 95). Esta pequeña proteína con péptido señal, por lo que se puede decir que es extracelular. El análisis del contexto genómico ubicó el gen de esta proteína hipotética entre un gen codificante para una proteína DGC/PDE bifuncional y un gen codificante para una 3-hidroxiacil-CoA-ACP transferasa (Fig. 19, pág. 97). Debido a la sobreexpresión en biofilms, es posible que esta proteína hipotética participe en alguna etapa de la biosíntesis de lípidos estructurales en las biopelículas, lo cual podría funcionar como un mecanismo compensatorio o un elemento contra el estrés causado por la ausencia de Pel. Curiosamente, este módulo de tres genes se encuentra presente en otros genomas de *At. thiooxidans* que se encuentran anotados en la base de datos bajo la misma configuración descrita para *ATHIO_RS0104245* (Fig. 16, pág. 96), pero se encuentra ausente en los genomas de otras especies del género *Acidithiobacillus*. La presencia de estos tres genes en la misma configuración abre la posibilidad de la existencia de un nuevo cluster génico. Este cluster génico podría expresarse transcripcionalmente como un putativo operón, pero es necesario un análisis transcriptómico para confirmar esa hipótesis.

7. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos por los diversos experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis es posible concluir que:

1. La producción de EPS en *At. thiooxidans* se encuentra favorecida en las células adheridas a la superficie del azufre elemental, favoreciendo la producción de exopolisacáridos y proteínas.
2. Los análisis de expresión transcripcional revelaron que los genes *pelA*, *pelD* y *wcaG* del putativo operón *pel* presentaron un mayor nivel de transcritos en células adheridas, lo que indica que las proteínas codificadas por estos genes estarían participando en alguna etapa de la formación de biopelículas sobre azufre.
3. La adición exógena de 3-oxo-C8 AHL al medio de cultivo permitió definir que la vía del QS favorece la adherencia y regularía positivamente la síntesis del EPS Pel al promover un aumento en la transcripción de los genes *pel*.
4. La mutación nula de *pelD* no afecta la adherencia de *At. thiooxidans* al azufre, pero altera la estructura y fortaleza de la biopelícula sobre azufre elemental, así como en el patrón de secreción de proteínas al medio de cultivo.

8. Referencias

- **Abel S., Chien P., Wassmann P., Schirmer T., Kaever V., Laub M.T., Baker T.A., Jenal U (2011).** Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Molecular Cell* (43): 550-560.
- **Abel S., Bucher T., Nicollier M., Hug I., Kaever V., Abel Zur Wiesch P., Jenal U (2013).** Bi-modal distribution of the second messenger c-di-GMP controls cell fate and asymmetry during the *Caulobacter* cell cycle. *PLoS Genetics* (9): e1003744. doi: 10.1371/journal.pgen.1003744.
- **Africa C.J., van Hille R.P., Harrison S.T (2013).** Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor. *Applied microbiology and biotechnology* (97): 1317-1324.
- **Aguilera A., Souza-Egipsy V., Gómez F., Amils R (2007).** Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Rio Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology* (52): 294-305.
- **Ahmad I., Lamprokostopoulou A., Le Guyon S., Streck E., Barthel M., Peters V., Hardt W.D., Römling U (2011).** Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* (6): e28351. doi: 10.1371/journal.pone.0028351.
- **Aljanabi S.M., Martinez I (1997).** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* (25): 4692-4693.
- **Aldridge P., Paul R., Goymier P., Rainey P., Jenal U (2003).** Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology* (47): 1695-1708.
- **Amikam D., Galperin M.Y (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics (Oxford, England)* (22): 3-6.
- **Augimeri R.V., Varley A.J., Strap J.L (2015).** Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions: Lessons Learned from Diverse Biofilm-Producing Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology* (6): doi: 10.3389/fmicb.2015.01282.
- **Ausmees N., Jonsson H., Höglund S., Ljunggren H., Lindberg M (1999).** Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* (145): 1253-1262.
- **Ausmees N., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Lindberg M (2001).** Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiology Letters* (204): 163-167.
- **Baraquet C., Murakami K., Parsek M.R., Harwood C.S (2012).** The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic acids research* (40): 7207-7218.
- **Baraquet C., Harwood C.S (2016).** FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* (198): 178-186.
- **Barnhart M.M., Chapman M.R (2006).** Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology* (60): 131-147.
- **Bassis C.M., Visick K.L (2010).** The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology* (192): 1269-1278.
- **Beard S., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A. (2011).** Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generates extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase. *Frontiers in Microbiology* (2): doi: 10.3389/fmicb.2011.00079.
- **Bellenberg S., Diaz M., Noël N., Sand W., Poetsch A., Guilianì N., Vera M (2014).** Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology* (165): 773-781.
- **Benach J., Swaminathan S.S., Tamayo R., Handelman S.K., Folta-Stogniew E., Ramos J.E., Forouhar F., Neely H., Seetharaman J., Camilli A., Hunt J.F (2007).** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *The European Molecular Biology Organization Journal* (26): 5153-5166.
- **Bobrov A.G., Kirillina O., Perry R.D (2005).** The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiology Letters* (247): 123-130.

- **Bordeleau E., Burrus V (2015).** Cyclic-di-GMP signaling in the Gram-positive pathogen *Clostridium difficile*. *Current genetics* (61): 497-502.
- **Bosecker K (1997).** Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* (20): 591-604.
- **Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (72): 248-254.
- **Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology* (13): 20-26.
- **Brombacher E., Baratto A., Dorel C., Landini P (2006).** Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of Bacteriology* (188): 2027-2037.
- **Bruscella P., Appia-Ayme C., Levican G., Ratouchniak J., Jedlicki E., Holmes D.S., Bonnefoy V (2007).** Differential expression of two bcl complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology* (153): 102-110.
- **Bryant R.D., McGroarty K.M., Costerton J.W., Lashley E.J (1988).** *Thiobacillus albertis* sp.nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 25. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* (38): 220-222.
- **Caldwell R.B., Lattemann C.T (2004).** Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 610-612.
- **Castellanos P (2008).** Biolixiviación, las expectativas y desafíos del proceso. *Minería Chilena* (327): 109-121.
- **Castro M., Ruiz L.M., Barriga A., Jerez C.A., Holmes D.S., Guiliani N (2009).** C-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria. *Advances Materials Research* (71-73): 223-226. In *International Biohydrometallurgy Symposium*. Bariloche, Argentina (2009).
- **Castro M (2013).** Caracterización de la vía del c-di-GMP y de su relación con los fenotipos de adherencia y motilidad en la bacteria biominera *Acidithiobacillus caldus*: el desafío de construir el mutante nulo Δ ACA_1413. Tesis de Doctorado. Departamento de biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Chaban B., Hughes H.V., Beeby M (2015).** The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in cell & developmental biology* (46): 91-103.
- **Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N.C., Giese B., Jenal U., Schirmer T (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings National Academy Sciences USA* (101): 17084-17089.
- **Chang A.L., Tuckerman J.R., Gonzalez G., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Gilles-Gonzalez M.A (2001).** Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry* (40): 34420-3426.
- **Chen Y.E., Tsokos C.G., Biondi E.G., Perchuk B.S., Laub M.T (2009).** Dynamics of two Phosphorelays controlling cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology* (191): 7417-7429.
- **Chen L., Lin J., Li B., Lin J., Lui X (2010).** Method development for electrotransformation of *Acidithiobacillus caldus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (20): 39-44.
- **Cheng Y.-S., Zheng Y., VanderGheynst J.S (2011).** Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids* (46): 95-103.
- **Childers W.S., Xu Q., Mann T.H., Mathews I.I., Blair J.A., Deacon A.M., Shapiro L (2014).** Cell fate regulation governed by a repurposed bacterial histidine kinase. *PLoS Biology* (12):e1001979. doi: 10.1371/journal.pbio.1001979.
- **Chin K.H., Lee Y.C., Tu Z.L., Chen C.H., Tseng Y.H., Yang J.M., Ryan R.P., McCarthy Y., Dow J.M., Wang A.H., Chou S.H (2010).** The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Molecular Biology* (396): 646-662.
- **Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., Folcher M., Jenoe P (2006).** Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of Biological Chemistry* (281): 32015-32024.
- **Claret L., Miquel S., Vieille N., Ryjenkov D.A., Gomelsky M., Darfeuille-Michaud A (2007).** The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* (282): 33275-33283.
- **Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K., Borlee B.R., Wozniak D.J., Wong G.C.L., Parsek M.R (2011).** The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* (7): e1001264. doi: 10.1371/journal.ppat.1001264.

- **Colvin K.M., Alnabeseya N., Baker P., Whitney J.C., Howell P.L., Parsek M.R (2013).** PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* (195): 2329-2339.
- **Cooley R.B., Smith T.J., Leung W., Tierney V., Borlee B.R., O'Toole G.A., Sondermann H (2015).** Cyclic Di-GMP-Regulated Periplasmic Proteolysis of a *Pseudomonas aeruginosa* Type Vb Secretion Substrate. *Journal of Bacteriology* (198): 66-76.
- **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M (1995).** Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology* (49): 711-745.
- **D'Argenio D.A., Miller S.I (2004).** Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* (150): 2497-2502.
- **Dasgupta N., Ramphal R (2001).** Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* (183): 6636-6644.
- **Davey M.E., O'Toole G.A (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (64): 847-867.
- **Díaz M (2010).** Estudio de los niveles de transcripción de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 que codifican putativas fosfodiesterasas pertenecientes a la vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463. Seminario de Título en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Díaz M., Copaja S., Guiliani N (2013).** Functional analysis of c-di-GMP pathway in biomining bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Advances Materials Research* (825): 133-136.
- **Díaz M (2014).** Estudio funcional de la vía del segundo mensajero c-di-GMP de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Departamento de biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P., Bond P (2003).** Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology* (149): 1959-1970.
- **Dow J.M., Fouhy Y., Lucey J.F., Ryan R.P (2006).** The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (19): 1378-1384.
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* (28): 350-356.
- **Duerig A., Abel S., Folcher M., Nicollier M., Schwede T., Amiot N., Giese B., Jenal U (2009).** Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes & Development* (23): 93-104.
- **Düvel J., Bertinetti D., Möller S., Schwede F., Morr M., Wissing J., Radamm L., Zimmermann B., Genieser H.G., Jänsch L., Herberg F.W., Häussler S (2012).** A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* (88): 229-236.
- **Espejo R., Romero P (1987).** Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on Elemental Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* (53): 1907-1912.
- **Falagán C., Johnson D.B (2016).** *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* (66): 206-211.
- **Fanning S., Mitchell A.P (2012).** Fungal biofilms. *PLoS Pathogens* (8): e1002585. doi: 10.1371/journal.ppat.1002585.
- **Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez C.A., Guiliani N (2005).** Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* (71):7033-7040.
- **Fazli M., O'Connell A., Nilsson M., Niehaus K., Dow J.M., Givskov M., Ryan R.P., Tolker-Nielsen T (2011).** The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Molecular Microbiology* (82): 327-341.
- **Federle M.J., Bassler B.L (2003).** Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation* (112): 1291-1299.
- **Filiseti-Cozzi T.M., Carpita N.C (1991).** Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* (197): 157-162.
- **Fleming H.C., Wingender J (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* (8): 623-633.
- **Fong J.N.C., Yildiz F.H (2015).** Biofilm matrix proteins. *Microbiology Spectrum* (3), doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
- **Fortune W.B., Mellon M.G. (1938).** Determination of Iron with o-Phenanthroline. A Spectrophotometric Study. *Industrial and Engineering Chemistry* (10): 60-64.

- **Franklin M.J., Chitnis C.E., Gacesa P., Sonesson A., White D.C., Ohman D.E (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. *Journal of Bacteriology* (176): 1821–1830.
- **Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L (2011).** Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology* (2): 167. doi: 10.3389/fmicb.2011.00167.
- **Friedman L, Kolter R (2004).** Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology* (51): 675-690.
- **Fröls S (2013).** Archaeal biofilms: widespread and complex. *Biochemical Society transactions* (41): 393-398.
- **Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H (1996).** Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water research* (30): 1749-1758.
- **Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R (2011).** Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews* (111): 28-67.
- **Galperin M.Y., Nikolskaya A.N., Koonin E.V (2001).** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letter* (203): 11-21.
- **Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., Sand W. (1998).** Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* (64): 2743-2747.
- **Gentina, J.C., Acevedo, F. (2013).** Application of bioleaching to copper mining in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 3. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-12>
- **Ghafoor A., Jordens Z., Rehm B.H (2013).** Role of PelF in pel polysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* (79): 2968-2978.
- **Goebel B.M., Stackebrandt E (1994).** Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology* (60): 1614-1621.
- **González A., Bellenberg S., Mamani S., Ruiz L., Echeverría A., Soulère L., Doutheau A., Demergasso C., Sand W., Queneau Y., Vera M., Guiliani N (2013).** AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (97): 3729-3737.
- **Guan Y., Gao Y.G., Liaw Y.C., Robinson H., Wang A.H (1993).** Molecular structure of cyclic diguanylic acid at 1 Å resolution of two crystal forms: self-association, interactions with metal ion/planar dyes and modeling studies. *Journal of Biomolecular structure & dynamics* (11): 253-276.
- **Guiliani N., Jerez CA (2000).** Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* (66):2318-2324.
- **Guttenplan S.B., Kearns D.B (2013).** Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology reviews* (37): 849-871.
- **Ha D.G., O'Toole G.A (2015).** C-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review. *Microbiology Spectrum* (3): MB-0003-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
- **Habazettl J., Allan M.G., Jenal U., Grzesiek S (2011).** Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *The Journal of biological chemistry* (286): 14304-14314.
- **Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P (2004).** Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nature reviews Microbiology* (2): 95-108.
- **Hallberg K.B., Lindström, E.B (1994).** Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* (140): 3451–3456.
- **Hallberg K.B., González-Toril E., Johnson D.B (2010).** *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* (14): 9-19.
- **Hedrich S., Johnson D.B (2013).** *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* (63): 4018-4025.
- **Hengge R (2009).** Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 7: 263-273. Review.
- **Henrici A.T (1933).** Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *Journal of Bacteriology* (25): 277-287.

- **Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S (2005).** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings National Academy Sciences USA* (102): 14422-14427.
- **Hickman J.W., Harwood C.S (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology* (69): 376-389.
- **Hinsa S.M., Espinosa-Urgel M., Ramos J.L., O'Toole G.A (2003).** Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology* (49): 905-918.
- **Hobley L., Fung R.K., Lambert C., Harris M.A., Dabhi J.M., King S.S., Basford S.M., Uchida K., Till R., Ahmad R., Aizawa S., Gomelsky M., Sockett R.E (2012).** Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathogens* (8): e1002493. doi: 10.1371/journal.ppat.1002493.
- **Hull T.D., Ryu M.H., Sullivan M.J., Johnson R.C., Klena N.T., Geiger R.M., Gomelsky M., Bennett J.A (2012).** Cyclic Di-GMP phosphodiesterases RmdA and RmdB are involved in regulating colony morphology and development in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* (194): 4642-4651.
- **Hurley J.H (2003).** GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Science STKE* (164), pe1.
- **Irie Y., Parsek M.R (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology* (322): 67-84.
- **Jackson D.W., Simecka J.W., Romeo T (2002).** Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of Bacteriology* (184): 3406-3410.
- **Jenal U., Malone J (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Reviews of Genetic* (40): 385-407.
- **Jennings L.K., Storek K.M., Ledvina H.E., Coulon C., Marmont L.S., Sadovskaya I., Secor P.R., Tseng B.S., Scian M., Filloux A., Wozniak D.J., Howell P.L., Parsek M.R (2015).** Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings National Academy Sciences USA* (112): 11353-11358.
- **Jonas K., Melefors O., Römling U (2009).** Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiology* (4): 341-358.
- **Jones G.E., Starkey R.L (1961).** Surface-active substances produced by *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology* (82): 788-789.
- **Jones C.J., Utada A., Davis K.R., Thongsomboon W., Zamorano Sanchez D., Banakar V., Cegelski L., Wong G.C., Yildiz F.H (2015).** C-di-GMP regulates motile to sessile transition by modulating MshA Pili biogenesis and near-surface motility behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathogens* (11): e1005068. doi: 10.1371/journal.ppat.1005068.
- **Kelly D.P., Wood A.P (2000).** Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (50): 511-516.
- **Kinzler K., Gehrke T., Telegdi J., Sand W (2003).** Bioleaching: a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* (71): 83-88.
- **Kirillina O., Fetherstone J.D., Bobrov A.G., Abney J., Perry R.D (2004).** HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hsm-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Molecular Microbiology* (54): 75-78.
- **Klebensberger J., Lautenschlager K., Bressler D., Wingender J., Philipp B (2008).** Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptative survival strategy. *Environmental Microbiology* (9): 2942-2955.
- **Konishi Y., Asai S., Yoshida N (1995).** Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* (61): 3617-3622.
- **Krasteva P.V., Fong J.C., Shikuma N.J., Beyhan S., Navarro M.V., Yildiz F.H., Sondermann H (2010).** *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* (327): 866-868.
- **Kulasakara H., Lee V., Brencic A., Liberati N., Urbach J., Miyata S., Lee D.G., Neely A.N., Hyodo M., Hayakawa Y., Ausubel F.M., Lory S (2006).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings National Academy Sciences USA* (103): 2839-2844.
- **Kulshina N., Baird N.J., Ferré-D'Amaré A.R (2009).** Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nature Structural & Molecular Biology* (16): 1212-1217.
- **Kumar M., Chatterji D (2008).** Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* (154): 2942-2955.

- **Lai T.H., Kumagai Y., Hyodo M., Hayakawa Y., Rikihisa Y (2009).** The *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. *Journal of Bacteriology* (191): 693-700.
- **Lara R.H., Valdez-Pérez D., Rodríguez A.G., Navarro-Contreras H.R., Cruz R., García-Meza J.V (2010).** Interfacial insights of pyrite colonized by *Acidithiobacillus thiooxidans* under acidic conditions. *Hydrometallurgy* (103): 35-44.
- **Laus M.C., Logman T.J., Lamers G.E., Van Brussel A.A.N., Carlson R.W., Kijne J.W (2006).** A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Molecular Microbiology* (59): 1704-1713.
- **Leduc J.L., Roberts G.P (2009).** Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *Journal of Bacteriology* (191):7121-7122.
- **Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007).** A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology* (67): 1474-1484.
- **Li Y-H, Tian X (2012).** Quorum Sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* (12): 2519-2538.
- **Lori C., Ozaki S., Steiner S., Böhm R., Abel S., Dubey B.N., Schirmer T., Hiller S., Jenal U (2015).** Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature* (523): 236-239.
- **Lovering A.L., Capeness M.J., Lambert C., Hobley L., Sockett R.E (2011).** The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of Cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *mBio* (2). doi: 10.1128/mBio.00163-11.
- **Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B (2000).** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* (2): 1051-1060.
- **Lynch M.J., Swift S., Kirke D.F., Keevil C.W., Dodd C.E., Williams P (2002).** The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology* (4): 18-28.
- **Mackintosh M.E (1978).** Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* (105): 215-218.
- **Maetzato Y., Johnson T., McCarthy S., Dana K., Blum P (2012).** Metal resistance and lithoautotrophy in the extreme thermoacidophile *Metallosphaera sedula*. *Journal of Bacteriology* (194): 6856-6863.
- **Mamani S., Moiner D., Denis Y., Soulere L., Queneau Y., Talla E., Bonnefoy V., Guiliani N (2016).** Insights into the Quorum Sensing Regulon of the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by transcriptomic in the presence of an Acyl Homoserine Lactone superagonist analog. *Frontiers in Microbiology* (7): 1365.
- **Mann E.E., Wozniak D.J (2012).** *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology reviews* (36): 893-916.
- **Matsuyama B.Y., Krasteva P.V., Baraquet C., Harwood C.S., Sondermann H., Navarro M.V (2016).** Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings National Academy Sciences USA* (113): 209-218.
- **McCarthy Y., Ryan R.P., O'Donovan K., He Y.Q., Jiang B.L., Feng J.X., Tang J.L., Dow J.M (2008).** The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology* (9): 819-824.
- **Merighi M., Lee V.T., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007).** The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* (65): 876-895.
- **Mika F., Hengge R (2014).** Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA biology* (11): 494-507.
- **Monds R.D., Newell P.D., Gross R.H., O'Toole G.A (2007).** Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesine LapA. *Molecular Microbiology* (63): 656-679.
- **Moons P., Michiels C.W., Aersten A (2009).** Bacterial interactions in biofilms. *Critical reviews in Microbiology* (35): 157-168.
- **Nakhamchik A., Wilde C., Rowe-Magnus D.A (2008).** Cyclic-di-GMP Regulates Extracellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation, and Rugose Colony Development by *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology* (71): 4199-4209.
- **Navarro C.A., von Bernath D., Jerez C.A (2013).** Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biological Research* (46): 363-371.
- **Neunuebel MR, Golden JW (2008).** The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene *all2874* encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions. *Journal of Bacteriology* (190): 6829-6836.

- **Newell P.D., Monds R.D., O'Toole G.A (2009).** LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings National Academy Sciences USA* (106): 3461-3466.
- **Newell P.D., Boyd C.D., Sondermann H., O'Toole G.A (2011).** A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biology* (9): e1000587. doi:10.1371/journal.pbio.1000587.
- **Ng F.M.W., Dawes E.A (1973).** Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochemical Journal* (132): 129-140.
- **Ng W.L., Bassler B.L (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Reviews in Genetic* (43): 197-222.
- **Nieto P.A., Covarrubias P.C., Jedlicki E., Holmes D.S., Quatrini R (2009).** Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC molecular biology* (10): doi: 10.1186/1471-2199-10-63.
- **Olivera-Nappa A., Picioreanu C., Asenjo J.A (2010).** Non-homogeneous biofilm modeling applied to bioleaching processes. *Biotechnology and bioengineering* (106): 660-676.
- **Orell A., Fröls S., Albers S.V (2013).** Archaeal biofilms: the great unexplored. *Annual Review of Microbiology* (67): 337-354.
- **Orr M.W., Donaldson G.P., Severin G.B., Wang J., Sintim H.O., Waters C.M., Lee V.T (2015).** Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proceedings National Academy Sciences USA* (112): 5048-5057.
- **O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology* (54): 49-79.
- **Pagliai F (2007).** Evaluación de tres diferentes métodos para la obtención de las proteínas extracelulares de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Seminario de Título en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- **Paul R., Weiser S., Amiot N.C., Chan C., Schirmer T., Giese B., Jenal U (2004).** Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & Development* (18):715–727.
- **Paul K., Nieto V., Carlquist W.C., Blair D.F., Harshey R.M (2010).** The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Molecular Cell* (38): 128-139.
- **Pistorio M., Curutchet G., Donati E., Tedesco P (1994).** Direct zinc sulfide bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Biotechnology Letters* (16): 419 - 424.
- **Pratt J.T., Tamayo R., Tischler A.D., Camilli A (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry* (282): 12860-12870.
- **Protze J., Müller F., Lauber K., Naß B., Mentele R., Lottspeich F., Kletzin A (2011).** An extracellular tetrathionate hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus ambivalens* with an activity optimum at pH 1. *Frontiers in Microbiology* (2): doi: 10.3389/fmicb.2011.00068.
- **Quatrini R., Appia-Ayme C., Denis Y., Jedlicki E., Holmes D.S., Bonnefoy V (2009).** Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* (10): 394.
- **Ramelot T.A., Yee A., Cort J.R., Semesi A., Arrowsmith C.H., Kennedy M.A (2007).** NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* (66): 266–271.
- **Ramirez R., Guiliani N., Valenzuela L., Beard S., Jerez C.A (2004).** Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 4491-4498.
- **Rao F., Yang Y., Qi Y., Liang Z.X (2008).** Catalytic mechanism of cyclic di-GMP specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* (190): 3622-3631.
- **Rawlings D.E., Dew D., du Plessis C (2003).** Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* (21): 38-44.
- **Rawlings D.E (2004).** Microbially-assisted dissolution of minerals and its use in the mining industry. *Pure and Applied Chemistry* (76): 847-859.
- **Rawlings D.E (2005).** Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* (4): 13.
- **Reyrat J.M., Pelicic V., Guicquel B., Rappuoli R (1998).** Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. *Infection and Immunity* (66): 4011–4017.

- **Romero D., Claudio Aguilar C., Losick R., Kolter R (2010).** Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings National Academy Sciences USA* (107): 2230-2234.
- **Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology* (57): 629-639.
- **Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M (2013).** Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (77): 1-52.
- **Römling U., Galperin M.Y (2015).** Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology* (23): 545-557.
- **Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G.A., van Boom J.H. et al (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325: 279- 281.
- **Roth A., Breaker R.R (2009).** The structural and functional diversity of metabolite binding riboswitches. *Annual Reviews of Biochemistry* (78): 305–334.
- **Ruiz L.M., Sand W., Jerez C.A., Guiliani N (2007).** C-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: analysis of putative diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) bifunctional proteins. *Advances Materials Research* (20): 551-555.
- **Ruiz LM, Valenzuela S., Castro M., Gonzalez A., Frezza M., Soulère L., Rohwerder T., Queneau Y., Doutheau A., Sand W., Jerez CA, Guiliani N (2008).** AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* (94): 133-137.
- **Ruiz L.M., Castro M., Barriga A., Jerez C.A., Guiliani N (2012).** The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Letters in Applied Microbiology* (54): 133–139.
- **Ryan R.P., Fouhy Y., Lucey J.F., Crossman L.C., Spiro S., He Y.W., Zhang L.H., Heeb S., Camara M., Williams P., Dow J.M (2006).** Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings National Academy Sciences USA* (103): 6712–6717.
- **Ryan R.P., Lucey J., O'Donovan K., McCarthy Y., Yang L., Tolker-Nielsen T., Dow J.M (2009).** HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* (11): 1126–1136.
- **Ryjenkov D.A., Tarutina M., Moskvin O.V., Gomelsky M (2005).** Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of Bacteriology* (187): 1792-1798.
- **Ryjenkov D.A., Simm R., Romling U., Gomelsky M (2006).** The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* (281): 30310–30314.
- **Saha R., Donofrio R.S (2012).** The microbiology of metalworking fluids. *Applied Microbiology and Biotechnology* (94): 1119-1130.
- **Sand W., Gehrke T., Jozsa P., Schippers A (2001).** (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* (59): 159–175.
- **Sand W., Gehrke T (2006).** Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* (157): 49-56.
- **Sarand I., Osterberg S., Holmqvist S., Holmfeldt P., Skarfstad E., Parales RE, Shingler V (2008).** Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* (10): 1320-1334.
- **Sauer K., Richkard A.H., Davies D.G (2007).** Biofilms and biocomplexity. *Microbiology* (2): 347-353.
- **Schaeffer W.I., Holbert P.E., Umbreit W.W (1963).** Attachment of *Thiobacillus thiooxidans* to sulfur crystals. *Journal of Bacteriology* (85): 137-140.
- **Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A (2007).** Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell host & microbe* (2): 264-277.
- **Schippers A., Sand W (1999).** Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied Environmental Microbiology* (65): 319-321.
- **Schirmer T., Jenal U (2009).** Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature reviews Microbiology* (7): 724-735.

- **Schmidt A.J., Ryjenkov D.A., Gomelsky M (2005).** The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology* (187): 4774-4781.
- **Serra D.O., Richter A.M., Hengge R (2013a).** Cellulose as an Architectural Element in Spatially Structured *Escherichia coli* Biofilms. *Journal of Bacteriology* (195): 5540-5554.
- **Serra D.O., Richter A.M., Klauck G., Mika F., Hengge R (2013b).** Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* (4): e00103–e00113.
- **Shang F., Xue T., Sun H., Xing L., Zhang S., Yang Z., Zhang L., Sun B (2009).** The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein A gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner. *Infection and Immunity* (77): 2849-2856.
- **Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., Römling U (2004).** GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology* (53): 1123-1134.
- **Simm R., Remminghorst U., Ahmad I., Zakikhany K., Römling U (2009).** A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression and motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology* (191): 3928-3937.
- **Smith K.D., Lipchock S.V., Ames T.D., Wang J., Breaker R.R., Strobel S.A (2009).** Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nature Structural & Molecular Biology* (16): 1218-1223.
- **Smith K.D., Shanahan C.A., Moore E.L., Simon A.C., Strobel S.A (2011).** Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proceedings National Academy Sciences USA* (108): 7757-7762.
- **Song J.H., Kinney K.A (2000).** Effect of vapor-phase bioreactor operation on biomass accumulation, distribution, and activity: Linking biofilm properties to bioreactor performance. *Biotechnology and Bioengineering* (68): 508-516.
- **Southern E.M (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* (98):503-517.
- **Soutourina O.A., Monot M., Boudry P., Saujet L., Pichon C., Sismeiro O., Semenova E., Severinov K., Le Bouguenec C., Coppée J.Y., Dupuy B., Martin-Verstraete I (2013).** Genome-wide identification of regulatory RNAs in the human pathogen *Clostridium difficile*. *PLoS Genetics* (9): e1003493. doi: 10.1371/journal.pgen.1003493.
- **Spurbeck R.R., Tarrien R.J., Mobley H.L (2012).** Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of Motility or sessility in *Escherichia coli* CFT073. *MBio* (3). pii: e00307-12. doi: 10.1128/mBio.00307-12.
- **Starosvetsky J., Zukerman U., Armon R.H (2013).** A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* (syn. *Thiobacillus thiooxidans*) from water samples. *Journal of microbiological methods* (92): 178-182.
- **Steiner S., Lori C., Boehm A., Jenal U (2013).** Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *The EMBO Journal* (32): 354 –368.
- **Sudarsan N., Lee E.R., Weinberg Z., Moy R.H., Kim J.N., Link K.H., Breaker R.R (2008).** Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science* (321): 411-413.
- **Sultan S.Z., Pitzer J.E., Boquoi T., Hobbs G., Miller M.R., Motaleb M.A (2011).** Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* (79): 3273-3283.
- **Sutherland I.W (2001).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* (147): 3-9.
- **Tagliabue L., Antoniani D., Maciag A., Bocci P., Raffaelli N., Landini P (2010).** The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology* (156): 2901–2911.
- **Tamayo R., Tischler A.D., Camilli A (2005).** The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* (280): 33324-33330.
- **Tamayo R., Pratt J.T., Camilli A (2007).** Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Reviews of Microbiology* 61: 131-148.
- **Tamayo R., Schild S., Pratt J.T., Camilli A (2008).** Role of cyclic di-GMP during el tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the in vivo-induced cyclic di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infections and Immunity* (76): 1617-1627.
- **Tao F., He Y.W., Wu D.H., Swarup S., Zhang L.H (2010).** The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of Bacteriology* (192): 1020-1029.

- **Tchigvintsev A., Xu X., Singer A., Chang C., Brown G., Proudfoot M., Cui H., Flick R., Anderson W. F., Joachimiak A., Galperin M. Y., Savchenko A., Yakunin A. F. (2010).** Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *Journal of molecular biology* (402): 524-538.
- **Temple K.L., Colmer A.R (1951).** The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* (62): 605–611.
- **Thoendel M., Horswill A.R (2010).** Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Advances in applied microbiology* (71): 91-112.
- **Thomas D.N., Dieckmann G.S (2002).** Ocean Science-Antarctic Sea ice: a habitat for extremophiles. *Science* (295): 641-644.
- **Thormann K.M., Duttler S., Saville R.M., Hyodo M., Shukla S., Hayakawa Y., Spormann A.M (2006).** Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology* (188): 2681-2691.
- **Tischler A.D., Camilli A (2005).** Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and Immunity* (73): 5873-5882.
- **Tran N.T., Den Hengst C.D., Gomez-Escribano J.P., Buttner M.J (2011).** Identification and characterization of CdgB, a diguanylate cyclase involved in developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* (193): 3100-3108.
- **Tuckerman J.R., Gonzalez G., Sousa E.H.S., Wan X., Saito J.A., Alam M., Gilles-Gonzalez M.A (2009).** An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-di-GMP Control. *Biochemistry* (48): 9764-9774.
- **Tuckerman J.R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M.A (2011).** Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *Journal of Molecular Biology* 407: 633– 639.
- **Ueda A., Wood T.K (2009).** Connecting Quorum Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathogens* (5): e1000483. doi:10.1371/journal.ppat.1000483.
- **Valdes J., Pedroso I., Quatrini R., Holmes D.S. (2008)** Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* (94): 180-184.
- **Valdes J., Ossandon F., Quatrini R., Dopson M., Holmes D.S (2011).** Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *Journal of Bacteriology* (193): 7003-7004.
- **Valenzuela, S., Banderas, A., Jerez, C.A., Guiliani, N (2007).** Cell-cell communication in bacteria. A promising new approach to improve bioleaching efficiency? Chapter 13. In: Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer, Netherlands: 253–264.
- **van Zyl L.J., van Muster J.M., Rawlings D.E (2008).** Construction of *arsB* and *tetH* mutants of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus* by marker exchange. *Applied and Environmental Microbiology* (74): 5686-5694.
- **Vasseur P., Vallet-Gely I., Soscia C., Genin S., Filloux A (2005).** The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* (151): 9885-9897.
- **Vera M., Krok B., Bellenberg S., Sand W., Poetsch A. (2013),** Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics* (13): 1133–1144.
- **Visaggio D., Pasqua M., Bonchi C., Kaever V., Visca P., Imperi F (2015).** Cell aggregation promotes pyoverdine-dependent iron uptake and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* (6):902. doi: 10.3389/fmicb.2015.00902.
- **Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P (2009).** Bacterial extracellular polysaccharides involved in Biofilm Formation. *Molecules* (14): 2535-2554.
- **Waksman S.A., Joffe J.S (1922).** Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *Journal of Bacteriology* (7): 239–256.
- **Wassmann P., Chan C., Paul R., Beck A., Heerklotz H., Jenal U., Schirmer T (2007).** Structure of BeF₃-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* (15): 915-927.
- **Watnick P., Kolter R (2000).** Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* (182): 2675-2679.
- **Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch V.F., Hengge R (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ S-dependent genes, promoters, and σ factor selectivity. *Journal of Bacteriology* (187): 1591-1603.

- **Weinhouse H., Sapir S., Amikam D., Shilo Y., Volman G., Ohana P., Benziman M (1997).** C-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. FEBS Letters (416): 207-211.
- **Whitehead N., Barnard A., Slater H., Simpson N., Salmond G (2001).** Quorum sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews (25): 365-404.
- **Whitfield G.B., Marmont L.S., Howell P.L (2015).** Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. Frontiers in Microbiology (6): doi: 10.3389/fmicb.2015.00471.
- **Whitney J.C., Colvin K.M., Marmont L.S., Robinson H., Parsek M.R, Howell P.L (2012).** Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of Biological Chemistry (287): 23582-23593.
- **Wilksch J.J., Yang J., Clements A., Gabbe J.L., Short K.R., Cao H., Cavaliere R., James C.E., Whitchurch C.B., Schembri M.A., Chuah M.L., Liang Z.X., Wijburg O.L., Jenney A.W., Lithgow T., Strugnell R.A (2011).** MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. PLoS Pathogens (7): e1002204. doi:10.1371/journal.ppat.1002204.
- **Williams KP, Kelly DP (2013).** Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (63):2901-2906.
- **Wolfe A.J., Visick K.L (2008).** Get the Message Out: Cyclic-Di-GMP Regulates Multiple Levels of Flagellum-Based Motility. Journal of Bacteriology (190): 463-475.
- **Yarzabal A., Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V (2004).** Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. Microbiology (150): 2113-2123.
- **Zhang C.G., Zhang R.Y., Xia J.L., Zhang Q., Nie Z (2008).** Sulfur activation-related extracellular proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China (18): 1398-1402.
- **Zippel B., Neu T (2011).** Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. Applied and Environmental Microbiology (77): 505-516.
- **Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Römling U (2001).** The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Molecular Microbiology (39): 1452-1463.

9. Anexos

Tabla A1. Cepas y plasmidios utilizados en este estudio

Cepas o plasmidios	Característica
Cepas bacterianas	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	
ATCC 19377	Cepa de colección ATCC
ATCC 19377 $\Delta pelD$	ATCC 19377 $pelD::kan^R$
DSM 504	Cepa de colección DSMZ
DSM 622	Cepa de colección DSMZ
Thio2	Cepa de colección
DSM 9463	Cepa de colección DSMZ
<i>Escherichia coli</i>	
JM109	Amplificación de vectores
HB101	Cepa usada para conjugación
Plasmidios	
pGEM-T Easy	Vector de amplificación, Amp ^R , Promega®
pOT	pUC19/oriT, Amp ^R
pOT- <i>AttpelD</i>	<i>pelD</i> clonado entre los sitios <i>SacI</i> y <i>XbaI</i> de pOT, Amp ^R
pOT- <i>AttpelD::kan^R</i>	Idéntico a pOT- <i>Attpel</i> , pero el gen <i>pelD</i> se encuentra reemplazado por <i>kan^R</i> , Amp ^R , Kan ^R
pSKM2	Fuente del gen <i>kan^R</i> , Kan ^R
pR388	Contiene los genes de transferencia, Tmp ^R

*Amp^R: resistencia a ampicilina, Kan^R: resistencia a kanamicina, Tmp^R: resistencia a trimetropin

Tabla A2. Partidores utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia 5'-3'
<u>qPCR</u>	
pelA1_F	CCGATTGCCGCAGTTATTTATT
pelA1_R	GCTGTCTTGATGGCTTTGATG
PelDF	CACAAGTTGGCATCCTGGTTCGTT
PelDR	CATGCTGCCTGCGAAAGGTAACAA
AtthioxUDP F	GAACTTGTCAATGCGCCATC
AtthioxUDP R	GGCCAGCAATAAATCCTGAATAC
16S-F3	ATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACA
16S-R3	AATCCGAACTACGACGCGCTTTCT
Ath/map_f	GGACCGGATTTGTACGATTA
Ath/map_r	GACGTGGTTGAGGGAAATACA
BcsAF	TTGTGACCACATAACCAACCAGGGA
BcsAR	TGGCCTCTTGGCATATCCAGATT
<u>Operón</u>	
tRNA-PelA (F)	CCTGAAGCGCCACCATATAA
tRNA-PelA (Rev)	GCTAACCACGGGAGGAATAAA
A1-A2 (F)	CAAACAGTACAGCTCCGCCTTTG
A1-A2 (Rev)	TGTTTTGGGAAGTAATGCTGAG
PelA-PelB (F)	CGCCCATTGCCGAATTTAC
PelA-PelB (Rev)	CTGCCTGATACTGTCCACTTT
B1-B2 (F)	GATGGCACGTCTGGCATTGTC
B1-B2 (Rev)	TCCTTCTTTGAACATATTCTC
B2-B3 (F)	CATCGCCTGGTCACTGCGACAA
B2-B3 (Rev)	GTGACCAATAACCACTGGCAAG
PelB-PelC (F)	CAACTGAACGCCGGGATAA
PelB-PelC (Rev)	ATTGTTGGCAAAGGGCAATAC
PelC-PelD (F)	CTACCGTGCGGGAATCAAT
PelC-PelD (Rev)	TGACCAGAAGCCATGGAAAT
PelD-PelE (F)	CACAGAGAAGCGGAGAGAATAC
PelD-PelE (Rev)	AGTATGACTACTGGACCCAATAAAG
PelE-PelF (F)	TCTTGCTTCGGCCATTT
PelE-PelF (Rev)	CGATTAACCCAGGAGGATACAC
PelF-PelG (F)	CTATCGGGAGGAGTACATGTTTG
PelF-PelG (Rev)	ATCAATAACGGCTGAGCTATGT
PelG-UDP (F)	TGTTTATTGCCGATATACTAGGACT
PelG-UDP (Rev)	CACGGACGTGATAACCTTCA
UDP-Coldshock (F)	AACCGTCCTGGTCTCTATCT
UDP-Coldshock (Rev)	GTACATCACTCCGCCATTCA

Tabla A2. (Continuación)

Nombre	Secuencia 5'-3'
<u>Mutagénesis</u>	
T7	AATACGACTCACTATAG
SP6	ATTTAGGTGACTATAG
PelD5'-F	ACCGAGCTCAGGAATCTTGATTCCCATTTTG
PelD5'-R	ACCAAGCTTAAATATTTCCAGGCTCCGTATCTC
PelD3'-F	ACCCCGGGTGATTTTCATACTGGTCCTTATG
PelD3'-R	ACCTCTAGAGCATTCAAGTTTATCAGTAATTC
KanR_div_5'	GCTTTCTACGTGTTCCGCTTC
KanR_div_3'	TCTATGAAAGGTTGGGCTTC
pOTsec_F	CAGCTATGATGCAGGCAAAC
pOTsec_R	CAGTGAGCGCAACGCAATTA
ATT_F	GGGTGCTAATANCGCCTGCG
907R	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT
sondaAttpelD_F	CCACCCGCTTTCGACAATTA
sondaAttpelD_R	CAGGATGCCAACTTGTGGTA
sondaKan_R_F	GCTTACATGGCGATAGCTAGAC
sondaKan_R_R	GAACTCGTCAAGAAGGCGATAG

*Los sitios de restricción se encuentran marcados

Tabla A3. Cantidad y composición de los EPS extraídos desde las sub-poblaciones planctónicas y adheridas de *At. thiooxidans* ATCC 19377 crecido en azufre elemental.

	EPS células planctónicas ($\mu\text{g/g}$ células)	EPS células adheridas ($\mu\text{g/g}$ células)
Carbohidratos	346,91 \pm 65,00	1596,80 \pm 67,71
Proteínas	39,86 \pm 8,00	245,58 \pm 58,33
Ácidos Urónicos	102,53 \pm 10,60	271,61 \pm 59,00
Lípidos	87,51 \pm 35,42	350,69 \pm 96,96
Hierro	0,73 \pm 0,08	2,62 \pm 1,03
DNA extracelular	29,3 \pm 2,70	2,54 \pm 0,20
Total	606,84 \pm 121,80	2469,84 \pm 283,13

Tabla A4. Péptidos únicos identificados en la secuenciación MS/MS de la proteína codificada por *ATHIO_RS0104245*.

Secuencia	N-term cleavage window	C-term cleavage window
AECTYGGAIK	EIAAKDGGKAECTYGGA	CTYGGAIKVADLNINY
AECTYGGAIKVADLNINYDYK	EIAAKDGGKAECTYGGA	LNINYDYKMWATTHDW
ASSTTTATPAFMSPAIAK	ADSSGSTKASSTTTAT	FMSPAIAKELCTAWNN
ASSTTTATPAFMSPAIAKELCTAWNNNQLTEK	ADSSGSTKASSTTTAT	NNQLTEKLAGSWIKN
ASSTTTATPAFMSPAIAKELCTAWNNNQLTEKLAGSWIK	ADSSGSTKASSTTTAT	LAGSWIKNNGGKGYK
DGKAECTYGGAIK	VQLEIAAKDGGKAECTY	CTYGGAIKVADLNINY
DGKAECTYGGAIKVADLNINYDYK	VQLEIAAKDGGKAECTY	LNINYDYKMWATTHDW
ELCTAWNNNQLTEK	FMSPAIAKELCTAWNN	NNQLTEKLAGSWIKN
ELCTAWNNNQLTEKLAGSWIK	FMSPAIAKELCTAWNN	LAGSWIKNNGGKGYK
ELCTAWNNNQLTEKLAGSWIKNNGGK	FMSPAIAKELCTAWNN	WIKNNGGKGYKVMIEY
GYKVMIEYDSSMK	WIKNNGGKGYKVMIEY	EIYDSSMKSTPPVQLE
GYKVMIEYDSSMKSTPPVQLEIAAK	WIKNNGGKGYKVMIEY	VQLEIAAKDGGKAECTY
KVPATVPAS	SEFLKLIKVPATVPA	VPATVPAS_____
LIKKVPATVPAS	GPFSEFLKLIKVPAT	VPATVPAS_____
MEAMENMGPFSEFLKLIK	RLNFKGPKMEAMENMG	SEFLKLIKVPATVPA
MEAMENMGPFSEFLKLIK	RLNFKGPKMEAMENMG	EFLKLIKVPATVPAS
NNGGKGYKVMIEYDSSMK	LAGSWIKNNGGKGYK	EIYDSSMKSTPPVQLE
STPPVQLEIAAK	EIYDSSMKSTPPVQLE	VQLEIAAKDGGKAECTY
STPPVQLEIAAKDGK	EIYDSSMKSTPPVQLE	EIAAKDGGKAECTYGGA
STPPVQLEIAAKDGGKAECTYGGAIK	EIYDSSMKSTPPVQLE	CTYGGAIKVADLNINY
VMEIYDSSMK	NNGGKGYKVMIEYDSS	EIYDSSMKSTPPVQLE
VMEIYDSSMKSTPPVQLEIAAK	NNGGKGYKVMIEYDSS	VQLEIAAKDGGKAECTY
VPATVPAS	EFLKLIKVPATVPAS	VPATVPAS_____

Tabla A5. Identificación de las proteínas a partir de las sitios seleccionadas en la electroforesis 2D.

3035P	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Uncharacterized protein OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6P07_17400 PE=4 SV=1 - [A0A1C2HWG2_ACITH]	47,1	6,81	13,82	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	KVLAISAGSDATHR	1	1	1	A0A1C2HWG2
	VLAISAGSDATHR	2	1	1	A0A1C2HWG2
	LAMSYQTGmGNR	2	1	1	A0A1C2HWG2
	VTYPSVIPER	1	1	1	A0A1C2HWG2
	WVIETPTR	1	1	1	A0A1C2HWG2
	mTPVVGITYQHIGR	1	1	1	A0A1C2HWG2
2629F	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Tetrathionate hydrolase OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6P07_15480 PE=4 SV=1 - [A0A1C2IK38_ACITH]	54,7	9,01	14,12	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	SSPVANTLmGNPLVVGK	1	1	1	A0A1C2IK38
	AFNANTGQVLWTNNmGR	2	1	1	A0A1C2IK38
	SSPVANTLMGNPLVVGK	1	1	1	A0A1C2IK38
	DVNPQFNANKA	1	1	1	A0A1C2IK38
	TGQMVHEYHVGGR	1	1	1	A0A1C2IK38
	mVDGKPTmETLVR	2	1	1	A0A1C2IK38
	DVNPQFNANK	1	1	1	A0A1C2IK38
1395B	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Uncharacterized protein OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_02765 PE=4 SV=1 - [A0A1C2J8L4_ACITH]	103	9,11	27,72	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	ANAAQSTATDALSK	1	1	1	A0A1C2J8L4
	ADAAQSTANEALAK	2	1	1	A0A1C2J8L4
29680	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Uncharacterized protein OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_17770 PE=4 SV=1 - [A0A1C2IV15_ACITH]	45,6	7,06	8,35	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	GFEGLALPDQR	1	1	1	A0A1C2IV15
	IALDEQGNFAK	1	1	1	A0A1C2IV15
	ATLIYDASAGHAR	1	1	1	A0A1C2IV15

Tabla A5. (Continuación)

2713M	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Serine protease OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_11295 PE=4 SV=1 - [A0A1C2JK92_ACITH]	50,4	7,69	17,56	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	LVASLPAGQPVPVLR	1	1	1	A0A1C2JK92
	IDANNLPTVQIGDSGK	2	1	1	A0A1C2JK92
	QYGPAVWNISTTETK	2	1	1	A0A1C2JK92
	EPIGALVSQVVPDGPAAK	1	1	1	A0A1C2JK92
	LHIEVGPLTAEAR	2	1	1	A0A1C2JK92
	mDVALLK	1	1	1	A0A1C2JK92

4278A	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_20470 PE=3 SV=1 - [A0A1C2J2I1_ACITH]	15,1	5,33	20,42	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	GAGQASQTEVAAAQVAH	1	1	1	A0A1C2J2I1
	RGAGQASQTEVAAAQVAH	2	1	1	A0A1C2J2I1
	VNEQGIIEDAK	1	1	1	A0A1C2J2I1

4277I	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Glycine cleavage system H protein OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=gcvH PE=3 SV=1 - [A0A1C2IIM2_ACITH]	13,7	4,94	37,12	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	TGADALAAFE EK	1	1	1	A0A1C2IIM2
	SPVSGTVVSSNDDVAK	1	1	1	A0A1C2IIM2
	SPVSGTVVSSNDDVAKDPGLINK	1	1	1	A0A1C2IIM2
	LTPADFAGDSGELK	1	1	1	A0A1C2IIM2

4163D	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Heat-shock protein Hsp20 OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_14405 PE=3 SV=1 - [A0A1C2J059_ACITH]	16,9	5,66	20,67	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	TVQLPVDVDASQSK	6	1	1	A0A1C2J059
	DGVLELVLPK	1	1	1	A0A1C2J059
	RYGDFSR	1	1	1	A0A1C2J059

Tabla A5. (Continuación)

4316E	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Uncharacterized protein OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_16955 PE=4 SV=1 - [A0A1C2HZV0_ACITH]	23,8	8,84	11,26	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	FSTLAEKDSIDK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	TKAEADKImAELK	2	1	1	A0A1C2HZK6
	ALTPPPLSAmK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	AEADKImAELK	1	1	1	A0A1C2HZK6

4276H	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Peptidylprolyl isomerase OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6M23_15785 PE=4 SV=1 - [A0A1C2HZK6_ACITH]	27,9	8,69	37,60	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	QILADAAMDQYVQEHVPESDIQAAYNK	2	1	1	A0A1C2HZK6
	FSTLAEKDSIDK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	KFSTLAEKDSIDK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	EPNAHEQVQNLVNmEVLSQYATSHNLAQSPDVK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	ALTPPPLSAmK	1	1	1	A0A1C2HZK6
	AEADKImAELK	1	1	1	A0A1C2HZK6

3223C	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	Phosphate-binding protein PstS OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=A6P07_03430 PE=3 SV=1 - [A0A1C2IW21_ACITH]	38,2	9,35	19,39	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	LSGPVLAGIYSGK	3	1	1	A0A1C2IW21
	ITNWDDAAIAK	1	1	1	A0A1C2IW21
	LGLAmLQNR	2	1	1	A0A1C2IW21
	LGLAMLQNR	1	1	1	A0A1C2IW21
	ISLVFAPGAK	1	1	1	A0A1C2IW21
	SYPIINYEYAIIVSK	1	1	1	A0A1C2IW21
	AGNFVLPTVENAK	2	1	1	A0A1C2IW21

Tabla A5. (Continuación)

2428K	Description	MW [kDa]	calc. pI	Coverage	# Proteins
	60 kDa chaperonin OS=Acidithiobacillus thiooxidans GN=groEL PE=3 SV=1 - [A0A1C2IQ55_ACITH]	58,6	5,31	41,92	1
	Sequence	# PSMs	# Proteins	# Protein Groups	Protein Group Accessions
	LESTTLADLGQAK	2	1	1	A0A1C2IQ55
	AmLEDmAILTGGR	4	1	1	A0A1C2IQ55
	EVAQVGTISANSDDSIGK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	AAVEEGIVPGGGVALVR	2	1	1	A0A1C2IQ55
	AGGDMGGDmGGmGGmGGmGGF	14	1	1	A0A1C2IQ55
	QIVANAGGEGSVILNK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	GVNVLADAVK	3	1	1	A0A1C2IQ55
	AGGDmGGDmGGmGGmGGmGGF	3	1	1	A0A1C2IQ55
	ENTTIIDGAGQQSEIK	2	1	1	A0A1C2IQ55
	GYLSPYFVNNQDK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	VVSEEIGMK	2	1	1	A0A1C2IQ55
	AVIAGmNPmDLK	5	1	1	A0A1C2IQ55
	AmLEDMAILTGGR	4	1	1	A0A1C2IQ55
	AANHDQDmGVAIIR	4	1	1	A0A1C2IQ55
	DmLPVLEQVAK	3	1	1	A0A1C2IQ55
	KAmLEDmAILTGGR	2	1	1	A0A1C2IQ55
	AVIAGmNPMDLK	2	1	1	A0A1C2IQ55
	LAGGVAVIK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	VVSEEIGmK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	KDDKAGGDmGGDmGGmGGmGGmGGF	4	1	1	A0A1C2IQ55
	SFGAPTITK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	EIELADKFENmGAQmVK	1	1	1	A0A1C2IQ55
	RAIEEPLR	1	1	1	A0A1C2IQ55
	FENMGAQmVK	2	1	1	A0A1C2IQ55

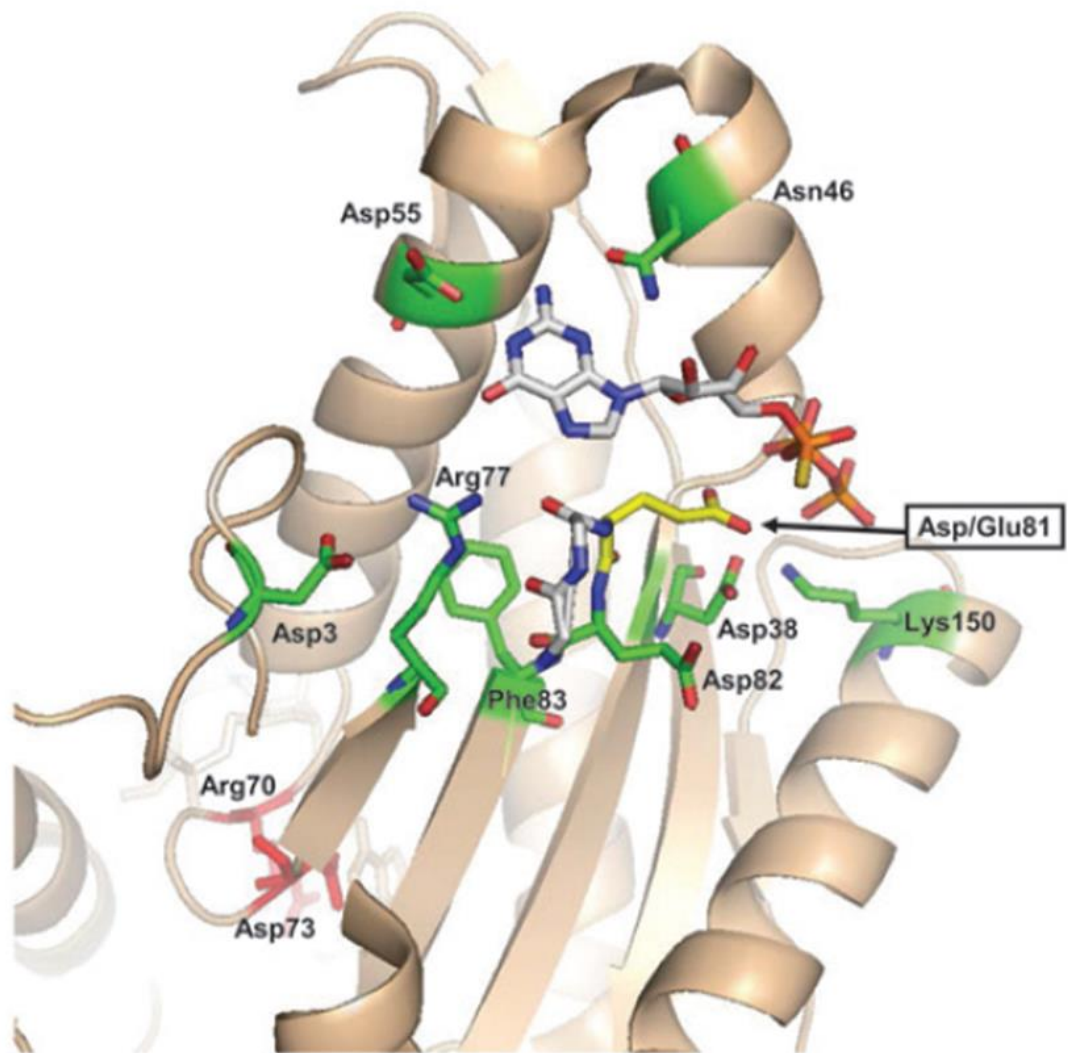


Figura A1. Estructura del sitio activo del dominio GGDEF de la proteína PleD de *Caulobacter crescentus*. Se aprecian los aminoácidos involucrados en la unión de GTP. Figura basada en Römling y col., 2013.

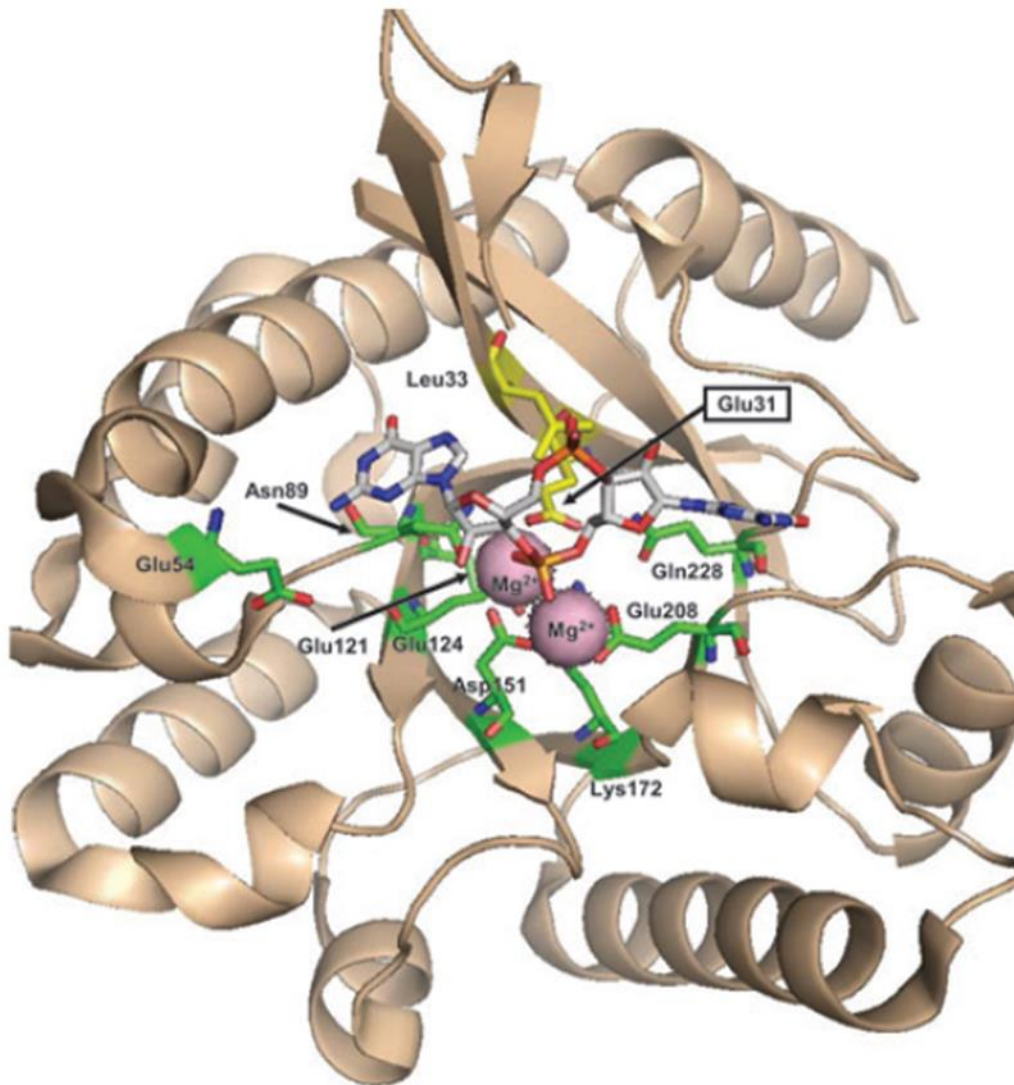


Figura A2. Estructura del sitio activo del dominio EAL de la proteína Tbd1265 de *Thiobacillus denitrificans*. Se observan los aminoácidos que están involucrados en la coordinación del c-di-GMP y el Mg^{+2} . Figura basada en Römling y col., 2013.

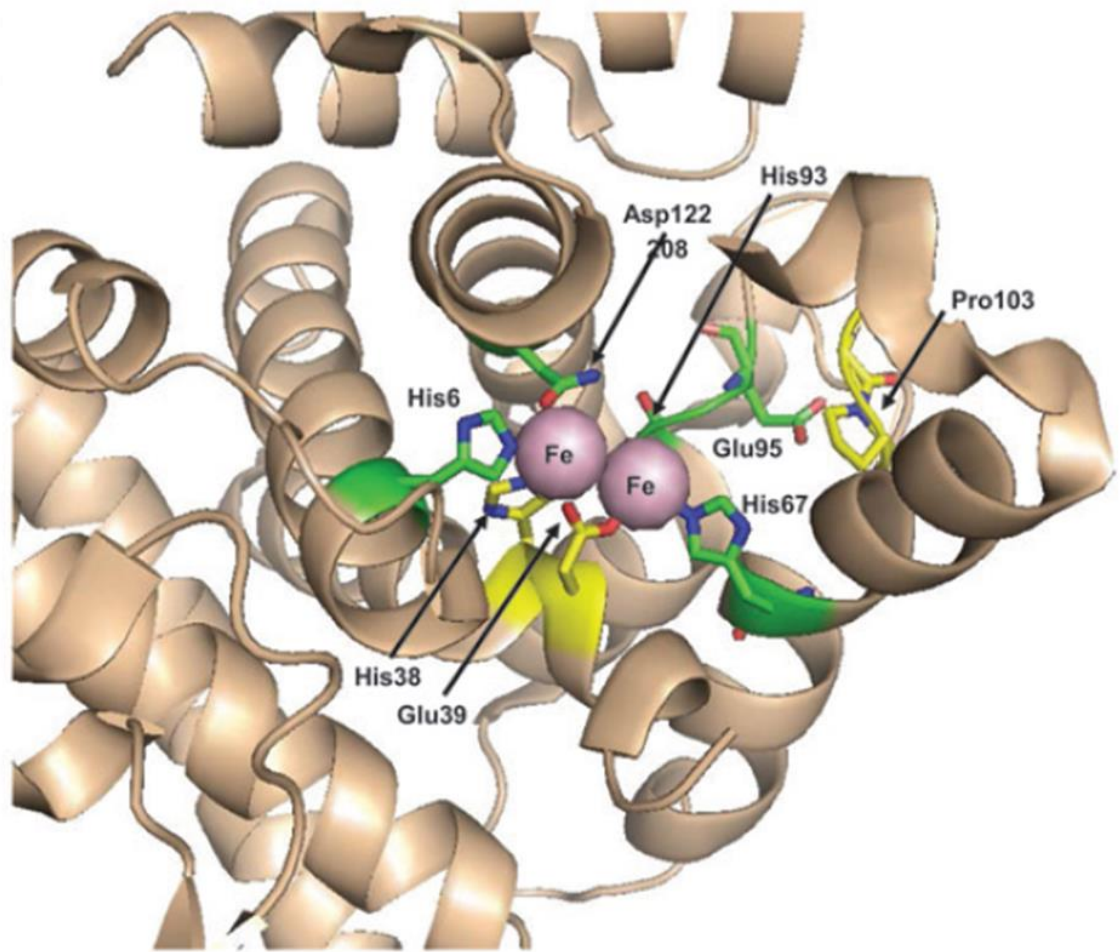


Figura A3. Estructura del sitio activo del dominio HD-GYP de la proteína Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus*. Se observan algunos de los aminoácidos involucrados en la coordinación del sustrato y el Fe usado como cofactor. Figura basada en Römling y col., 2013.

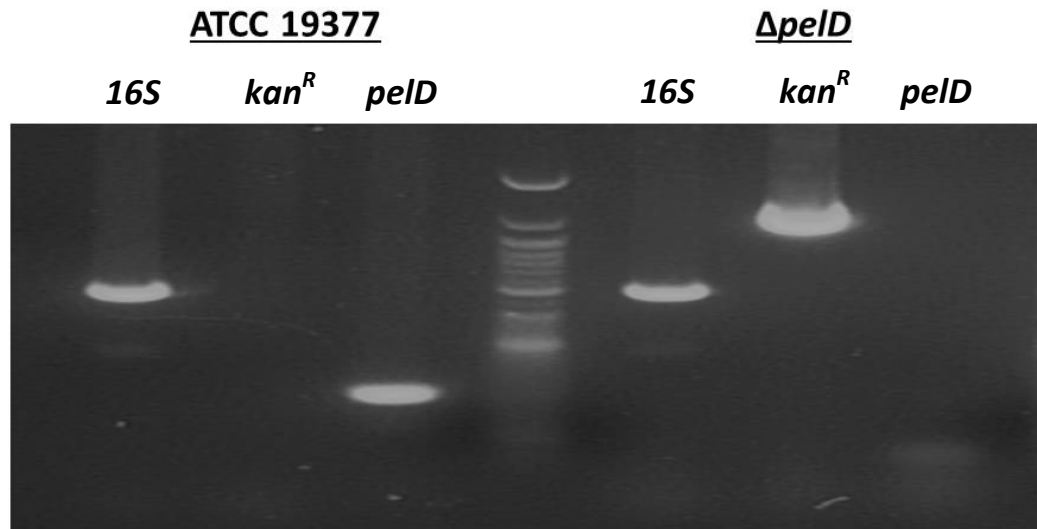


Figura A4. Control de pureza de las cepas de *At. thiooxidans* utilizadas en los experimentos de proteómica. Mediante experimentos de PCR de 40 ciclos se analizaron en cada ensayo de proteómica los lisados celulares obtenidos con calor en contra de los genes *16S*, *kan^R* y *pelD*. Se presentan los resultados obtenidos con la primera réplica biológica.

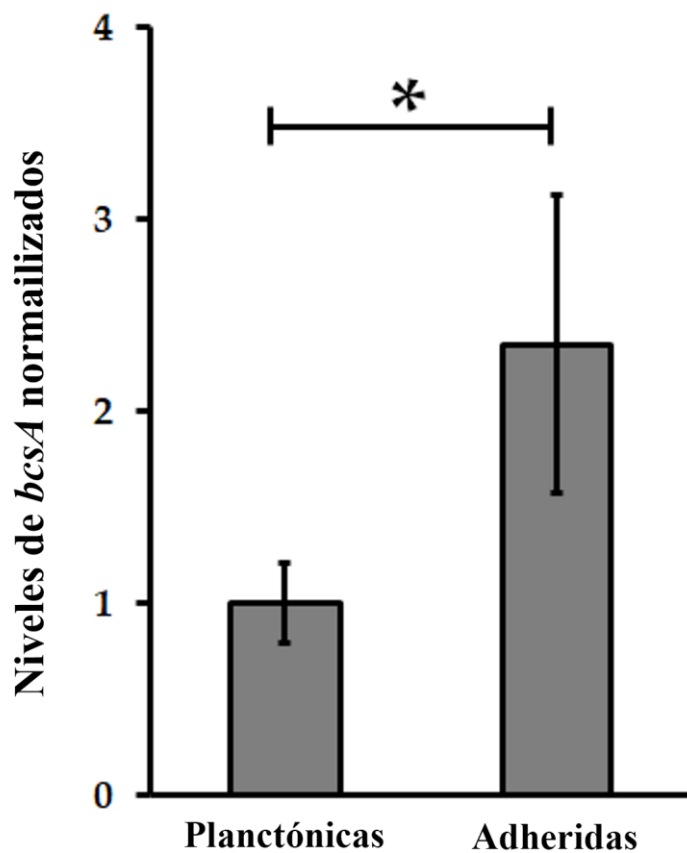


Figura A5. Niveles de expresión transcripcional del gen *bcsA* en *At. thiooxidans* ATCC 19377. Los niveles de mRNA del gen codificante para la subunidad catalítica BcsA del complejo Celulosa Sintasa fueron medidos por qPCR en células planctónicas y adheridas, y normalizados por los niveles de RNA de los genes *16S* y *map*. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) obtenidas por un test de Anova de una vía están marcadas (*).

Functional analysis of c-di-GMP pathway in biomining bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Mauricio Diaz* ^{1, a}, Sylvia Copaja ^{2, b}, Nicolas Guilliani ^{1, c}

¹Bacterial Communication Laboratory, Biology Department, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Organic and Environmental Chemistry Laboratory, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^amaujav2004@hotmail.com, ^bscopaja@uchile.cl, ^cnguilian@uchile.cl

Keywords: *Acidithiobacillus*, biofilm, c-di-GMP.

Abstract. Bioleaching is the solubilization of metals catalyzed by acidophilic microorganisms. Among these, the Gram negative γ -proteobacteria from the genus *Acidithiobacillus* play a relevant role. Biofilm formation has an impact on bioleaching performance. In *Acidithiobacillus* sp. the molecular mechanisms involved in biofilm formation are still unknown. However, in many Gram-negative and some Gram-positive bacteria, the intracellular levels of the second messenger cyclic diguanilic acid (c-di-GMP) control the regulation of biofilm formation. These levels depend on the balance between the enzymatic activities of diguanylate cyclases (synthesis) and phosphodiesterases (degradation). Previously, functional c-di-GMP pathways have been characterized in *At. ferrooxidans* and *At. caldus*. Here, our main goal was to characterize the presence of a functional c-di-GMP pathway in *At. thiooxidans*. By bioinformatic analysis, several putative-ORFs encoding DGCs, PDEs and effector proteins have been identified in the genome sequence of *At. thiooxidans* ATCC 19377. RT-PCR experiments revealed that most of these ORFs are transcribed. In addition, the analysis of nucleotide-enriched fraction extracted from *At. thiooxidans* cells showed that this bacterium is able to produce c-di-GMP. These results strongly indicate that *At. thiooxidans* has a functional c-di-GMP pathway.

Introduction

The Gram negatives γ -proteobacteria from the genus *Acidithiobacillus* play a relevant role in bioleaching processes [1]. The attachment to sulfide ore and subsequent biofilm formation is a key step in bioleaching processes because of the inferred necessity of close contact to minerals by microorganisms that obtain metabolic energy from constituents of solid mineral substrates [1, 2]. Unlike γ -proteobacteria like *Pseudomonas aeruginosa* [3] or *Escherichia coli* [4], the process and the molecular mechanisms that control biofilm formation are still unknown in *Acidithiobacillus* species. In many Gram-negative and some Gram-positive bacteria, the intracellular levels of the second messenger cyclic diguanilic acid (c-di-GMP) control the regulation of biofilm formation [5]. It is well accepted now that high intracellular levels of c-di-GMP repress motility and stimulate biofilm formation [5]. Previously, functional c-di-GMP pathways have been characterized in *At. ferrooxidans* and *At. caldus* [6, 7]. Here, we provide first evidence that *At. thiooxidans* also possesses a functional c-di-GMP pathway.

Methodology

Acidithiobacillus thiooxidans DSM 9463 cells were routinely grown at 30° C in mineral medium with elemental sulfur, thiosulfate or tetrathionate as substrate. For RNA and c-di-GMP extractions, cells in late exponential phase were harvested for 5 min at 8,000 rpm. RNAs were extracted with a modified hot phenol protocol [6] and treated with DNase. Purified RNAs were converted in cDNA

and analyzed by PCR. C-di-GMP was extracted from exponential growing cells by hot lysis and HClO₄ treatment [8]. C-di-GMP levels were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode array detector. Data were normalized against wet weight. The temperature was set at 30 ± 3 °C. The injection volume was 20 µl. The mobile phase consisted of two eluents: methanol (A) and a solution of 6 mM KH₂PO₄ pH 6.0 (B). Elution conditions were 5 minutes at 100 % B, 15 min linear gradient from 100 % B to 20 % A and 80 % B and finally 10 minutes with a gradient from 20 % A and 80 % B to 100 % B a constant flow of 0.4 ml / min. The calibration curve was performed with synthetic c-di-GMP in a range of 10 to 800 picomoles. All experiments were made in triplicate.

Results

A bioinformatic analysis of the genome of type strain ATCC 19377 of *At. thiooxidans* allowed the identification of several putative ORFs encoding proteins with probable DGC or PDE activity as well as putative c-di-GMP receptors [6]. The existence of this kind of protein strongly suggested that the bacterium *At. thiooxidans* should be able to synthesize c-di-GMP. Thus, an analysis of the nucleotide enriched fractions by HPLC was performed. A signal with a retention time and an absorption spectrum similar to synthetic c-di-GMP (Fig. 1) was characterized. The c-di-GMP identity of the signal was definitively confirmed by a co-elution of a sample with synthetic c-di-GMP (result not shown).

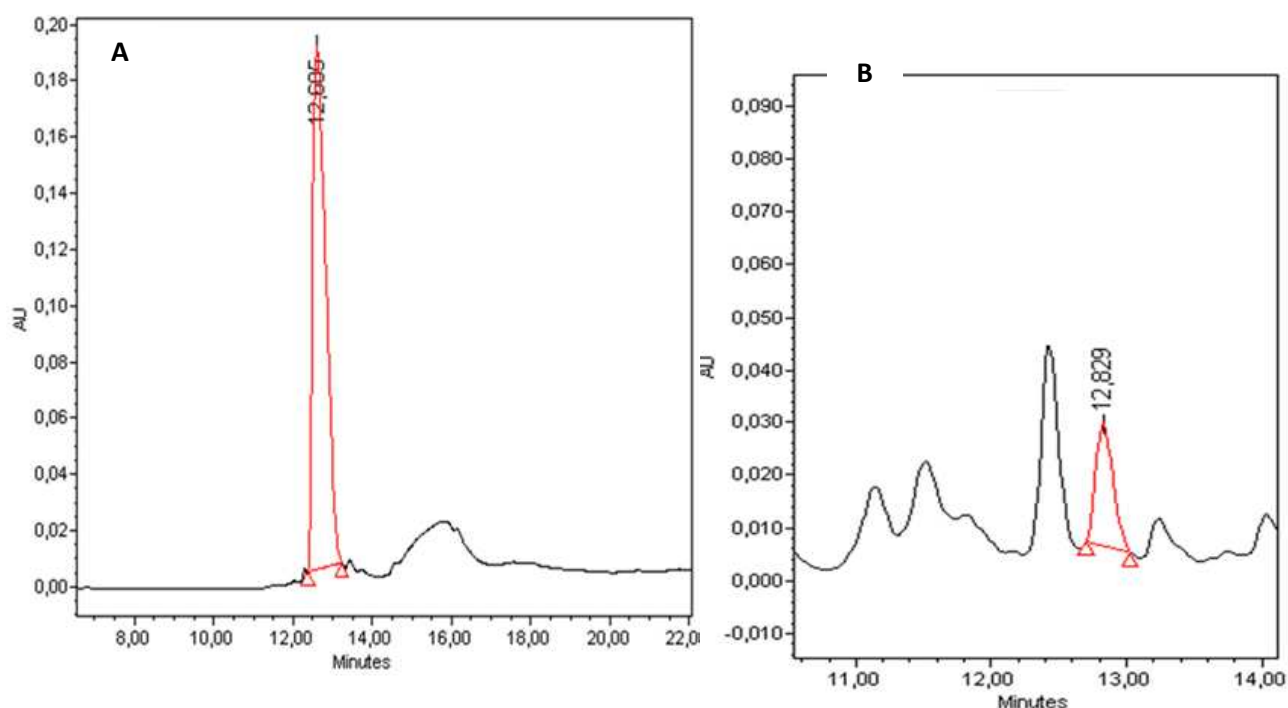


Figure 1. Chromatographic analysis of synthetic c-di-GMP (A) and a nucleotide enriched extract of *At. thiooxidans* cells grown in thiosulfate (B).

On the other hand, transcriptional analyses with RNA extracted from sulfur-grown cells were performed. The RT-PCR results showed that these putative ORFs were mainly transcribed (Table 1).

Table 1. Results of RT-PCR experiments.

Domains	Gene	PCR	Domains	Gene	PCR
GGDEF	AthiA1_03313	+	GGDEF/EAL	AthiA1_00152	+
	AthiA1_05539	+		AthiA1_00157	+
	AthiA1_07707	+		AthiA1_01972	-
	AthiA1_08189	+		AthiA1_01982	-
	AthiA1_08219	+		AthiA1_04113	+
	AthiA1_08224	+		AthiA1_06856	+
	AthiA1_09870	+		AthiA1_07018	+
	AthiA1_13201	+		AthiA1_08179	+
	AthiA1_15675	+		AthiA1_10484	+
EAL	AthiA1_08184	+		AthiA1_12969	+
	AthiA1_09875	+		AthiA1_14219	+
	AthiA1_12974	+		AthiA1_14626	-
HD-GYP	AthiA1_13196	-			

+, positive result; - negative results.

Conclusions

All these results together indicate that *At. thiooxidans* has a functional c-di-GMP pathway, as it occurs in other *Acidithiobacillus* species such as *At. ferrooxidans* and *At. caldus*. However, some differences between *Acidithiobacillus* species can be pointed out. *At. thiooxidans* and *At. ferrivorans* genomes harbor a gene encoding a protein with HD-GYP domain while this specific PDE domain is absent in *At. ferrooxidans* and *At. caldus* genomes. On the other hand, the number of genes involved in c-di-GMP metabolism is higher in *At. thiooxidans* compared to other *Acidithiobacillus* species. These differences strongly suggest that c-di-GMP pathway may regulate different phenotypes in the different *Acidithiobacillus* species.

Acknowledgments

This work was supported by FONDECYT project 1120295.

References

- [1] W. Sand, T. Gehrke, P. Jozsa and A. Schippers: Hydrometallurgy, Vol. 59 (2001), p. 159.
- [2] T. Gehrke, J. Telegdi, D. Thierry and W. Sand: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60 (1994), p. 2743.
- [3] M. Harmsen, L. Yang, S.J. Pamp and T. Tolker-Nielsen: FEMS Immunol. Med. Microbiol. Vol. 59 (2010), p. 253.
- [4] T.K. Wood: Environ. Microbiol. Vol. 11 (2009), p. 1.
- [5] U. Römling, M.Y. Galperin and M. Gomelsky: Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 77 (2013), p. 1.

- [6] M. Castro, L.M. Ruiz, A. Barriga, C.A. Jerez, D.S. Holmes and N. Guiliani: in 18^o International Biohydrometallurgy Symposium (IBS), Bariloche, Argentina, edited by Edgardo R. Donati, Marisa R. Viera, Eduardo L. Tavani, María A. Giaveno, Teresa L. Lavallo and Patricia A. Chiacchiarini (2009), p. 223.
- [7] L.M. Ruiz, M. Castro, A. Barriga, C.A. Jerez and N. Guiliani: *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 54 (2012), p. 133.
- [8] D. Antoniani, P. Bocci, A. Maciag, N. Raffaelli and P. Landini: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 85 (2010), p. 1095.

Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces

Sören Bellenberg^a, Mauricio Díaz^b, Nanni Noël^a, Wolfgang Sand^a, Ansgar Poetsch^c,
Nicolas Guiliani^{b,*}, Mario Vera^{a,*}

^a Universität Duisburg-Essen, Biofilm Centre, Universitätsstraße, 5, 45141 Essen, Germany

^b Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Las Palmeras, 3425 Santiago, Chile

^c Plant Biochemistry, Ruhr Universität Bochum, Universitätsstraße 150, 44801 Bochum, Germany

Received 22 April 2014; accepted 18 August 2014

Available online 27 August 2014

Abstract

Bioleaching of metal sulfides is an interfacial process where biofilm formation is considered to be important in the initial steps of this process. Among the factors regulating biofilm formation, molecular cell-to-cell communication such as quorum sensing is involved. A functional LuxIR-type I quorum sensing system is present in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. However, cell-to-cell communication among different species of acidophilic mineral-oxidizing bacteria has not been studied in detail. These aspects were the scope of this study with emphasis on the effects exerted by the external addition of mixtures of synthetic *N*-acyl-homoserine-lactones on pure and binary cultures. Results revealed that some mixtures had inhibitory effects on pyrite leaching. Some of them correlated with changes in biofilm formation patterns on pyrite coupons. We also provide evidence that *A. thiooxidans* and *Acidiferrobacter* spp. produce *N*-acyl-homoserine-lactones. In addition, the observation that *A. thiooxidans* cells attached more readily to pyrite pre-colonized by living iron-oxidizing acidophiles than to heat-inactivated or biofilm-free pyrite grains suggests that other interactions also occur. Our experiments show that pre-cultivation conditions influence *A. ferrooxidans* attachment to pre-colonized pyrite surfaces. The understanding of cell-to-cell communication may consequently be used to develop attempts to influence biomining/bioremediation processes.

© 2014 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Quorum sensing; *N*-Acyl-homoserine-lactone; Biofilm formation; Bioleaching; Pyrite

1. Introduction

Bioleaching is the dissolution of metal sulfides such as pyrite (FeS₂) and is driven by bacterial and archaeal oxidation of iron(II)-ions and sulfur compounds as well as biogenic metal chelating organic acids in extracellular polymeric substances (EPS). Coal, minerals and other geological deposits regularly contain metal sulfides such as pyrite or marcasite.

Their natural weathering and dissolution processes cause the formation of acid mine drainage (AMD), which is a serious environmental problem, especially in regions where mining takes place [1]. Bioleaching processes are used in biomining technologies for recovering metals such as copper, nickel or zinc. The term biooxidation is defined as the bacterial oxidation of gold or silver containing sulfide minerals, such as pyrite or arsenopyrite, in order to enrich them for their further chemical extraction [2,3].

Biofilms are communities of microorganisms embedded in a self-produced matrix of EPS, which mainly consist of polysaccharides, proteins, lipids and DNA [4]. Biofilm formation on metal sulfides is considered to be important for bioleaching since the attached microorganisms are the ones

* Corresponding authors.

E-mail addresses: soeren.bellenberg@uni-due.de (S. Bellenberg), maujav2004@hotmail.com (M. Díaz), nanninoel@aol.com (N. Noël), wolfgang.sand@uni-due.de (W. Sand), ansgar.poetsch@rub.de (A. Poetsch), nguilian@uchile.cl (N. Guiliani), mario.vera@uni-due.de (M. Vera).

which start the leaching process by providing an enlarged reaction space between the metal sulfide surface and the cells in which iron(III)-ions are accumulated [5]. In bacteria, biofilm formation and EPS production are complex processes which are, among other mechanisms, regulated by quorum sensing (QS) systems [6] and the second messenger c-di-GMP pathway [7]. QS allows bacterial cells to sense their population density and to modulate gene expression in a cell density-dependent manner due to the secretion of diffusible auto-inducers (AIs), which are used to regulate intra- or interspecies processes [8,9].

Acidithiobacillus ferrooxidans^T possesses a canonical type I QS system and produces several *N*-acyl-homoserine-lactone (AHL) AIs [10]. Moreover, the external addition of synthetic long-chain AHLs stimulates its biofilm formation on pyrite or sulfur surfaces [11]. This observation correlated with increased levels of EPS in biofilms formed on the surface of polycarbonate filters floating on medium amended with long-chain AHLs. Recently, a bioinformatic analysis using Hidden Markov Models predicted that at least 75 genes could be regulated by QS in *A. ferrooxidans*^T. Among these, some genes involved in the biosynthesis of exopolysaccharides, as well as genes encoding transport and RNA regulatory functions are included [12]. We have previously estimated differences among planktonic and pyrite-attached cell subpopulations after 24 h of biofilm formation by high-throughput proteomics. These accounted for around 16% of the total amount of detected proteins [13]. Functions such as glutathione metabolism, stress responses and EPS biosynthesis seem to be pivotal. As mentioned, biofilm formation and EPS production in many bacterial species is often controlled by the second messenger c-di-GMP. The *A. ferrooxidans*^T genome sequence encodes for several proteins involved in the c-di-GMP pathway and biochemical studies showed their functionality [14]. In addition, levels of this second messenger were found to be increased in cells grown on solid substrates such as sulfur prills or pyrite, strongly suggesting its involvement in *A. ferrooxidans* biofilm formation.

Several studies have addressed the biodiversity and changes in the species composition of microbial communities present in bioleaching environments [15–17]. However, cell interactions and communication between different acidophilic mineral-oxidizing species coexisting in biofilms on metal sulfides are largely unknown. It is well known that sulfur-grown *A. ferrooxidans* cells do not attach well to pyrite compared to iron-grown cells. This has been explained due to modifications of their EPS composition [18]. Still it is unknown whether the presence of primary colonizers is required for attachment of sulfur-oxidizing strains. It has been shown that several biofilms from different ecological habitats undergo a succession of colonizers in which the first ones produce EPS which may drive attachment of further species [19,20]. In addition, there are few studies on the presence of antagonistic or synergistic interactions between certain species [21] and whether these may be influenced by QS or other cell-to-cell communication mechanisms is still unknown.

In order to address these points the influence of the external addition of defined mixtures of AHLs to pyrite leaching assays in pure and binary mixed cultures was tested with several acidophilic mineral-oxidizing bacterial species. Biofilm formation of these strains on pyrite coupons was investigated by epifluorescence microscopy (EFM).

2. Material and methods

2.1. Strains and media

A. ferrooxidans ATCC 23270^T, *A. ferrivorans* SS3 [22], *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 [23], *Acidiferrobacter thiooxydans* DSM 2392^T and *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2391 [24] were cultivated in Mackintosh (MAC) basal salt solution [25] at pH 1.8 with 3 g/l iron(II)-ions or 2–5% pyrite as energy sources. *A. thiooxydans* DSM 14887^T was grown in a modified MAC basal salt solution at pH 4.5 and 1 g/l elemental sulfur (S⁰) powder. For pre-colonization experiments, *A. ferrooxidans*^T was grown on DSMZ 71 medium (pH 4.5) amended with 5 g/l sodium thiosulfate pentahydrate as described [26].

2.2. Biofilm formation experiments on pyrite and sulfur coupons

Sulfur coupons were produced by melting S⁰ and pouring the liquid onto a cover-glass to solidify. Seven coupons were placed in 100-ml wide-neck Erlenmeyer flasks containing 30 ml of MAC medium (pH 4.5) and sterilized by autoclaving at 110 °C for 90 min. Flasks were inoculated with 10⁸ cells/ml. AHLs were used at 5 µM. Coupons were withdrawn for microscopic observation. They were washed once with MAC medium (pH 4.5), once with 50 mM Tris–HCl pH 7.4 and twice with double distilled water. Staining of pyrite-attached cells was done with 0.01% 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in 2% formaldehyde for 20 min followed by washing the coupons twice with sterile double distilled water and drying at room temperature for visualization with an epifluorescence microscope (Axiovert-100 MBP microscope, Zeiss®). The microscope was operated with the software AxioVision 4.2 (Zeiss®). In order to prolong the fluorescence of the dye, an anti-fading agent (Citifluor™ AF2) was used when mounting the coupons. Pyrite coupons were prepared as described [11].

2.3. Pyrite dissolution assays

Pure and binary mixed pyrite cultures were prepared in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml MAC medium (pH 1.8), 5% (w/v) pyrite grains (Romania, Baia Mare; 50–100 µm) and an initial cell number of 2.5 × 10⁸ iron-grown cells/ml. Pyrite was washed and sterilized prior use as described [27]. Binary mixed cultures were prepared using equal initial cell numbers of each species. To determine leaching efficiency, iron-ion concentrations were quantified by using the phenanthroline method [28]. Synthetic AHLs were

acquired from the University of Nottingham (<http://www.nottingham.ac.uk/quorum/>) or Sigma[®]. AHLs with an acyl chain length of 8, 12 and 14 carbon atoms were added before inoculation as mixtures including the unsubstituted, the 3-oxo- and the 3-hydroxy-AHL (5 μ M each). A mixture of the unsubstituted C16- and C18-AHLs was also tested. These AHL-mixtures (AHLm) are hereinafter referred to as C8-, C12-, C14- and C16/18-AHLm. Control assays were done with addition of DMSO, the solvent of AHL stock solutions.

2.4. Pre-colonization experiments

Pyrite grains (50–100 μ m) were incubated at 2% (w/v) with 10^8 cells/ml of iron-grown *A. ferrooxidans*^T or *L. ferrooxidans* DSM 2391 in 50 ml MAC medium for 18 h. Afterwards, culture supernatants were discarded and the pyrite (with attached cells) was washed three times with 50 ml MAC medium (pH 2.5). To elucidate if live biofilm-forming cells may influence further pyrite colonization one set of pre-colonized pyrite grains were incubated at 80 °C for 2 h. After washing, 10^8 sulfur-grown *A. thiooxidans*^T cells/ml were added to all flasks and attachment tests were performed as described [29]. Similarly, this experimental setup was applied to study the influence of the energy source used for growth of *A. ferrooxidans*^T on cell attachment to pyrite pre-colonized by *L. ferrooxidans* DSM 2391. For this, 10^8 thiosulfate- or iron-grown cells/ml were added to pre-colonized pyrite flasks as described above. In order to compare cell attachment to cell-free pyrite surfaces, control experiments without pre-colonization were included.

2.5. AHL extraction and identification by mass spectrometry

AHL extraction was carried out using dichloromethane (DCM; p.a). 500-ml cultures of *A. thiooxydans*^T, *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3, *A. ferrivorans* SS3 and *L. ferrooxidans* DSM 2391 grown on pyrite or iron(II)-ions and *A. thiooxidans*^T cultures grown on sulfur were transferred to beakers, including their planktonic cells and biofilms on pyrite or sulfur, respectively. One volume of DCM was added and the mixture was stirred at 300 rpm for 30 min at room

temperature. After phase separation, the organic phase was transferred to a glass balloon and rota evaporated at 40 °C and 750 mbar until the volume was reduced to approximately 3 ml. The concentrated organic phase was transferred to a 4 ml glass ampoule, in which further evaporation of the organic phase was done using nitrogen gas stream. Remaining compounds in the glass balloon were recovered by washing it with 2 ml DCM. After complete evaporation of the solvent, extracts were stored at –20 °C. All glass material was previously washed with DCM.

For mass spectrometry analysis, the extracts were resuspended in acetonitrile (p.a) containing 0.1% HCOOH (LC-MS grade) and incubated for 20 min at 30 °C with repeated mixing. A tenfold dilution prepared with water:acetonitrile (80:20) containing 0.1% HCOOH was injected with a syringe pump into the electrospray ionization (ESI) ion source (Ion Max, Thermo) of the mass spectrometer (LTQ XL Orbitrap with ETD) at a flow rate of 10 μ l/min. Instrument settings were as follows: positive ionization mode; source voltage 4.5 kV; capillary voltage 11 V; capillary temperature 270 °C; tube lens 60 V; sheath gas pressure 5 au (arbitrary units), ion sweep gas pressure 0 au, auxiliary gas pressure 0 au; normalized collision energy for CID:20, isolation width 2.5 Da, activation Q 0.25, activation time 30 ms. Scan cycles were as follows: full scans were done in the orbitrap in the range of 100–600 m/z, resolution 100,000, CID, ion target value 1,000,000. The 10 most intense precursor ions were subjected to CID in the LTQ and fragment ions transferred to the orbitrap for mass analysis with target value 30,000 ions, max inject time 1 s, dynamic exclusion 300 s, mass resolution of 7500. Xcalibur software version 2.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used for data analysis.

3. Results

3.1. Effect of AHL mixtures on pyrite leaching by pure and binary cultures

The effects of addition of AHL-mixtures to pure cultures of mineral-oxidizing bacteria growing on pyrite are shown in Fig. 1. Pyrite leaching was expressed as the total amount of iron-ions solubilized within 28 days after inoculation. Under

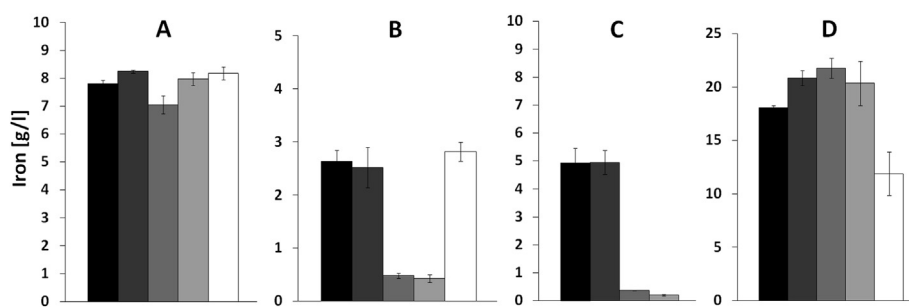


Fig. 1. Influence of AHL-mixture addition on pyrite dissolution in pure cultures. Pyrite leaching assays in pure cultures of *A. ferrooxidans*^T (A), *A. ferrivorans* SS3 (B), *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 (C) and *L. ferrooxidans* DSM 2391 (D) were incubated at 28 °C with 120 rpm shaking. Total iron concentrations were determined after 28 days of incubation. Mean values from duplicate assays are shown. Black bars correspond to control experiments without addition of AHLs. Colors from left to right correspond to cultures amended with C8-, C12-, C14- and C16/18-AHLm, respectively.

our conditions, the best leaching efficiency was achieved by *L. ferrooxidans* DSM 2391 (18 g/l), followed by *A. ferrooxidans*^T (7.9 g/l), *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 (4.9 g/l) and *A. ferrivorans* SS3 (2.6 g/l Fe). These values were in agreement with the described physiological characteristics of these strains [30]. In *A. ferrooxidans*^T slight enhancing effects, accounting for less than 6% on pyrite leaching, were measured after addition of C8-, C14- and C16/18-AHLm, while the addition of the C12-AHLm resulted in a decreased pyrite dissolution of 10%. It was also evident that some AHLm caused inhibitory effects in *A. ferrivorans* SS3. In this strain pyrite leaching was decreased by 72 and 74% after addition of C12- and C14-AHLm, respectively. Interestingly, these two mixtures caused also the highest decrease in pyrite leaching by *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 (92 and 96%, respectively). In contrast, the addition of C8-, C12- or C14-AHLm to cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391 resulted in leaching enhancements of 14, 17 or 12% respectively. In this species, a decrease of leaching by 34% was measured after addition of the C16/18-AHLm.

As previously shown, the addition of C12- or C14-AHLm resulted in an increased biofilm formation of *A. ferrooxidans*^T on pyrite coupons [11]. In this context it is interesting to remark that the observed enhancement of biofilm formation after addition of these AHLm did not correlate with enhanced pyrite dissolution (Fig. 1A). In contrast, in *A. ferrivorans* SS3 the addition of the C12-AHLm resulted in a very strong inhibition of biofilm formation after 8 days (Fig. 2B), while the addition of C14-AHLm resulted in an enhanced formation of cell aggregates, which presumably were less active, as judged by the leaching values shown in Fig. 1B. In this case the

decrease of biofilm formation correlated well with the lowered leaching efficiency observed.

Similar experiments carried out with *L. ferrooxidans* DSM 2391 and *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 are shown in Fig. 3. The addition of C14-AHLm resulted in an enhanced biofilm formation of *L. ferrooxidans* DSM 2391 after 8 days, while the addition of C8- and C12-AHLm resulted in cell cluster formation. In *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 the addition of C8-AHLm showed increased pyrite colonization after 24 h compared to the control. In comparison to the results obtained with *A. ferrivorans* SS3 (Fig. 2B), in which an almost complete inhibition of pyrite colonization was observed in presence of C12-AHLm, pyrite coupons incubated with *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 in medium amended with C12- or C14-AHLm showed a presence of attached cells. Presumably, these cells were inhibited by the addition of C12- or C14-AHLm since pyrite dissolution was decreased in presence of these AHLs (Fig. 1C).

Leaching efficiencies in binary cultures containing *A. ferrooxidans*^T and *A. ferrivorans* SS3, *L. ferrooxidans* DSM 2391 or *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 were comparable to those observed in pure cultures of *A. ferrooxidans*^T (7–8 g/l iron after 28 days), as shown in Supplementary Fig. S1. In this context, it seems possible that due to yet unknown mechanisms, *A. ferrooxidans*^T cells could mask the effects of the external addition of AHLs.

Fig. 4 shows the effects of AHLm addition to binary cultures that did not contain *A. ferrooxidans*^T. Especially interesting was the mutualistic inhibition observed between cells of *L. ferrooxidans* DSM 2391 and *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 after transfer to cultures with pyrite as energy source

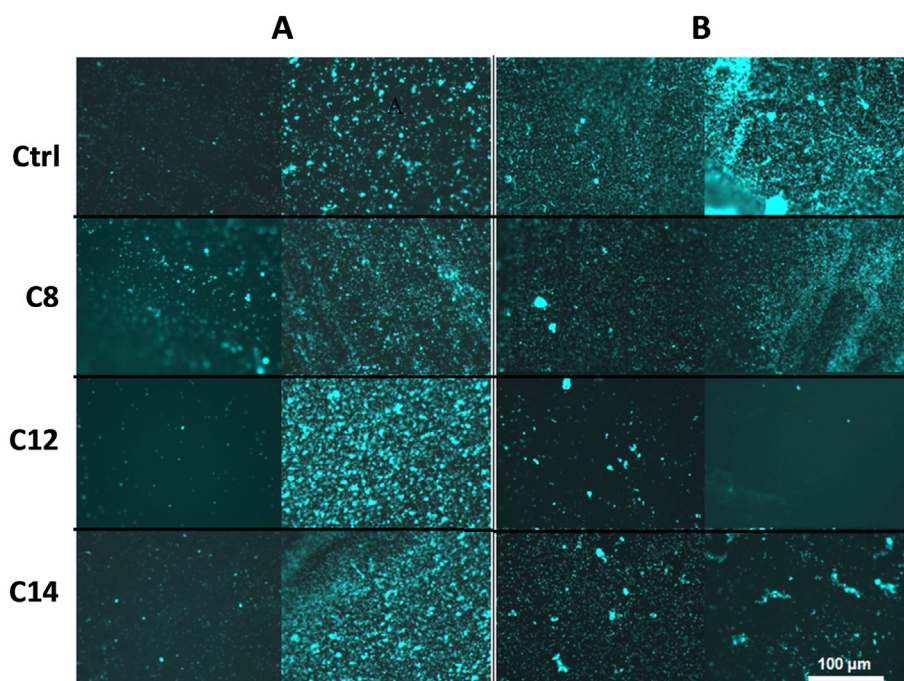


Fig. 2. Influence of AHL-mixture addition on attachment and biofilm formation on pyrite coupons in pure cultures of *A. ferrooxidans*^T (A) and *A. ferrivorans* SS3 (B). Coupons were imaged after 1 (left) and 8 (right) days. Size bar represent 100 µm.

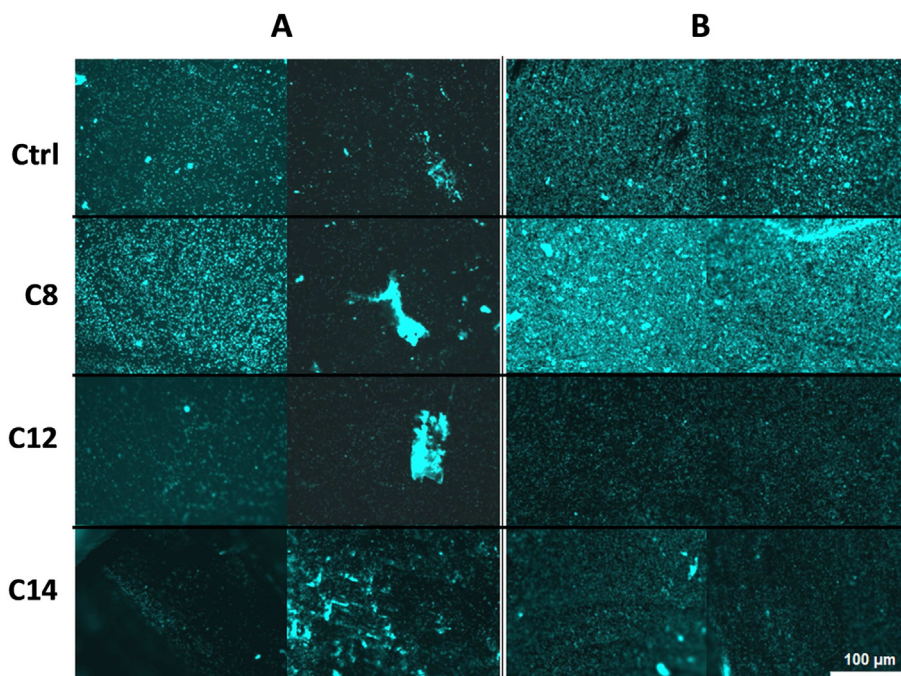


Fig. 3. Influence of AHL–mixture addition on attachment and biofilm formation on pyrite coupons in pure cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391 (A) *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 (B). Coupons were imaged after 1 (left) and 8 (right) days. Size-bar represents 100 µm.

(Fig. 4A). In control experiments without addition of AHLs, pyrite leaching was inhibited by 95% compared to the iron concentrations observed in pure cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391 (Fig. 1D) or by 20% compared to those in pure cultures of *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3. This leaching inhibition was reduced after addition of C8-, C14- or C16/18-AHLM to 16, 39 or 35% of the values observed in pure cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391 without AHL addition, respectively. In contrast, when *L. ferrooxidans* DSM 2391 was co-cultured with *A. ferrivorans* SS3, no clear effect of AHLM addition was observed (Fig. 4B). Pyrite leaching values by these mixed cultures did not differ by more than 10% compared to the values achieved for pure cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391. In case of the mixture *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3/A.

ferrivorans SS3, pyrite leaching values were similar to those observed for pure cultures of *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3. As expected from the values observed in pure cultures of both species, the addition of C12-AHLM inhibited pyrite leaching by this binary culture. However, the inhibition upon addition of C14-AHLM observed for pure cultures of *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 did not occur in the mixed cultures.

3.2. Presence of AHLs in cultures of mesophilic, mineral-oxidizing acidophiles

It has been shown previously that *A. ferrooxidans*^T produces long-chain AHLs [10,11]. Communication phenomena mediated by AHLs in acidophilic bacteria may not be

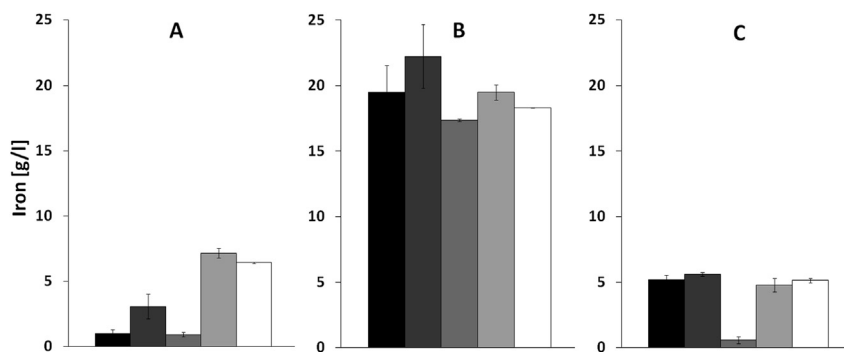


Fig. 4. Influence of AHL–mixture addition on pyrite dissolution in mixed cultures without the presence of *A. ferrooxidans*^T. Pyrite leaching assays in binary mixed cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391/*Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 (A), *L. ferrooxidans* DSM 2391/*A. ferrivorans* SS3 (B) and *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3/*At. ferrivorans* SS3 (C) were incubated at 28 °C with 120 rpm shaking. Total iron concentrations were determined after 28 days of incubation. Mean values from duplicate assays are shown. Black bars correspond to control experiments without addition of AHLs. Colors from left to right correspond to cultures amended with C8-, C12-, C14- and C16/18-AHLM, respectively.

Table 1
AHLs detected by mass spectrometry in cultures of mesophilic leaching bacteria.

N-acyl-homoserine-lactone	C10	C12	3-OH-C12	C14	3-OH-C14	C16
Calculated monoisotopic m/z [M+H] ⁺	256.19072	284.22202	300.21693	312.25332	328.24824	340.28462
Measured m/z [M+H] ⁺	256.19113	284.22229	300.21713	312.25327	328.24817	340.28464
Error (ppm)	+1.6	+0.9	+0.7	−0.2	−0.2	+0.1
<i>A. thiooxidans</i> ^T	+	+	ND	ND	ND	ND
<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> ^T	+	+	+	+	+	+
<i>Acidiferrobacter</i> sp. SPIII/3	+	+	+	+	+	+
<i>L. ferrooxidans</i> DSM 2391	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>A. ferrivorans</i> SS3	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, Not detected.

restricted to iron-oxidizers. By thin layer chromatography and biosensor assays (TLC-BA) using *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 [31] it was also shown that three *A. thiooxidans* strains (DSMZ 504, DSMZ 9463 and DSMZ 11478) produce short-chain AHLs which could correspond to 3-oxo-C8-AHL. In order to better understand if communication between different species which presumably coexist in leaching habitats occurs, we analyzed the presence of AHLs by mass spectrometry in cultures of *A. thiooxidans*^T, *A. thiooxydans*^T, *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3, *L. ferrooxidans* DSM 2391 and *A. ferrivorans* SS3 (Table 1). Interestingly, as described for *A. ferrooxidans*^T [32], both *Acidiferrobacter* species produced a great diversity of AHLs: C10-AHL, C12-AHL, 3-hydroxy-C12-AHL, C14-AHL, 3-hydroxy-C14-AHL and C16-AHL. These compounds were detected in pyrite cultures but not in iron-grown cultures of both strains. In sulfur-grown cultures of *A. thiooxidans*^T C10- and C12-AHLs were detected, whereas AHLs were not detected in iron- nor in pyrite-grown pure cultures of *L. ferrooxidans* DSM 2391 or *A. ferrivorans* SS3.

3.3. C8- and C10-AHLs increase attachment to sulfur coupons by *A. thiooxidans*^T cells

In order to expand our knowledge about QS communication, experiments with the sulfur-oxidizer *A. thiooxidans*^T were carried out. Cultures were incubated with single AHLs on sulfur coupons. As shown in Fig. 5, the addition of C8-AHL, 3-oxo-C8-AHL and C10-AHL increased *A. thiooxidans*^T attachment to

sulfur coupons. Biofilm morphologies were different after addition of 3-oxo-C8-AHL, where the formation of micro-colonies was observed on the sulfur surfaces, while this phenotype was not observed after addition of C8-AHL or C10-AHL, which only promoted an increased cell attachment (Fig. 5).

3.4. Influence of a pre-colonization by iron-oxidizers on *A. thiooxidans*^T attachment to pyrite

It has been shown that *A. ferrooxidans*^T cells previously grown on sulfur do not attach well to pyrite compared to iron- or pyrite-grown cells. This has been attributed to a considerable modification in their EPS composition, including increased amounts of fatty acids, absence of complexed iron(III)-ions and glucuronic acid as well as changes in the sugar monomer composition [18]. To ascertain whether *A. thiooxidans*^T required pre-colonization of pyrite by iron-oxidizing acidophiles to enable them to attach to the mineral, *A. thiooxidans*^T was grown on sulfur and added to cultures containing pyrite grains, which were pre-colonized for 18 h with *A. ferrooxidans*^T or *L. ferrooxidans* DSM 2391 cells. Within this time 50 or 80% of these initial inocula of *A. ferrooxidans*^T or *L. ferrooxidans* DSM 2391 attached to the pyrite, respectively (not shown). After removal of planktonic cells and heat-inactivation of one set of samples per condition, sulfur-grown *A. thiooxidans*^T cells were added. As shown in Fig. 6, *A. thiooxidans*^T cells attached to pyrite only when it

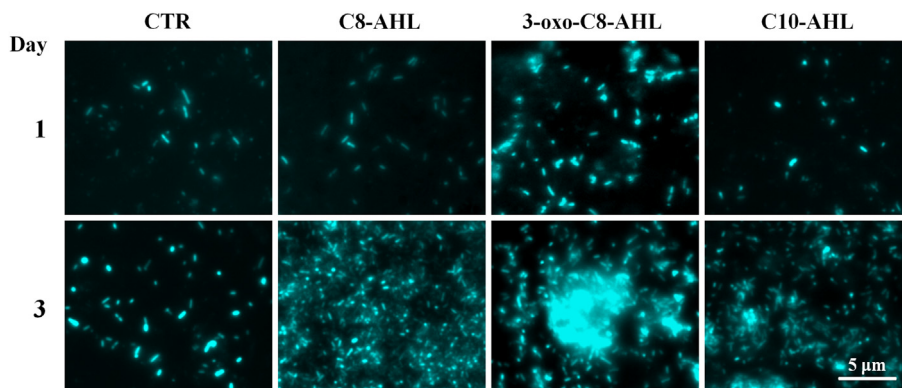


Fig. 5. Effect of the addition of selected AHLs on *A. thiooxidans*^T biofilm formation on sulfur coupons. Cultures were incubated at 28 °C and 120 rpm. Size-bar represents 5 μm.

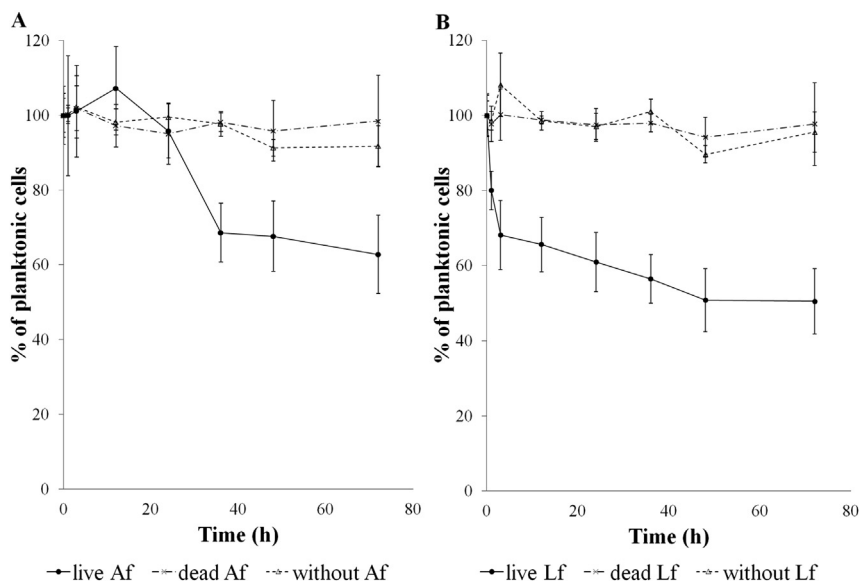


Fig. 6. The presence of active biofilms of iron-oxidizers increase *A. thiooxidans*^T attachment to pyrite. Pyrite grains (50–100 μm) were pre-colonized for 18 h with 10⁸ *A. ferrooxidans*^T (A) or *L. ferrooxidans* DSM 2391 (B) cells. After removal of the planktonic cell subpopulation, further cell attachment of *A. thiooxidans*^T was assayed by adding 10⁸ cells/ml to active biofilms (circles), heat-inactivated biofilms (X) or pyrite grains without pre-colonization (triangles). Mean values from duplicates are shown.

was pre-colonized with active biofilms of *A. ferrooxidans*^T or *L. ferrooxidans* DSM 2391. Interestingly, *A. thiooxidans*^T attachment to pyrite pre-colonized with *L. ferrooxidans* DSM 2391 was faster than to pyrite pre-colonized with *A. ferrooxidans*^T. In the first case, 30% of the cells attached within 3 h, while in the latter case similar attachment values were observed after 25–35 h. The reasons for this phenomenon are unknown. Heat-inactivation did not significantly remove attached cells or their EPS from the pyrite surface (not shown).

3.5. Influence of pyrite pre-colonization by *L. ferrooxidans* DSM 2391 on *A. ferrooxidans*^T attachment to pyrite

In a similar way the influence of an active biofilm of *L. ferrooxidans* DSM 2391 on pyrite colonization and biofilm formation by *A. ferrooxidans*^T was tested (Fig. 7). As *A. ferrooxidans*^T is able to oxidize iron(II)-ions and reduced sulfur compounds, its growth condition was included as a new variable. The presence of an active *L. ferrooxidans* DSM 2391 biofilm enhanced attachment to pyrite by *A. ferrooxidans*^T for thiosulfate-grown cells from 50% to 70%. No enhancement of cell attachment was observed with heat-inactivated biofilms (Fig. 7A). Interestingly, with iron-grown *A. ferrooxidans*^T cells no significant differences were observed for attachment to pyrite pre-colonized with living or heat-inactivated *L. ferrooxidans* DSM 2391 biofilms (Fig. 7B).

4. Discussion

Results from the current work have shown that the addition of some AHL signalling molecules affect the cell attachment, pyrite leaching and biofilm formation by different species of

acidophilic bacteria. A BLAST search in NCBI database revealed the presence of homologous genes encoding for LuxR-like proteins in *A. ferrivorans* SS3 (Acife_1471, 56% identity) and *L. ferrooxidans* C2-3 (LFE_1606, 29% identity). Under our experimental conditions AHLs were not detected in *L. ferrooxidans* DSM 2391 or in *A. ferrivorans* SS3 cultures, however the presence of LuxR-like receptors may explain the inhibitory effects observed after addition of some AHL-mixtures.

Previously, three *A. thiooxidans* strains (DSM 504, DSM 9463 and DSM 11478) were characterized by TLC-BA to produce 3-oxo-C8-AHL [31]. In this study we show by mass spectrometry that *A. thiooxidans*^T produces C10- and C12-AHLs. Furthermore this strain is able to sense AHLs, since the addition of C8-, 3-oxo-C8- or C10-AHL resulted in an enhanced biofilm formation on sulfur coupons (Fig. 5). A BLAST search in the NCBI database revealed that the genome of *A. thiooxidans*^T does not possess homologous genes to *luxI/R* [33]. This suggests the presence of alternative pathways involved in AHL biosynthesis and sensing in this bacterium, which may also be present in other acidithiobacilli.

On one hand, the addition of long-chain AHLs to cultures of *A. ferrooxidans*^T resulted in an enhanced biofilm formation. However, under these experimental conditions, pyrite leaching was not significantly enhanced. On the other hand, the addition of C12- and C14-AHLm to pure cultures of *A. ferrivorans* SS3 and *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 resulted in a significant decrease in leaching efficiency (Figs. 2B and 3B), which must be directly correlated with a decreased pyrite colonization (Fig. 1). Both results indicate that a correlation between mineral colonization and leaching efficiency is species-dependent. In addition, no significant effect of synthetic AHLs on leaching efficiency was observed for mixed cultures with *A. ferrooxidans*^T (Supplementary Fig. S1). In

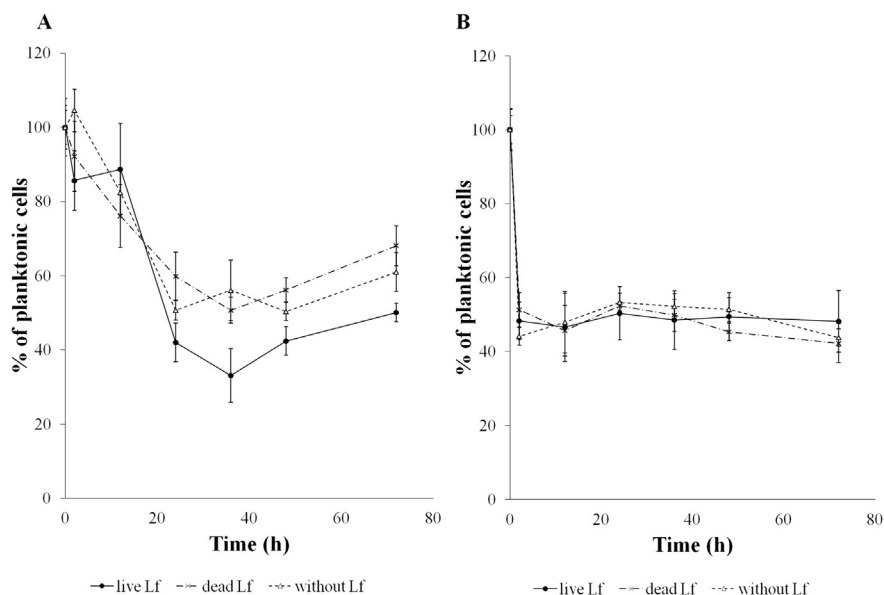


Fig. 7. Pre-cultivation conditions of *A. ferrooxidans*^T influence its attachment to pyrite pre-colonized by active *L. ferrooxidans* DSM 2391 biofilms. Pyrite grains (50–100 μm) were pre-colonized for 18 h with 10⁸ cells/ml of *L. ferrooxidans* DSM 2391. After removal of the planktonic cell subpopulation, further cell attachment of *A. ferrooxidans*^T grown on thiosulfate (A) or iron(II)-ions (B) was assayed by adding 10⁸ cells/ml to active biofilms (circles), heat-inactivated biofilms (X) or pyrite grains without pre-colonization (triangles). Mean values from duplicates are shown.

this way, the presence of more abundant but less active or dormant biofilms could be related to a “bioshrouding” effect that impairs colonization and pyrite leaching by other strains [34]. *A. thiooxydans*^T and *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 produced an identical pattern of AHLs. An incomplete draft genome sequence from the latter strain revealed the presence of a QS system consisting of homologous genes to *lasI* and *luxR* (unpublished data). Interestingly, the observed intrinsic inhibitory interaction in pyrite cultures between *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3 and *L. ferrooxidans* DSM 2391 was partially relieved by addition of some AHLs. Taken together, these results suggest that AHLs excreted by *A. ferrooxidans*^T or *Acidiferrobacter* spp. may play an important role in their competition with other iron-oxidizers.

We have also shown that pre-colonization of pyrite with active biofilms may influence further cell attachment by other species. The presence of iron-oxidizers may be a relevant factor for sulfur-oxidizers in order to attach more efficiently to pyrite. We provide evidence that attachment of *A. thiooxydans*^T cells is related to the presence of active biofilms and not merely an indirect consequence of cell interactions with the EPS from inactivated iron-oxidizers. As *L. ferrooxidans* DSM 2391 leach pyrite more efficiently than *A. ferrooxidans*^T, probably the faster attachment by cells of *A. thiooxydans*^T to pyrite with previously established biofilms of the former strain may be related to an increased chemotaxis towards reduced inorganic sulfur compounds like thiosulfate which arise on the pyrite surface once leaching takes place. Analysis of the complete *A. thiooxydans*^T genome sequence revealed a complete repertoire of genes for flagella formation and chemotaxis [35]. In contrast, *A.*

ferrooxidans^T attachment to pyrite grains pre-colonized with *L. ferrooxidans* DSM 2391 cells was strongly dependent on its pre-cultivation substrate (Fig. 7). At the moment we cannot prove direct cell interactions between established biofilm cells and new colonizers on the pyrite surface. Currently we are working on testing different fluorescent lectins on biofilms of mineral-oxidizing acidophilic bacterial species that may allow for the identification and direct visualization of mixed species biofilms by fluorescence lectin-binding assays (FLBA) in a non-invasive way [36].

Our results clearly show that cell-to-cell communication mechanisms and biofilm formation processes are interrelated and can determine bioleaching efficiency in laboratory cultures to a great extent. Both processes must be better understood in order to improve the industrial application of bioleaching and to develop countermeasures against AMD.

Conflict of interest

We confirm that there are no conflict of interests for us to declare.

Acknowledgments

The authors want to acknowledge the CONICYT-DAAD “ALECHILE” International Collaboration Grant numbers 55260560 (DAAD)/2011-672 (CONICYT) and Fondecyt Regular 1120295. M. Díaz was supported by scholarship 21120064 from CONICYT. We also greatly acknowledge Raquel Quatrini and David Holmes (Fundacion Ciencia y Vida) for providing access to the draft genome sequence of *Acidiferrobacter* sp. SPIII/3.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.006>.

References

- [1] Sand W, Jozsa PG, Kovacs ZM, Sasaran N, Schippers A. Long-term evaluation of acid rock drainage mitigation measures in large lysimeters. *J Geochem Explor* 2007;92:205–11.
- [2] Vera M, Schippers A, Sand W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:7529–41.
- [3] Brierley CL, Brierley JA. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:7543–52.
- [4] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33.
- [5] Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;63:239–48.
- [6] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 2009;43:197–222.
- [7] Romling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013;77:1–52.
- [8] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006;311:1113–6.
- [9] Boyer M, Wisniewski-Dye F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;70:1–19.
- [10] Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA, Guiliani N. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:7033–40.
- [11] Gonzalez A, Bellenberg S, Mamani S, Ruiz L, Echeverria A, Souler L, et al. AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:3729–37.
- [12] Banderas A, Guiliani N. Bioinformatic prediction of gene functions regulated by quorum sensing in the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int J Mol Sci* 2013;14:16901–16.
- [13] Vera M, Krok B, Bellenberg S, Sand W, Poetsch A. Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics* 2013;13:1133–44.
- [14] Ruiz LM, Castro M, Barriga A, Jerez CA, Guiliani N. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Lett Appl Microbiol* 2011;54:133–9.
- [15] Remonsellez F, Galleguillos F, Moreno-Paz M, Parro V, Acosta M, Demergasso C. Dynamic of active microorganisms inhabiting a bioleaching industrial heap of low-grade copper sulfide ore monitored by real-time PCR and oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray. *Microb Biotechnol* 2009;2:613–24.
- [16] Schippers A, Hallmann R, Wentzien S, Sand W. Microbial diversity in uranium mine waste heaps. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2930–5.
- [17] Wilmes P, Remis JP, Hwang M, Auer M, Thelen MP, Banfield JF. Natural acidophilic biofilm communities reflect distinct organismal and functional organization. *ISME J* 2009;3:266–70.
- [18] Gehrke T, Telegdi J, Thierry D, Sand W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2743–7.
- [19] Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D. *Rhodobacteraceae* are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;85:348–57.
- [20] Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, et al. Cell wall-anchored nuclease of streptococcus sanguinis contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One* 2014;9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103125>.
- [21] Okibe N, Johnson DB. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. *Biotechnol Bioeng* 2004;87:574–83.
- [22] Kupka D, Rzhapishevska OI, Dopson M, Lindstrom EB, Karnachuk OV, Tuovinen OH. Bacterial oxidation of ferrous iron at low temperatures. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:1470–8.
- [23] Mitchell D, Harnett K, Meyer G, Sand W, Stackebrandt E. Systematic analysis of our culture collection for “genospecies” of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. In: Tsezos M, Hatzikoseyan A, Remoundaki E, editors. *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution*. Greece: National Technical University of Athens; 2004. p. 1369–78. Part II.
- [24] Lane DJ, Harrison Jr AP, Stahl D, Pace B, Giovannoni SJ, Olsen GJ, et al. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J Bacteriol* 1992;174:269–78.
- [25] Mackintosh M. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Gen Microbiol* 1978;105:215–8.
- [26] Vera M, Pagliai F, Guiliani N, Jerez CA. The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by expressing a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:1829–35.
- [27] Schippers A, Jozsa P, Sand W. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3424–31.
- [28] Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Kationen (Gruppe E), Teil 1 Bestimmung von Eisen (E1). Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normierung; 1989. e.V: 22. Lieferung.
- [29] Harnett K, Göksel A, Kock D, Klock JH, Gehrke T, Sand W. Adhesion to metal sulphide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 2006;83:245–54.
- [30] Hedrich S, Schlömann M, Johnson DB. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* 2011;157:1551–64.
- [31] Ruiz LM, Valenzuela S, Castro M, Gonzalez A, Frezza M, Souler L, et al. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 2008;94:133–7.
- [32] Valenzuela S, Banderas A, Jerez CA, Guiliani N. Cell-cell communication in bacteria. A promising new approach to improve bioleaching efficiency? In: Donati ER, Sand W, editors. *Microbial processing of metal sulfides*. Dordrecht, Netherlands: Springer; 2007. p. 253–64.
- [33] Valdes J, Pedroso I, Quatrini R, Holmes DS. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 2008;94:180–4.
- [34] Johnson DB, Yajie L, Okibe N. “Bioshrouding”: a novel approach for securing reactive mineral tailings. *Biotechnol Lett* 2008;30:445–9.
- [35] Valdes J, Ossandon F, Quatrini R, Dopson M, Holmes DS. Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *J Bacteriol* 2011;193:7003–4.
- [36] Neu TR, Lawrence JR. Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2014. http://dx.doi.org/10.1007/10_2014_272.

Molecular Regulatory Network Involved in Biofilm Structure Development by *Acidithiobacillus thiooxidans* Includes Pel Exopolysaccharide Machinery

Mauricio Diaz^a and Nicolas Guilliani^b

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile.

^amaujav2004@hotmail.com, ^bnguilian@uchile.cl

Keywords: *Acidithiobacillus*; Biofilm; C-di-GMP; pathway; Exopolysaccharide Pel; Extremophiles.

Abstract. The *Acidithiobacillus* genus plays a relevant role in bioleaching. The molecular understanding of biofilm formation has been pointed out to design biological strategies to improve the efficiency of this industrial process and to prevent environmental damages caused by acid mine/rock drainages. In *Acidithiobacillus* spp., the molecular mechanisms involved in biofilm formation are currently emerging. The second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) appears as a key player for biofilm formation by *Acidithiobacillus* sp. Here, results obtained from genomic analysis to characterize c-di-GMP pathway in *At. thiooxidans* are reported. Intracellular levels of c-di-GMP have been previously measured and data indicated that they are higher in adhered cells than planktonic ones. During the course of characterization of c-di-GMP effectors, a complete *pel*-like gene cluster has been identified in *At. thiooxidans*. By using total RNA obtained from planktonic and adhered sulfur-grown cells, transcriptomic analysis revealed that *pelA* belonging to the *pel*-like gene cluster is overexpressed in adhered cells. Moreover, genetic experiments were performed to compare wild type and null-mutant strains of *At. thiooxidans* for assessing the role of Pel exopolysaccharide. All together, the results obtained suggest a specific role for Pel machinery in the attachment to solid energy substrates by *At. thiooxidans*.

Introduction

Bacterial species belonging to the genus *Acidithiobacillus* are involved in metal releasing during metal sulfides bioleaching [1]. Initial attachment and subsequent biofilm formation on the sulfide ore surfaces by *Acidithiobacillus* spp. are key steps for bioleaching performance [2]. Despite its relevance, molecular mechanisms regulating biofilm formation by *Acidithiobacillus* are still undeciphered. Intracellular levels of cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) control biofilm formation in bacterial species through its binding to specific c-di-GMP effectors which vary in nature, function, structure and c-di-GMP binding site have been described [3-5]. Indeed high intracellular levels of c-di-GMP repress motility and stimulate biofilm formation [3].

Our laboratory has previously characterized the existence of a functional c-di-GMP pathway in *At. ferrooxidans*, *At. caldus* and *At. thiooxidans* [6-9]. However, c-di-GMP effectors have not yet characterized in *Acidithiobacillus* species and molecular relays for transduction of c-di-GMP levels to phenotypic changes are unknown.

One of the best characterized c-di-GMP effector is the PelD membrane protein. PelD is part of a membrane multiprotein complex that is coded by *pel* operon and synthesizes in a c-di-GMP-dependent way, Pel, a cationic exopolysaccharide [10-11]. In the gram-negative bacteria species *Pseudomonas aeruginosa*, Pel has been involved in cell aggregation and maintenance of the biofilm structure [10].

Here, we provide the first evidences that the extremophile bacteria *At. thiooxidans* ATCC 19377 synthesizes a Pel-like exopolysaccharide that may be involved in biofilm formation on the surface of solid energetic substrates during the bioleaching process.

Methodology

The genomic sequence of *Acidithiobacillus thiooxidans*^T type strain ATCC 19377 was obtained from the NCBI database. BLAST and ClustalO algorithms were used to identify functional proteins involved in c-di-GMP metabolism and signal transduction [7].

All *At. thiooxidans* strains were grown at 30 °C in mineral medium at pH 4.5 with elemental sulfur prills as energetic substrate. DNA extraction was performed in early-stationary growth-phase cells [7]. RNA extractions were performed from planktonic and adhered cells [7-8]. Cultures were first incubated 5 days until late exponential phase and then supernatant and sulfur prills were separated. Supernatants were harvested at 6000 x g for 10 min to pellet planktonic cells. Sulfur prills were washed with acidic water pH 2.0 and vortexed twice with 0.05 % Triton X-100 in acidic water to release attached cells. Total RNAs were extracted from both cell fractions with a modified hot phenol protocol and treated with DNase. Purified total RNAs were converted to cDNA and analyzed by q-RT-PCR as described by Castro et al [8].

Mutagenesis of *pelD* gene from was made by allelic exchange as previously described in [8]. Briefly, a suicide plasmid containing a kanamycin resistance cassette flanked by the upstream and downstream sequences around *pelD* gene was introduced in *At. thiooxidans*^T by conjugation with *Escherichia coli* cells. *At. thiooxidans*^T null-mutant cells were selected in solidified mineral medium containing 20 mM thiosulfate as energetic substrate and 200 µg/ml kanamycin and checked by Southern blot and PCR analysis [8].

Results

C-di-GMP has been measured in nucleic cell extracts and genes involved in c-di-GMP metabolism have been previously identified in *At. thiooxidans*^T [6]. Thus, here we focused on c-di-GMP effectors to understand which molecular pathway could be regulated by c-di-GMP in *At. thiooxidans*.

Bioinformatics analysis of the *At. thiooxidans*^T genome allowed the identification of 12 open reading frames potentially coding for c-di-GMP protein effectors (Table 1) that include 9 proteins with a PilZ domain [12], one PelD-like protein [10], one transcriptional regulator FleQ [13] and one ATPase with a MshEN domain [5]. Interestingly several assigned functions for these putative c-di-GMP effectors include pilus assembly, motility regulation and synthesis of EPS such as cellulose (*ATHIO_RS0101475*) and Pel (*ATHIO_RS018015*).

By analyzing the genomic context of *pelD*-like gene, a *pel* gene cluster similar to the *pel* operon from *P. aeruginosa* PA14 was identified (Fig. 1A). However, *pel* gene cluster from *At. thiooxidans*^T possesses an additional gene *wcaG* that is predicted to encode a UDP-Glucose-4-epimerase suggesting that Pel exopolysaccharide may contain N-acetyl-glucosamine and N-acetyl-galactosamine [11].

Table 1. C-di-GMP effectors predicted in *At. thiooxidans*^T

Domain	Locus	BLAST hit
PilZ	<i>ATHIO_RS0101475</i>	hypothetical protein ACA_2353 [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
	<i>ATHIO_RS16400</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]
	<i>ATHIO_RS0105675</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
	<i>ATHIO_RS17010</i>	Cellulose synthase [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
	<i>ATHIO_RS0108435</i>	hypothetical protein ACA_0268 [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
	<i>ATHIO_RS0108750</i>	YcgR protein [<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14]
	<i>ATHIO_RS0109125</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. ferrivorans</i> SS3]
	<i>ATHIO_RS0110790</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
	<i>ATHIO_RS0114620</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]
PelD	<i>ATHIO_RS18015</i>	membrane protein [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
FleQ	<i>ATHIO_RS0108590</i>	FleQ protein [<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1]
MshEN	<i>ATHIO_RS0109755</i>	type IV-A pilus assembly ATPase PilB [<i>At. thiooxidans</i>]

PCR experiments showed that the *pel* gene cluster was present in several strains of *At. thiooxidans*^T (Fig. 1B). In addition, qPCR analysis using RNA obtained from planktonic and adhered cells showed that RNA levels of the *pelA* gene are increased in attached cells of *At. thiooxidans*^T compared to planktonic (Fig. 1C). A *pel* gene cluster has also been identified in *At. caldus* (unpublished results).

In order to better understand the role of Pel exopolysaccharide in *At. thiooxidans*^T, we have developed a *pelD* null mutant strain of *At. thiooxidans*^T. Preliminary results obtained by comparing ATCC 19377 wild type and *pelD*-null mutant strains of *At. thiooxidans*^T suggest that the c-di-GMP effector PelD is involved in the regulation of biofilm architecture in this microorganism (not shown).

Conclusions

This work provides the first evidence that a Pel-like exopolysaccharide should play an active role during the colonization of solid energetic substrates by *Acidithiobacillus* species that oxidize only reduced inorganic sulfur compounds compared to sulfur/iron-oxidizing species.

Nevertheless, further studies have to be performed to: i) understand what kind of biological and/or physical advantages Pel provides for biofilm formation by sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus* compared to iron- and sulfur/iron-oxidizers, ii) decipher the molecular mechanisms involved in the regulation of Pel biosynthesis and iii) determine if Pel interacts with other exopolysaccharide such as cellulose and/or extracellular structure such as flagellar apparatus.

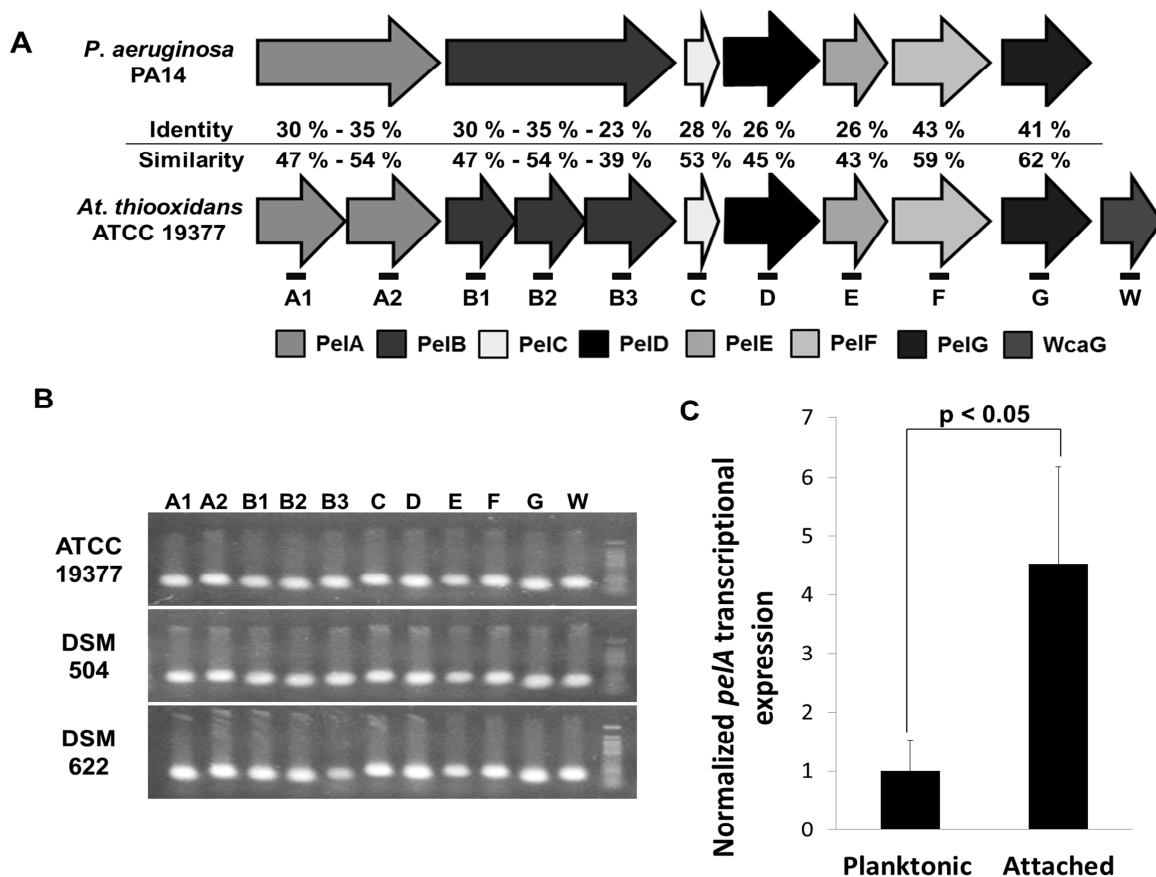


Fig. 1. *Pel* operon from *At. thiooxidans*^T. (A) Comparison of the *At. thiooxidans*^T *pel* gene cluster with the canonical *pel* operon from *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [14]. Levels of similarity and identity are indicated. (B) Results of PCR screening for *pel* genes in different strains of *At. thiooxidans* by using oligonucleotide primers based on the ATCC 19377 genomic sequence. Location of DNA fragments amplified by PCR experiments is noted in A (black lines A1 to W). (C) Measuring of *pelA* transcript levels. Total RNA obtained from planktonic and attached cells were used for qPCR. The significance of the difference was determined by one-way ANOVA.

Acknowledgments


This work was supported by Fondecyt projects 1120295 and 1160702, and the Conicyt scholarship 21120064.

References

- [1] W. Sand, T. Gehrke, P. Jozsa, A. Schippers, (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching, *Hydrometallurgy* 59 (2001) 159-175.
- [2] T. Gehrke, J. Telegdi, D. Thierry, W. Sand, Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 2743-2747.
- [3] U. Römling, M.Y. Galperin, M. Gomelsky, Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (2013) 1-52.
- [4] R. Hengge, Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 371 (2016) pii: 20150498. doi: 10.1098/rstb.2015.0498.
- [5] C.J. Jones, A. Utada, K.R. Davis, W. Thongsomboon, D. Zamorano Sanchez, V. Banakar, L. Cegelski, G.C. Wong, F.H. Yildiz, C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*, *PLoS Pathogens* 11 (2015) e1005068. doi: 10.1371/journal.ppat.1005068.
- [6] L.M. Ruiz, M. Castro, A. Barriga, C.A. Jerez, N. Guiliani, The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals, *Lett. Appl. Microbiol.* 54 (2012) 133-139.
- [7] M. Castro, L.M. Ruiz, A. Barriga, C.A. Jerez, D.S. Holmes, N. Guiliani, C-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria, *Advances Materials Research* 71-73 (2009) 223-226.
- [8] M. Castro, S.M. Deane, L. Ruiz, D.E. Rawlings, N. Guiliani, Diguanylate cyclase null mutant reveals that C-Di-GMP pathway regulates the motility and adherence of the extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus*, *PloS One* Vol. 10 (2015), e0116399. doi:10.1371/journal.pone.0116399.
- [9] M. Diaz, S. Copaja, N. Guiliani, Functional analysis of c-di-GMP pathway in biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Advanced Materials Research* Vol. 825 (2013) 133-136.
- [10] V.T. Lee, J.M. Matewish, J.L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa, S. Lory, A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production, *Mol. Microbiol.* 67 (2007) 1474-1484.
- [11] L.K. Jennings, K.M. Storek, H.E. Ledvina, C. Coulon, L.S. Marmont, I. Sadovskaya, P.R. Secor, B.S. Tseng, M. Scian, A. Filloux, D.J. Wozniak, P.L. Howell, M.R. Parsek, Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112 (2015) 11353-11358.
- [12] D. Amikam, M.Y. Galperin, PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein, *Bioinformatics* 22 (2006) 3-6.
- [13] J.W. Hickman, C.S. Harwood, Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 376-389.
- [14] L. Friedman, R. Kolter, Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms, *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 675-690.

Article

Biofilm Formation by the Acidophile Bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* Involves c-di-GMP Pathway and Pel exopolysaccharide

Mauricio Díaz ¹, Matias Castro ¹, Sylvia Copaja ² and Nicolas Guiliani ^{1,*} 

¹ Bacterial Communication Laboratory, Biology Department, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Nuiñoa 7800003, Santiago, Chile; maujav2004@hotmail.com (M.D.); matiascastrog@gmail.com (M.C.)

² Organic and Environmental Chemistry Laboratory, Faculty of Sciences, Universidad de Chile, Nuiñoa 7800003, Santiago, Chile; scopaja@uchile.cl

* Correspondence: nguilian@uchile.cl; Tel.: +56-2-29787241

Received: 28 December 2017; Accepted: 6 February 2018; Published: 21 February 2018

Abstract: Acidophile bacteria belonging to the *Acidithiobacillus* genus are pivotal players for the bioleaching of metallic values such as copper. Cell adherence to ores and biofilm formation, mediated by the production of extracellular polymeric substances, strongly favors bioleaching activity. In recent years, the second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) has emerged as a central regulator for biofilm formation in bacteria. C-di-GMP pathways have been reported in different *Acidithiobacillus* species; however, c-di-GMP effectors and signal transduction networks are still largely uncharacterized in these extremophile species. Here we investigated Pel exopolysaccharide and its role in biofilm formation by sulfur-oxidizing species *Acidithiobacillus thiooxidans*. We identified 39 open reading frames (ORFs) encoding proteins involved in c-di-GMP metabolism and signal transduction, including the c-di-GMP effector protein PelD, a structural component of the biosynthesis apparatus for Pel exopolysaccharide production. We found that intracellular c-di-GMP concentrations and transcription levels of *pel* genes were higher in *At. thiooxidans* biofilm cells compared to planktonic ones. By developing an *At. thiooxidans* $\Delta pelD$ null-mutant strain we revealed that Pel exopolysaccharide is involved in biofilm structure and development. Further studies are still necessary to understand how Pel biosynthesis is regulated in *Acidithiobacillus* species, nevertheless these results represent the first characterization of a c-di-GMP effector protein involved in biofilm formation by acidophile species.

Keywords: *Acidithiobacillus*; biofilm; bioleaching; biomining; c-di-GMP; Pel exopolysaccharide; PelD

1. Introduction

Biomining is an industrial process in which acidophilic leaching microorganisms including bacteria and archaea are used to recover valuable metals such as copper, cobalt and zinc from low-grade sulfidic ores [1,2]. In addition to its advantaging industrial application, bioleaching naturally occurs in any environment where sulfidic minerals are exposed to both water and oxygen, contributing to water contamination through acid mine/rock drainage (AMD/ARD) generation [3,4]. Microbial leaching activity is increased by bacterial attachment on mineral due to the formation of a thin reaction space between ore and cells [5,6] suggesting that the understanding of molecular events involved in biofilm formation by acidophile species may help to improve biomining and mitigate environmental pollution. Due to the focus on the leaching activities of microorganisms, *Acidithiobacillus* species have been the first and most characterized bioleaching species and were early considered a pivotal player for the biomining process [7,8]. To date *Acidithiobacillus* genus encompasses seven gram-negative, acidophilic and chemolithoautotrophic species that can only oxidize reduced inorganic sulfur compounds (RISCs)

or both ferrous iron and RISCs [9–13]. All *Acidithiobacillus* sp. are capable to form biofilms on mineral surfaces [14–16]. Moreover, recent ecological studies pointed out that acidophilic bacterial communities from natural environments frequently occur as biofilms in which *Acidithiobacillus* species are predominant structural members [17–19]. Several studies performed with the iron/sulfur oxidizer specie *At. ferrooxidans* revealed that quorum sensing (QS) communication system mediated by acyl-homoserine lactone molecules modulates biofilm formation [20–22]. Nevertheless, since sulfur-oxidizing species *At. caldus* and *At. thiooxidans* do not possess any canonical genes for QS [23], it was earlier suggested that biofilm formation should also be regulated by other molecular pathways in the *Acidithiobacillus* species. Indeed, it has been recently reported that the cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) pathway is functional and plays an active role in biofilm formation by different *Acidithiobacillus* species [24,25].

The second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) has emerged as a central metabolite that controls several phenotypes in bacteria, including motility and biofilm formation [26,27]. It is well accepted now that high intracellular levels of c-di-GMP repress motility and stimulate biofilm formation [26–30]. Intracellular levels of c-di-GMP are balanced by the antagonist activities of diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs). The synthesis of c-di-GMP is performed by GGDEF domain present in DGC enzymes by using two guanosine triphosphate (GTP) molecules as substrate. C-di-GMP degradation is catalyzed by EAL and HD-GYP domains from two different PDE families [26,27]. Several classes of c-di-GMP effectors that differ in their nature as well as in structural basis for c-di-GMP binding have been described [26,27,31]. Although two different classes of c-di-GMP binding riboswitches have been characterized [32], most of c-di-GMP effectors described so far are proteins. These include the PilZ domain of multimeric protein complexes such as bacterial cellulose synthase (BCS) [33], inactive GGDEF domains such as PelD (see further [29]), inactive EAL domains [34], several transcriptional regulators [26,35,36], ATPases involved in protein secretion [37] and cell-cycle regulators with kinase-phosphatase activity [38]. The inner-membrane protein PelD from *Pseudomonas aeruginosa* was one of the first c-di-GMP effector proteins to be characterized [29]. It is encoded into the seven-gene operon *pelABCDEFG*, the gene products of which are assembled in a multiprotein membrane complex for Pel biosynthesis [39,40]. The binding of c-di-GMP to the cytoplasmic side of PelD increases the glycosyl-transferase activity of Pel biosynthetic machinery [29,39]. Pel apparatus architecture and export mechanism have been now deciphered and the structural composition of Pel exopolysaccharide has been characterized [41–43]. In *Pseudomonas aeruginosa*, Pel exopolysaccharide is involved in cell aggregation and maintenance of biofilm structure [29,41,44].

In the course for the characterization of c-di-GMP pathways in *Acidithiobacillus* spp. [24,25], comparative genomic studies performed by our group revealed that the complexity of c-di-GMP network differs in *Acidithiobacillus* species [25]. In addition, it was also pointed out that an open reading frame (ORF) coding for the c-di-GMP effector protein PelD and the corresponding *pel*-like operon are present only in the sulfur-oxidizing species *At. thiooxidans* and *At. caldus* while *bcs* operon involved in biosynthesis of cellulose, which is also regulated by c-di-GMP, is present on both sulfur/iron and sulfur oxidizer species [25]. Thus, we hypothesized that Pel exopolysaccharide should play a specific role in biofilm formation by sulfur oxidizing *Acidithiobacillus* species [25]. The purpose of the present work was to challenge this hypothesis. Here we fully characterized a c-di-GMP pathway in *At. thiooxidans*^T type strain ATCC 19377 and we investigated the role of Pel exopolysaccharide on biofilm formation by this extremophile microorganism. By high-performance liquid chromatography (HPLC) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments we demonstrated that intracellular c-di-GMP concentrations and transcription levels of *pel* genes are increased in *At. thiooxidans* biofilm cells compared to planktonic ones. In correlation with both results, we demonstrated that Pel exopolysaccharide is involved in biofilm structure by developing an *At. thiooxidans* Δ *pelD* null-mutant strain. Finally, this work provides the first evidence that the c-di-GMP pathway and Pel exopolysaccharide are both involved in biofilm formation by acidophilic bacteria.

2. Materials and Methods

2.1. Strains, Plasmids, Primers and Growth Conditions

Strains, plasmids and primers used in this work are described in Tables S1 and S2. *At. thiooxidans* ATCC 19377^T strain was grown at 30 °C in modified Mackintosh (MAC) medium [45] pH 4.5 supplemented with different energetic substrates: 5% *w/v* elemental sulfur (S⁰; prills and coupons); 20 mM thiosulfate (Na₂S₂O₃), 10 mM tetrathionate (K₂S₄O₆). Solid medium was obtained by adding 1 mM MgSO₄, 8 mg/L Bromocresol Green and 0.88% phytigel (*w/v*). *At. thiooxidans*^T null-mutant strain *ΔpelD* was grown in selective media with 100–200 μg/mL kanamycin. *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium (1% Triptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) pH 7.0 and agar (1.5% *w/v*) was added for solid medium. Selective media for *E. coli* strains were supplemented with ampicillin (100 μg/mL), trimetoprin (50 μg/mL), chloramphenicol (20 μg/mL) or kanamycin (30 μg/mL). The mating medium for conjugation was made by adding 0.5 mM D-Glucose, 0.05% yeast extract and 50 μM diaminopimelic acid into solid thiosulfate growth medium.

2.2. Bioinformatic Analysis

At. thiooxidans^T draft genome AFOH01000001 [46] was obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) Database. Candidate genes for proteins with GGDEF, EAL, HD-GYP and c-di-GMP effectors domains were predicted using the basic local alignment search tool (BLAST) as previously described [25]. Annotation results were visualized with Artemis software [47]. Protein domains were identified using Pfam [48] and Prosite [49]. Transmembrane domain predictions were done by TMHMM Server [50]. The functionality of identified domains was predicted using ClustalO algorithm [51].

2.3. qPCR Experiments

At. thiooxidans^T cells were grown in 200 mL of medium with sulfur, thiosulfate or tetrathionate for five days. Planktonic cells were collected by centrifugation at 6000 × *g* for 10 min. Biofilm cells were separated from solid sulfur by incubation with 0.05% Triton X-100 and collected by centrifugation [24]. Total RNA was extracted from both cell sub-populations as previously described, incubated with DNase I at 37 °C for 1 h and purified by phenol-chloroform treatment [24]. The complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μg of total RNA by using reverse transcriptase and random primers. Then, cDNA was diluted 1/30 with nuclease-free water and used as template for qPCR experiments. Specific primers were designed to analyze transcriptional levels of the *pelA*, *pelD* and *wcaG* genes. *16S rDNA* and *map* were used as housekeeping genes for data normalization [52].

2.4. Nucleotide-Enriched Fraction Extraction and c-di-GMP Analysis

Nucleotide-enriched fractions were extracted from late-exponential growing cells from sulfur, thiosulfate or tetrathionate cultures. Sulfur cultures were separated in two independent cell populations: planktonic and biofilm cells [24]. The extraction was realized by hot lysis and HClO₄ treatments [53]. HPLC analysis was performed by a HPLC coupled to photodiode array detector (Waters 1525, 2996) (Waters, Milford, MA, USA) using a 15 cm × 3 mm SUPELCOSIL LC-18-DB C18, 3 μm particle size, Reverse Phase Column (SIGMA, Saint Louis, MO, USA). The liquid chromatography (LC) system consisted of degasser (Waters), binary pump (Waters) and oven (Waters). The mobile phase was methanol (A) and water pH 6.0 (6 mM KH₂PO₄) (B). Elution conditions were 5 min at 100% B, 15 min linear gradient from 100% B to 20% A and 80% B and finally 10 min with a gradient from 20% A and 80% B to 100% B with a constant flow of 0.4 mL/min. The temperature was set at 30 ± 3 °C. The injection volume was 20 μL. The calibration curve was performed with synthetic c-di-GMP (BIOLOG, Hayward, CA, USA) in a range of 6.9–552 ng (10–800 pmol) for injection. Signal signatures were identified by coincidence of retention times of 12.531 ± 0.295 min and comparison

of absorption spectra at 252.4 nm. Data were expressed as pmol c-di-GMP and normalized against cellular wet weight.

2.5. Diguanylate Cyclase Activity

Heterologous complementation assays in *Salmonella* strain defective in DGC activity were performed as previously described [25]. Briefly, several *At. thiooxidans*^T genes encoding for different proteins with GGDEF domains were amplified from genomic DNA by PCR and cloned into pBAD24 plasmid. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AdrA1f strain was electrotransformed with pBAD24 recombinant plasmids harboring *At. thiooxidans*^T genes and DGC activity was evaluated by congo red binding assay [25].

2.6. Construction and Selection of a *At. thiooxidans*^T $\Delta pelD$ Null Mutant Strain

At. thiooxidans^T $\Delta pelD$ null mutant strain was constructed as described in Castro et al. [25]. First, a $\Delta pelD$ suicide plasmid was produced by molecular engineering. Briefly, two different 800 bp DNA fragments carrying 5' and 3' extremes of *pelD* gene were obtained by PCR. Primers harbored specific restriction sites for cloning and fragment production in pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA). *Kan*^R gene was released from plasmid pSKM2 [54] by using restriction enzymes HindIII and XmaI. The plasmid pOT was digested by restriction enzymes SacI and XbaI and then dephosphorylated with alkaline phosphatase. All DNA restriction-fragments were separated by electrophoresis, recovered from agarose gels and quantified. Ligations were performed with T4 DNA ligase at 4 °C overnight and ligation product was transformed into chemocompetent *E. coli* JM109 cells. Recombinant cells were selected on solid medium supplemented with ampicillin and kanamycin resistance. Suicide plasmid pOT-*pelD::kan*^R was checked by restriction analysis and sequencing (MACROGEN, Seoul, Korea).

For conjugation assays, *At. thiooxidans*^T cells were grown on thiosulfate to reach a 10⁸ cells/mL density. *E. coli* HB101 strain carrying pOT-*pelD::kan*^R and pR388 [54] plasmids was grown overnight in selective LB medium to inoculate 50 mL of liquid mating medium with corresponding antibiotics. Then *E. coli* cells were grown overnight at 37 °C and collected. Both *At. thiooxidans* and *E. coli* cells fractions were separately washed twice with modified MAC medium (pH 4.5) and collected by centrifugation (6000 × g, 10 min). Both cell suspensions were homogeneously mixed (cell ratios 1:1) and 100 µL of this cellular mix was spotted on a sterile polycarbonate filter. Inoculated filters were gently located over a solid mating medium and incubated for 5 days at 30 °C. Then filters were picked off and incubated for 7 days at 30 °C in liquid MAC medium with thiosulfate (20 mM) and kanamycin (200 µg/mL). Finally, cultures were diluted and 100 µL of 10⁻⁴, 10⁻⁵ and 10⁻⁶ dilutions were plated on selective solid MAC medium (200 µg/mL kanamycin) and incubated at 30 °C for several days until the appearance of colonies.

Colonies were first analyzed by PCR with specific *kan*^R primers. They were picked up and re-suspended in 10 µL of MAC medium pH 4.5. The cell suspension was spotted in solid selective MAC medium for growth. A fraction of the grown spot was collected and re-suspended in 100 µL of a 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3 mM KCl solution. The cell suspension was heated at 100 °C and centrifuged to eliminate cell debris. Thus, the cell lysate was used as a template for the amplification of 16S rDNA, *kan*^R and *pelD* genes by PCR. Finally, PCR products were run in 1.5% w/v agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, and 1 mM EDTA, pH 8.2) and electrophoretic pattern were compared to wild type strain. Positive colonies were finally analyzed by Southern blot analysis using specific *pelD* and *kan*^R labeled with digoxigenin [25]. Genomic DNA (10 µg) from mutant and wild type strain or control plasmids (1 µg) were digested with *Sph*I or *Bam*HI for *pelD* or *kan*^R probes, respectively. All DNAs were run in 1% agarose gel using TBE buffer 1 × (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 7.6). The SSC buffer 10 × (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium Citrate, pH 7.2) was used to transfer DNA fragments from gel to nylon membrane. Final concentration for probes hybridization was 25 ng/mL and developing was done according to manufacturer's instructions (Roche, Basel, Switzerland).

2.7. Visualization of *At. thiooxidans*^T Biofilms

At. thiooxidans^T cells were grown in MAC medium with sulfur (Merck, Darmstadt, Germany) prills and coupons as solid energetic substrate. Sulfur coupons were used for biofilm visualization. Thus, colonized coupons were extracted at different incubation times for 5 days, washed once with aqueous H₂SO₄ pH 2.0, once with 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 and once with bidistilled water to remove all the remaining planktonic cells. Afterwards cells were fixed overnight with 4% formaldehyde. These coupons were critical point dried, coated with gold and analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (LEO 1530VP, LEO Electron Microscopy Inc., Thornwood, NY, USA), as previously described [25].

2.8. Quantification of Extracellular Polymeric Substances

Cells were incubated in 500 mL of MAC medium with sulfur for 5 days. Sulfur-prills colonized with cells were collected and washed twice with 10 mM KH₂PO₄ pH 4.5 to eliminate any remaining planktonic cells. Then prills were vortexed with 0.05% Triton X-100 in 10 mM KH₂PO₄ pH 4.5 for 10 min twice to release extracellular polymeric substances (EPS) and attached cells. Sulfur debris and released cells were removed by centrifugation. Supernatant was recollected and EPS were recovered by incubation with ethanol and ultracentrifugation at 4 °C (100,000× *g*, 1 h). EPS sediment was re-suspended in 300 µL of 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.4 and stored at −20 °C. Carbohydrates determination was done using the Dubois method [55], while protein content was measured using the Bicinchoninic Acid method [56].

3. Results

3.1. *Acidithiobacillus thiooxidans*^T Possesses a Functional *c*-di-GMP Pathway

The bioinformatical analysis of *At. thiooxidans*^T genome allowed the identification of twenty-five ORFs coding for putative DGCs and PDEs proteins that could be involved in metabolism of *c*-di-GMP (Figure S1). Twelve of them encode for proteins with both GGDEF/EAL domains (ATHIO_RS1701500, ATHIO_RS1815000, ATHIO_RS0108445, ATHIO_RS1708000, ATHIO_RS0100160, ATHIO_RS0110800, ATHIO_RS179300, ATHIO_RS0102030, ATHIO_RS0113350, ATHIO_RS1813000, ATHIO_RS0104240, ATHIO_RS0114625), 9 for putative DGC with single GGDEF (ATHIO_RS1657500, ATHIO_RS0108455, ATHIO_RS0108485, ATHIO_RS1689500, ATHIO_RS1835500, ATHIO_RS1838000, ATHIO_RS0107955, ATHIO_RS0116120, ATHIO_RS1781000), 3 for putative PDE with single EAL domains (ATHIO_RS0108450, ATHIO_RS1750000, ATHIO_RS0113355) and one for a putative PDE with HD-GYP domain (Figure S2). Moreover, multiple alignment analysis of all these *c*-di-GMP metabolic domains showed that most of them (15/21 GGDEF domains, 14/15 EAL domains and 1/1 HD-GYP domain) possess all amino acids required for catalytic activity [21]. Different sensor domains such as GAF and PAS have been also predicted inside the amino acid sequence of some of these proteins (17/25) (Figure S2) suggesting that the global intracellular level of *c*-di-GMP in *At. thiooxidans*^T is modulated by different environmental factors. In addition, fourteen ORFs coding *c*-di-GMP effector proteins were also identified (Figure S1). Nine of them encode for proteins with PilZ domains including five Type IV pilus assembly proteins (Table S3), one for a PelD-like protein, two for putative transcriptional regulators FleQ, one for an ATPase with MshEN domain and one for a YajQ-like protein. Interestingly, several assigned functions (BlastP Hit) for these putative *c*-di-GMP effectors were related to biofilm formation such as pilus assembly (ATHIO_RS16400, ATHIO_RS0105675, ATHIO_RS0109125, ATHIO_RS0109755, ATHIO_RS0110790 and ATHIO_RS0114620), motility regulation (ATHIO_RS0108750) and synthesis of exopolysaccharides such as cellulose (ATHIO_RS0101475) and Pel (ATHIO_RS018015). Finally, reverse transcriptase (RT-)PCR experiments using total RNA obtained from planktonic cells grown on sulfur revealed that most of these genes are transcribed (Figure S1).

In order to assess DGC activity, 11 GGDEF domains encoding genes from *At. thiooxidans*^T including six putative DGC enzyme with single GGDEF domain and five with both EAL/GGDEF

domains (Figure S1) were cloned in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AdrA1f strain. Congo red phenotypic assays only revealed strong positive DGC activity, based in the DGC activity-induced rdar (rough, dry and red) morphotype of the colony [57], for proteins with single GGDEF domains (Figure 1). In addition, to evaluate the relationship between c-di-GMP pathway and biofilm formation by *At. thiooxidans*^T, intracellular c-di-GMP levels were measured in different cell sub-populations by HPLC. Planktonic populations were obtained from cells grown in thiosulfate, tetrathionate and elemental sulfur, while biofilm cells were obtained from sulfur cultures. In our experimental conditions, intracellular concentrations of c-di-GMP were 3.5-fold higher in five days sulfur-biofilm cells compared to planktonic cells grown in sulfur, thiosulfate or tetrathionate (Figure 2). Both results clearly indicate that c-di-GMP pathway is functional in *At. thiooxidans*^T. In addition, they revealed that attachment of *At. thiooxidans*^T cells to solid energetic substrate is directly related to an increase of intracellular concentration of c-di-GMP.

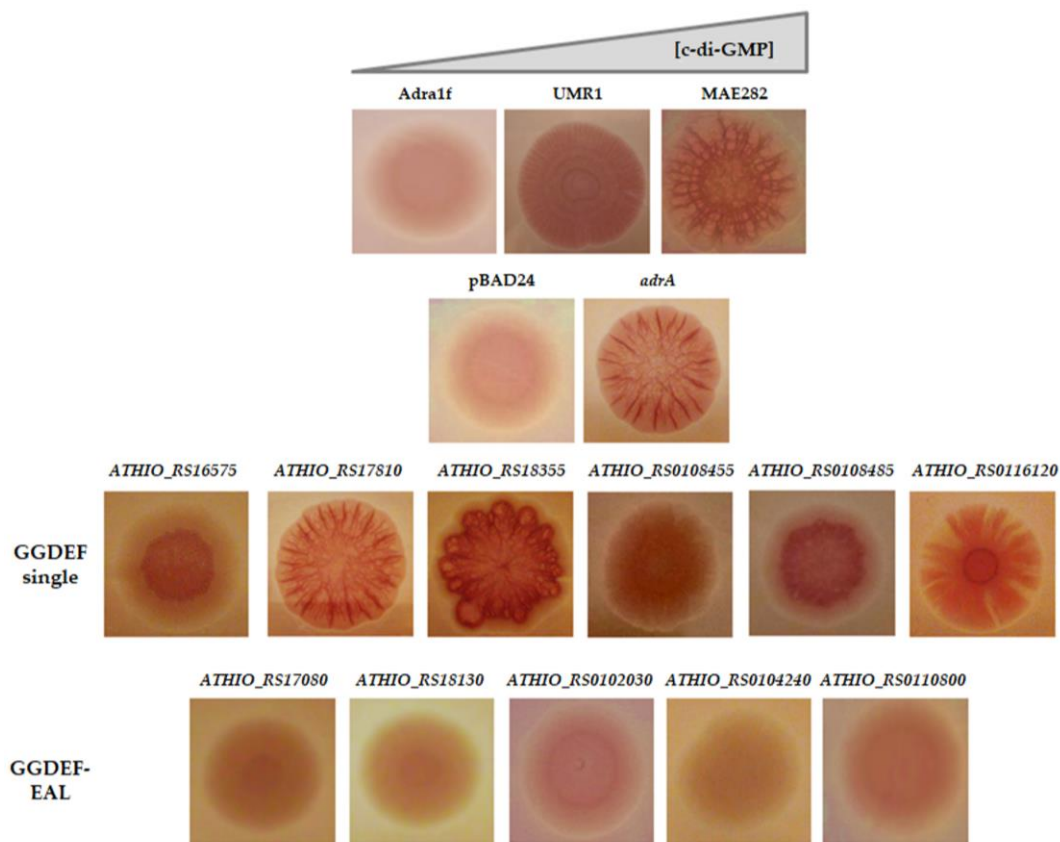


Figure 1. Heterologous complementation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain AdrA1f of diguanylate cyclase activity from single GGDEF and GGDEF/EAL encoding genes of *Acidithiobacillus thiooxidans*^T. The rdar (rough, dry and red) morphotype [57], which is induced by diguanylate cyclase (DGC) activity was analyzed on congo red agar plates and compared to wild type (UMR1), DGC null-mutant (AdrA1f), DGC complemented (*padrA*), negative control (pBAD24 without insert) and a phosphodiesterase null-mutant (MAE 282) strains.

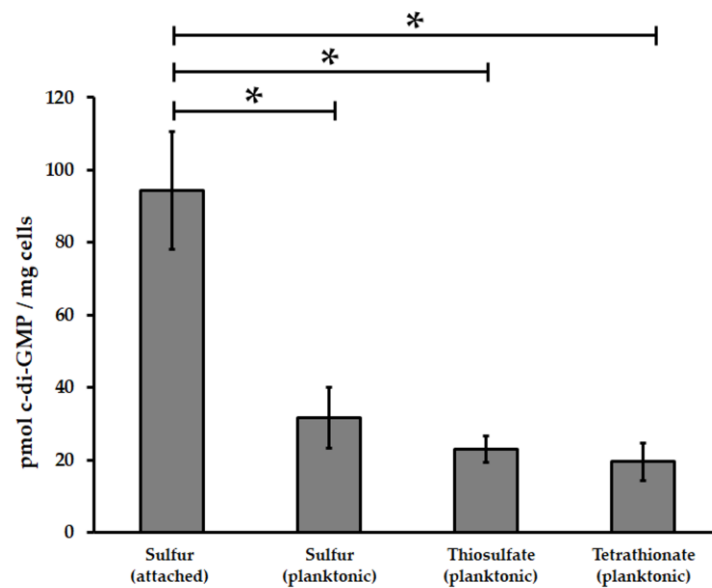


Figure 2. Comparative analysis of c-di-GMP levels from biofilm and planktonic *At. thiooxidans*^T cells grown in different energetic substrates. The nucleotide-enriched extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to photodiode array detector. Values represent the average of three independent experiments \pm standard deviation. Significant differences made by a one-way analysis of variance (ANOVA) test ($p < 0.05$) are noted (*).

3.2. Pel Genes Are Overexpressed in *At. thiooxidans*^T Attached Cells

Among the 14 putative c-di-GMP effectors proteins identified in the available draft genome of *At. thiooxidans*^T, a *pelD* orthologous gene was found. Moreover, the analysis of genomic context revealed that this *pelD*-like is located inside a putative *pel* operon which is present in other *At. thiooxidans* strains [58]. Interestingly, *pel* operon structure from *At. thiooxidans*^T is similar to *pel* operon from *At. caldus* including for the presence downstream *pelG* of an additional *wcaG* gene coding for an enzyme with uridine diphosphate (UDP)-glucose-4-epimerase activity (Figure S3). As previously noted [25,58,59], *pel*-like operon is harbored by *Acidithiobacillus* species that can oxidize only RISC suggesting a specific role in biofilm formation by *At. caldus* and *At. thiooxidans*. To determine the role of Pel biosynthesis apparatus, transcription levels of *pelA*, *pelD* and *wgcA* genes encoding for the deacetylase PelA, the c-di-GMP effector protein PelD and an UDP-Glucose-4-epimerase respectively were measured by qPCR experiments using total RNA obtained from planktonic and biofilm cells of *At. thiooxidans*^T. Compared to planktonic cells, transcription levels of *pelA*, *pelD* and *wcaG* genes were increased in *At. thiooxidans* biofilm cells 4.5-, 6.7- and 2.2-fold, respectively (Figure 3).

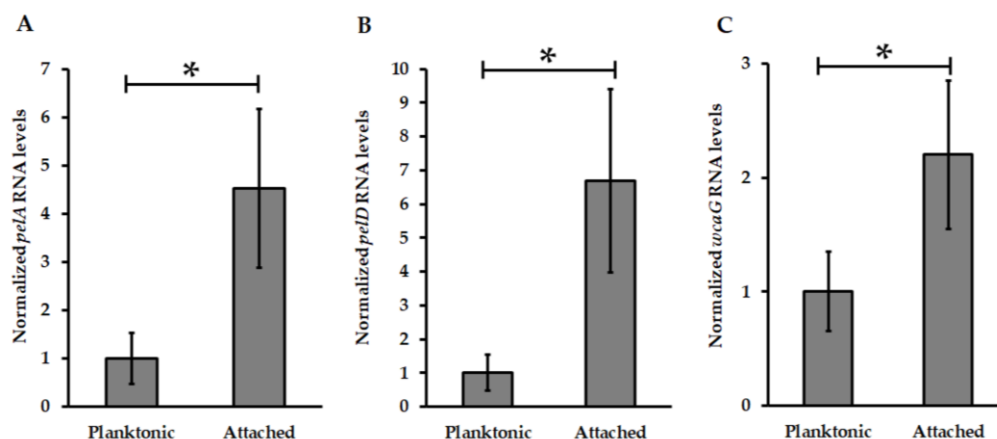


Figure 3. Transcription levels analysis of Pel biosynthesis machinery encoding genes from *At. thiooxidans*^T. Transcript levels of *pelA* (A), *pelD* (B) and *wcaG* (C) genes were measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and then normalized using DNA 16S and *map* genes. Values represent the average of four independent experiments \pm standard deviation. Significant differences made by a one-way ANOVA test ($p < 0.05$) are noted (*).

3.3. The *PelD* Null Mutation Changes *At. thiooxidans*^T Biofilm Structure on Sulfur Surface

To better understand the function of Pel exopolysaccharide in biofilm formation by *At. thiooxidans*, the construction of $\Delta pelD$ null-mutant strain was challenged. A suicide vector harboring a kanamycin (*kan*^R) cassette and 5' and 3' ends of *At. thiooxidans*^T *pelD* gene was constructed and introduced by conjugation in *At. thiooxidans*^T. Two hundred recombinant colonies were analyzed by PCR experiments against *pelD*, *kan*^R and DNA 16S genes to discriminate single recombinant (*pelD*⁺, *kan*^R⁺, DNA 16S⁺) and double recombinant (*pelD*⁻, *kan*^R⁺, DNA 16S⁺) strains. Four clones were selected as double recombinants (Figure S4) and Southern Blot analysis were performed to corroborate the gain of $\Delta pelD$ null-mutant strain of *At. thiooxidans*^T (Figure S5).

EPS production from sulfur-grown cells of wild type and $\Delta pelD$ strains was examined. As expected for the absence of Pel exopolysaccharide, a six fold decrease of total carbohydrates quantity was observed for $\Delta pelD$ S⁰-attached cells compared to wild type (Table 1). Surprisingly, the measurement of total protein fraction revealed an increase of 33.6% in $\Delta pelD$ cells compared to wild-type (WT) strain (Table 1).

Table 1. Quantification of carbohydrates and proteins levels into *Acidithiobacillus thiooxidans*^T S⁰-attached cells obtained from wild type ATCC 19377 and $\Delta pelD$ strains.

	ATCC 19377	$\Delta pelD$
Carbohydrates ($\mu\text{g/g}$ cells)	1596.80 \pm 67.71	272.92 \pm 45.88
Proteins ($\mu\text{g/g}$ cells)	245.58 \pm 58.33	331.42 \pm 52.13

In addition, 5-days old biofilms developed on S⁰-coupons surface by *At. thiooxidans* $\Delta pelD$ and WT cells were visualized separately by SEM microscopy. As shown in Figure 4, $\Delta pelD$ null-mutant strain overexpressed a filamentous structure compared to wild type. Both results strongly indicated that biofilm composition and structure of *At. thiooxidans* $\Delta pelD$ null-mutant strain are modified in comparison to WT strain. Although further studies are still necessary to characterize the nature of this filamentous structure, the EPS quantification result suggests that it could be proteinaceous.

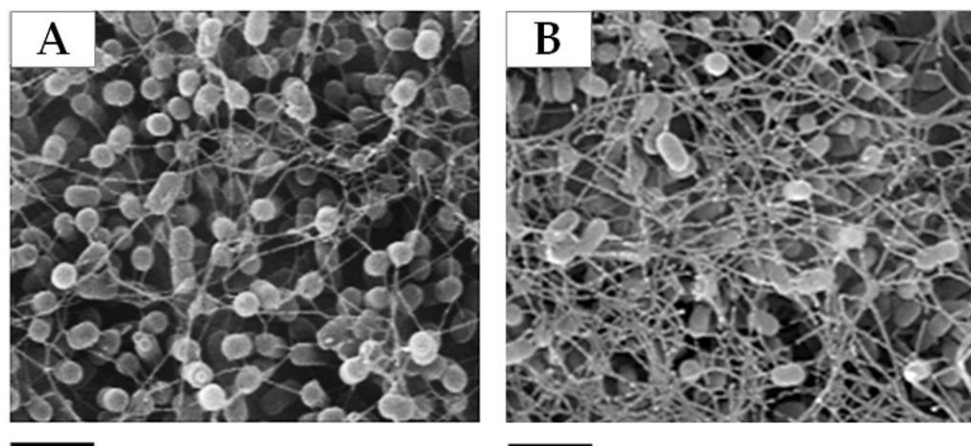


Figure 4. Biofilm structure of *At. thiooxidans* is affected by *pelD* deletion. Compared to wild type strain *At. thiooxidans*^T (A), $\Delta pelD$ null-mutant strain of *At. thiooxidans*^T (B) overexpressed a filamentous structure. Bars represent 2 μm .

4. Discussion

Insights into the c-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus* genus have recently started to emerge [24,25]. These studies indicate that c-di-GMP signaling is a widespread pathway into *Acidithiobacillus* genus [25]. As it occurs for *At. ferrooxidans* [24] and *At. caldus* [25], higher c-di-GMP levels were observed in attached cells of *At. thiooxidans*^T compared to planktonic cells (Figure 2), supporting that the c-di-GMP pathway regulates biofilm formation by this acidophilic leaching species. With twenty-five genes encoding proteins with GGDEF alone (9), EAL alone (3), both GGDEF/EAL (12) and HD-GYP (1) domains as well as fourteen genes encoding putative effector proteins, *At. thiooxidans*^T possesses the c-di-GMP pathway with the highest complexity currently known among species of this genus [24,25]. Moreover, *At. thiooxidans* has a HD-GYP domain encoding gene which was transcribed (Figure S1) suggesting that unlike *At. ferrooxidans* and *At. caldus*, PDE activity should be generated by both EAL and HD-GYP domains in this bacterial species. To date no c-di-GMP riboswitches [32] have been identified in *Acidithiobacillus* genomes [60] suggesting that c-di-GMP effector proteins are the predominant way for c-di-GMP signal transduction in this genus. Indeed, this work allowed the identification of five different proteins families for c-di-GMP effectors in *At. thiooxidans* (Table S3). Altogether, these data suggest that the c-di-GMP pathway signaling has a specific molecular network *At. thiooxidans*, even different to other sulfur-oxidizing species such as *At. caldus*.

The MshE ATPase from *Vibrio cholerae* has been recently characterized as a new c-di-GMP effector protein involved in the biosynthesis and function of Type IVa MshA pili which is a relevant extracellular and adhesive appendage for initial attachment to surfaces by bacterial cells [32]. The binding of c-di-GMP occurs through the MshE N-terminal domain that is the longest nucleotide-binding motif identified yet [61]. Here we identified a *mshE* orthologue (*ATHIO_RS0109755*) that encodes a MshE ATPase-like with a canonical MshE N-terminal domain that was transcribed in *At. thiooxidans* cells grown on elemental sulfur (Figure S1). In addition, the mining of *At. thiooxidans*^T genome sequence revealed the presence of several type IV pilin-like protein encoding genes (Table S3). Thus, it is possible to hypothesize that the initial attachment to solid energetic substrates by *At. thiooxidans*^T may be regulated by c-di-GMP pathway through MshE/Type IVa pilin system.

FleQ was first characterized in *P. aeruginosa* as a transcriptional regulator for genes related to flagellar-based motility and mucin adhesion [62]. Then it was identified as a c-di-GMP effector involved in Pel exopolysaccharide biosynthesis [35] and its pivotal role for production of biofilm matrix components such as cellulose as well as the regulation of flagellar motility has been well documented [63–66]. Most of these c-di-GMP-regulated machineries have been identified in *At. thiooxidans*. As reported for *At. caldus* [25], *At. thiooxidans* also possesses a *bcsAB* operon involved

in cellulose biosynthesis. Moreover, the transcription level of *bcsA* gene (*ATHIO_RS0101475*), encoding for the cellulose synthase catalytic subunit (BcsA), involved in the regulation of cellulose biosynthesis through the binding of c-di-GMP to its PilZ domain [28,33,67,68] was increased in *At. thiooxidans* S⁰-biofilm cells compared to planktonic ones (Figure 5) suggesting that cellulose participates to the biofilm architecture in this *Acidithiobacillus* species. In addition, a flagellar encoding operon has been also identified in *At. thiooxidans* [46]. Thus, the identification of two transcribed *fleQ*-like genes in *At. thiooxidans*^T (Figure S1) strongly points out that in addition to Pel exopolysaccharide, c-di-GMP levels could regulate the biosynthesis of cellulose and flagella in this *Acidithiobacillus* species. Interestingly, *At. ferrooxidans* is a primary colonizer that increases mineral colonization by sulfur-oxidizing species such as *At. thiooxidans* [69] but it does not have the genetic capacity to produce Pel exopolysaccharide, cellulose and flagellum (Table S3). This suggests that capsular exopolysaccharide whose expression is induced in *At. ferrooxidans* cells attached to mineral [14] and/or a not yet identified matrix component have to play a pivotal role for biofilm formation by this iron/sulfur-oxidizing species.

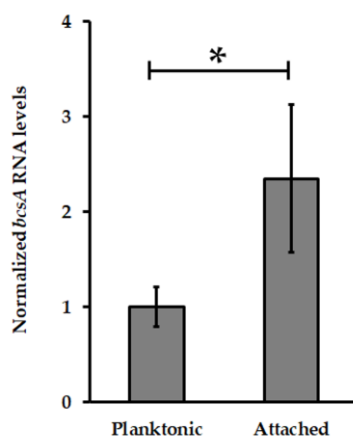


Figure 5. Transcription levels analysis of BcsA (cellulose synthase catalytic subunit) encoding gene from *At. thiooxidans*^T. Transcript levels of *bcsA* were measured by qPCR and then normalized using DNA 16S and *map* genes. Values represent the average of four independent experiments \pm standard deviation. Significant differences made by a one-way ANOVA test ($p < 0.05$) are noted (*).

Due to the huge difficulties for genetic manipulation of *Acidithiobacillus* spp., very few (up to five) knockout mutant strains have been reported [54,70–73]. Recently, an *Acidithiobacillus* DGC-defective mutant strain has been developed by our research group [25]. This *At. caldus* DGC null-mutant strain revealed that c-di-GMP pathway is directly involved in the regulation of motility and adherence to sulfur surfaces in this *Acidithiobacillus* species. However, the identification of molecular players connecting the decreased amounts of c-di-GMP intracellular levels with phenotypical observations is still an open question. Castro et al. [25] hypothesized that Pel exopolysaccharide should be involved in biofilm formation by *Acidithiobacillus* species that can only oxidize RISCs, namely *At. caldus* and *At. thiooxidans* and this hypothesis was tested. The results obtained from EPS quantification (Table 1) and qPCR assays demonstrating that transcription levels of several genes from *pel* operon including the c-di-GMP effector protein encoding gene *pelD* were enhanced in biofilm cells compared to planktonic cells (Figure 3), as well as the mutagenesis and SEM experiments allowing the visualization of a filamentous structure which was overexpressed in Δ *pelD* null-mutant strain compared to wild type strain (Figure 4) clearly revealed that Pel exopolysaccharide is involved in biofilm architecture developed by *At. thiooxidans*. Because the proteinaceous fraction was increased in Δ *pelD* null-mutant strain (Table 1) we infer that these filamentous compounds should be proteinaceous. It has been reported that flagellum and amyloid curli fibers are involved in macrobiofilm architecture developed by *E. coli* [74,75]. Bioinformatic search on *At. thiooxidans*^T genome sequence revealed that canonical

csgD-like and *csgBAC*-like genes involved in the synthesis of the most characterized amyloid fibers are absent from all *Acidithiobacillus* genomes. This suggests that *Acidithiobacillus* species either do not produce amyloid fibers or produce some yet uncharacterized amyloid fibers related to its acidophilic lifestyle. In contrast, predicted genes for flagella formation has been identified in *At. thiooxidans*, *At. caldus* and *At. ferrovorans* but not in *At. ferrooxidans* [17,46]. On the other way, because we demonstrated that the transcription level of *bcsA* gene are increased in biofilm cells (Figure 5), this overproduced filamentous structure could be a mesh of flagella used as scaffold for the formation of cellulose filaments as it has been reported in *E. coli* macrocolony biofilm [75]. However further studies are still necessary to decipher the nature of this filamentous structure and the molecular network involved in its biosynthesis.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2073-4425/9/2/113/s1, Table S1: Strains and plasmids used in this work, Table S2: Primers used in this work, Table S3: Type IV pilin-like protein and pili apparatus subunits encoding genes in *At. thiooxidans*^T. Table S4: Putative molecular players for biofilm architecture identified in two iron/sulfur- and two sulfur-oxidizing species of *Acidithiobacillus*, Figure S1: RT-PCR analysis of c-di-GMP metabolism and effectors encoding genes identified in *At. thiooxidans*^T, Figure S2: Domain organization of *At. thiooxidans* ATCC 19377 proteins involved in c-di-GMP metabolism, Figure S3: Comparative analysis of *pel* operon structures, Figure S4: PCR analysis of *At. thiooxidans* ATCC 19377 and the four double recombinant $\Delta pelD$ mutant strains to check double-recombination, Figure S5: Southern blot analysis of *At. thiooxidans* ATCC 19377 and the four double recombinant $\Delta pelD$ mutant strains.

Acknowledgments: We thank Mario Vera for critical reviewing the manuscript. M.D. acknowledges CONICYT to support his doctoral studies (scholarship 21120064, 2012). This work was supported by FONDECYT project 1160702. N.G. and S.C. are supported by Universidad de Chile (UCH).

Author Contributions: N.G. conceived the experiments. M.D. designed and performed experiments. M.C. contributed to genome analysis and red congo assays. Chemical analysis of c-di-GMP were done by M.D. in collaboration with S.C. Manuscript was written by N.G. and M.D. M.C. and S.C. reviewed and improved the manuscript quality.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vera, M.; Schippers, A.; Sand, W. Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7529–7541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Johnson, D.B. Biomining-biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 24–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Johnson, D.B.; Hallberg, K.B. Acid mine drainage remediation options: A review. *Sci. Total Environ.* **2005**, *338*, 3–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rohwerder, T.; Sand, W. Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes. *Eng. Life Sci.* **2007**, *7*, 301–309. [[CrossRef](#)]
5. Harneit, K.; Göksel, A.; Kock, D.; Klock, J.-H.; Gehrke, T.; Sand, W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **2006**, *83*, 245–254. [[CrossRef](#)]
6. Africa, C.J.; van Hille, R.P.; Harrison, S.T. Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1317–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Baker, B.J.; Banfield, J.F. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *44*, 139–152. [[CrossRef](#)]
8. Rawlings, D.E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* **2005**, *4*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Nuñez, H.; Moya-Beltrán, A.; Covarrubias, P.C.; Issotta, F.; Cárdenas, J.P.; González, M.; Atavales, J.; Acuña, L.G.; Johnson, D.B.; Quatrini, R. Molecular Systematics of the Genus *Acidithiobacillus*: Insights into the Phylogenetic Structure and Diversification of the Taxon. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Kelly, D.P.; Wood, A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50*, 511–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hallberg, K.B.; González-Toril, E.; Johnson, D.B. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* **2010**, *14*, 9–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hedrich, S.; Johnson, D.B. *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 4018–4025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Falagán, C.; Johnson, D.B. *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 206–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bellenberg, S.; Leon-Morales, C.F.; Sand, W.; Vera, M. Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **2012**, *129–130*, 82–89. [[CrossRef](#)]
15. Barahona, S.; Dorador, C.; Zhang, R.; Aguilar, P.; Sand, W.; Vera, M.; Remonsellez, F. Isolation and characterization of a novel *Acidithiobacillus ferrivorans* strain from the Chilean Altiplano: Attachment and biofilm formation on pyrite at low temperature. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 782–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, R.; Bellenberg, S.; Neu, T.R.; Sand, W.; Vera, M. The Biofilm Lifestyle of Acidophilic Metal/Sulfur-Oxidizing Microorganisms. In *Biotechnology of Extremophiles Advances and Challenges*; Rampelotto, P., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; Volume 1, pp. 177–213. ISBN 978-3-319-13521-2.
17. Liljeqvist, M.; Ossandon, F.J.; González, C.; Rajan, S.; Stell, A.; Valdes, J.; Holmes, D.S.; Dopson, M. Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2015**, *91*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Menzel, P.; Gudbergsdóttir, S.R.; Rike, A.G.; Lin, L.; Zhang, Q.; Contursi, P.; Moracci, M.; Kristjansson, J.K.; Bolduc, B.; Gavrilov, S.; et al. Comparative Metagenomics of Eight Geographically Remote Terrestrial Hot Springs. *Microb. Ecol.* **2015**, *70*, 411–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chen, L.X.; Hu, M.; Huang, L.N.; Hua, Z.S.; Kuang, J.L.; Li, S.J.; Shu, W.S. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *ISME J.* **2015**, *9*, 1579–1592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Farah, C.; Vera, M.; Morin, D.; Haras, D.; Jerez, C.A.; Guiliani, N. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7033–7040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Gonzalez, A.; Bellenberg, S.; Mamani, S.; Ruiz, L.; Echeverria, A.; Soulere, L.; Doutheau, A.; Demergasso, C.; Sand, W.; Queneau, Y.; et al. AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3729–3737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mamani, S.; Moiner, D.; Denis, Y.; Soulere, L.; Queneau, Y.; Talla, E.; Bonnefoy, V.; Guiliani, N. Insights into the Quorum Sensing Regulon of the Acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* Revealed by Transcriptomic in the Presence of an Acyl Homoserine Lactone Superagonist Analog. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Valdes, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Holmes, D.S. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* **2008**, *94*, 180–184. [[CrossRef](#)]
24. Ruiz, L.M.; Castro, M.; Barriga, A.; Jerez, C.A.; Guiliani, N. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *54*, 133–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Castro, M.; Deane, S.M.; Ruiz, L.; Rawlings, D.E.; Guiliani, N. Diguanilate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway regulates the motility and adherence of the extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Römling, U.; Galperin, M.Y.; Gomelsky, M. Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 1–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Jenal, U.; Reinders, A.; Lori, C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 271–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Ross, P.; Weinhouse, H.; Aloni, Y.; Michaeli, D.; Weinberger-Ohana, P.; Mayer, R.; Braun, S.; de Vroom, E.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **1987**, *325*, 279–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lee, V.T.; Matewish, J.M.; Kessler, J.L.; Hyodo, M.; Hayakawa, Y.; Lory, S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 1474–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Guttenplan, S.B.; Kearns, D.B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 849–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hengge, R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2016**, *371*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sudarsan, N.; Lee, E.R.; Weinberg, Z.; Moy, R.H.; Kim, J.N.; Link, K.H.; Breaker, R.R. Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science* **2008**, *321*, 411–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Amikam, D.; Galperin, M.Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 3–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Newell, P.D.; Monds, R.D.; O’Toole, G.A. LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3461–3466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hickman, J.W.; Harwood, C.S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **2008**, *69*, 376–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tao, F.; He, Y.W.; Wu, D.H.; Swarup, S.; Zhang, L.H. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1020–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Jones, C.J.; Utada, A.; Davis, K.R.; Thongsomboon, W.; Zamorano Sanchez, D.; Banakar, V.; Cegelski, L.; Wong, G.C.; Yildiz, F.H. C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lori, C.; Ozaki, S.; Steiner, S.; Böhm, R.; Abel, S.; Dubey, B.N.; Schirmer, T.; Hiller, S.; Jenal, U. Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication. *Nature* **2015**, *523*, 236–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Franklin, M.J.; Nivens, D.E.; Weadge, J.T.; Howell, P.L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vasseur, P.; Vallet-Gely, I.; Soscia, C.; Genin, S.; Filloux, A. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* **2005**, *151*, 985–997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Jennings, L.K.; Storek, K.M.; Ledvina, H.E.; Coulon, C.; Marmont, L.S.; Sadvovskaya, I.; Secor, P.R.; Tseng, B.S.; Scian, M.; Filloux, A.; et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11353–11358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Marmont, L.S.; Rich, J.D.; Whitney, J.C.; Whitfield, G.B.; Almblad, H.; Robinson, H.; Parsek, M.R.; Harrison, J.J.; Howell, P.L. Oligomeric lipoprotein PelC guides Pel polysaccharide export across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 2892–2897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Marmont, L.S.; Whitfield, G.B.; Rich, J.D.; Yip, P.; Giesbrecht, L.B.; Stremick, C.A.; Whitney, J.C.; Parsek, M.R.; Harrison, J.J.; Howell, P.L. PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 19411–19422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Colvin, K.M.; Gordon, V.D.; Murakami, K.; Borlee, B.R.; Wozniak, D.J.; Wong, G.C.L.; Parsek, M.R. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1001264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mackintosh, M.E. Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* **1978**, *105*, 215–218. [[CrossRef](#)]
46. Valdés, J.; Ossandon, F.; Quatrini, R.; Dopson, M.; Holmes, D.S. Draft genome sequence of the extremely acidophilic biominer bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 7003–7004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P.; Rajandream, M.A.; Barrell, B. Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 944–945. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Finn, R.D.; Coghill, P.; Eberhardt, R.Y.; Eddy, S.R.; Mistry, J.; Mitchell, A.L.; Potter, S.C.; Punta, M.; Qureshi, M.; Sangrador-Vegas, A.; Salazar, G.A.; Tate, J.; Bateman, A. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sigrist, C.J.A.; de Castro, E.; Cerutti, L.; Cucho, B.A.; Hulo, N.; Bridge, A.; Bougueleret, L.; Xenarios, I. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 344–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G.; Sonnhammer, E.L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. McWilliam, H.; Li, W.; Uludag, M.; Squizzato, S.; Park, Y.M.; Buso, N.; Cowley, A.P.; Lopez, R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 597–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nieto, P.A.; Covarrubias, P.C.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S.; Quatrini, R. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: Case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Mol. Biol.* **2009**, *10*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Antoniani, D.; Bocci, P.; Maciag, A.; Raffaelli, N.; Landini, P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1095–1104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Van Zyl, L.J.; van Muster, J.M.; Rawlings, D.E. Construction of *arsB* and *tetH* mutants of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus* by marker exchange. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5686–5694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356. [[CrossRef](#)]
56. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
57. Zogaj, X.; Nimitz, M.; Rohde, M.; Bokranz, W.; RömLing, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 1452–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Diaz, M.; Guiliani, N. Molecular regulatory network involved in biofilm structure development by *Acidithiobacillus thiooxidans* includes Pel exopolysaccharide machinery. *Solid State Phenom.* **2017**, *262*, 330–333. [[CrossRef](#)]
59. Castro, M.; Ruiz, L.M.; Barriga, A.; Jerez, C.A.; Holmes, D.S.; Guiliani, N. C-di-GMP Pathway in Biomineral Bacteria. *Adv. Mater. Res.* **2009**, *71–73*, 223–226. [[CrossRef](#)]
60. Weinberg, Z.; Yale University, New Haven, CT, USA. Personal communication, 2015.
61. Wang, Y.C.; Chin, K.H.; Tu, Z.L.; He, J.; Jones, C.J.; Sanchez, D.Z.; Yildiz, F.H.; Galperin, M.Y.; Chou, S.H. Nucleotide binding by the widespread high-affinity cyclic di-GMP receptor MshEN domain. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Arora, S.K.; Ritchings, B.W.; Almira, E.C.; Lory, S.; Ramphal, R. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5574–5581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Baraquet, C.; Harwood, C.S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 18478–18483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Srivastava, D.; Hsieh, M.L.; Khataokar, A.; Neiditch, M.B.; Waters, C.M. Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **2013**, *90*, 1262–1276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Xiao, Y.; Nie, H.; Liu, H.; Luo, X.; Chen, W.; Huang, Q. C-di-GMP regulates the expression of *lapA* and *bcs* operons via FleQ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Jiménez-Fernández, A.; López-Sánchez, A.; Jiménez-Díaz, L.; Navarrete, B.; Calero, P.; Platero, A.I.; Govantes, F. Complex Interplay between FleQ, Cyclic Diguanylate and Multiple σ Factors Coordinately Regulates Flagellar Motility and Biofilm Development in *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Chang, A.L.; Tuckerman, J.R.; Gonzalez, G.; Mayer, R.; Weinhouse, H.; Volman, G.; Amikam, D.; Benziman, M.; Gilles-Gonzalez, M.A. Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3420–3426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. García, B.; Latasa, C.; Solano, C.; García del Portillo, F.; Gamazo, C.; Lasa, I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 264–277. [[CrossRef](#)]
69. Bellenberg, S.; Díaz, M.; Noël, N.; Sand, W.; Poetsch, A.; Guiliani, N.; Vera, M. Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 773–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Liu, Z.; Guiliani, N.; Appia-Ayme, C.; Borne, F.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2269–2276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Wang, H.; Liu, X.; Liu, S.; Yu, Y.; Lin, J.; Lin, J.; Pang, X.; Zhao, J. Development of a markerless gene replacement system for *Acidithiobacillus ferrooxidans* and construction of a *pfkB* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 1826–1835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Yu, Y.; Liu, X.; Wang, H.; Li, X.; Lin, J. Construction and characterization of *tetH* overexpression and knockout strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **2014**, *196*, 2255–2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Wen, Q.; Liu, X.; Wang, H.; Lin, J. A versatile and efficient markerless gene disruption system for *Acidithiobacillus thiooxidans*: Application for characterizing a copper tolerance related multicopper oxidase gene. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 3499–3514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Serra, D.O.; Richter, A.M.; Klauck, G.; Mika, F.; Hengge, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* **2013**, *4*, e00103–e00113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Serra, D.O.; Richter, A.M.; Hengge, R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 5540–5554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Material for Biofilm Formation by the Acidophile Bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* Involves c-di-GMP Pathway and Pel exopolysaccharide

Mauricio Diaz, Matias Castro, Sylvia Copaja and Nicolas Guiliani

Table S1. Strains and plasmids used in this work.

Strains	Description ¹
<u><i>Acidithiobacillus thiooxidans</i></u>	
ATCC 19377	Type strain, Wild Type
ATCC 19377- $\Delta pelD$	This work: ATCC 19377, $pelD::kan$, Kan ^R
<u><i>Escherichia coli</i></u>	
JM109	Amplification of pGEM-T Easy constructions
LMG194	Reservoir of pBAD24
HB101	Strain for conjugation
<u><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium</u>	
UMR1	WT
AdrA1f	UMR1 $\Delta adrA$, Kan ^R
MAE282	UMR1 $\Delta yciR$, Cm ^R
Plasmids	
pGEM-T Easy	IPTG-inducible amplification vector, Amp ^R
pBAD24	Arabinose-inducible expression vector, Amp ^R
pOT	Suicide plasmid, Amp ^R
pSKM2	Source of <i>kan</i> gene, Kan ^R
pOT- <i>pelD</i>	pOT with cloned <i>pelD</i> gene, Amp ^R
pOT- $pelD::kan^R$	Suicide plasmid for <i>At. thiooxidans</i> , Amp ^R , Kan ^R
pR388	Helper plasmid, Tmp ^R

¹ Amp^R, Kan^R, Cm^R and Tmp^R mean Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol and Trimetropin resistance, respectively.

Table S2. Primers used in this work

Name	Sequence 5'-3' ¹
<i>pelA1_F</i>	CCGATTGCCGCAGTTATTTATT
<i>pelA1_R</i>	GCTGTCTTGATGGCTTTGATG
<i>pelD_F</i>	CACAAGTTGGCATCCTGGTTCGTT
<i>pelD_R</i>	CATGCTGCCTGCGAAAAGGTAACAA
16S-F3	ATGGCCTTTATGTCCAGGGCTACA
16S-R3	AATCCGAACACTACGACGCGCTTCT
Ath_map_f	GGACCGGATTTGTCACGATTA
Ath_map_r	GACGTGGTTGAGGGAAATACA
BcsAF	TTGTGACCACATACCAACCAGGGA
BcsAR	TGGGCCTCTTGGCATATCCAGATT
AtthioxUDP F	GAACTTGTC AATGCGCCATC
AtthioxUDP R	GGCCAGCAATAAATCCTGAATAC
T7	AATACGACTCACTATAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
<i>pelD5'-F</i>	ACCGAGCTCAGGAATCTTGATTCCCATTTG
<i>pelD5'-R</i>	ACCAAGCTTAAATATTTCCAGGCTCCGTATCTC
<i>pelD3'-F</i>	ACCCCCGGGTGATTTTCATACTGGTCCTTATG
<i>pelD3'-R</i>	ACCTCTAGAGCATTCAAGTTTATCAGTAATTC
KanR_div_5'	GCTTTCTACGTGTTCCGCTTC
KanR_div_3'	TCTATGAAAGGTGGGCTTC
pOTsec_F	CAGCTATGATGCAGGCAAAC
pOTsec_R	CAGTGAGCGCAACGCAATTA
ATT_F	GGGTGCTAATANCGCCTGCC
907R	CCGTCAATTCMTTIGAGTTT
probe_At_pelD_F	CCACCCGCTTTCGACAATTA
probe_At_pelD_R	CAGGATGCCAACTTGTGGTA
probe_Kan_R_F	GCTTACATGGCGATAGCTAGAC
probe_Kan_R_R	GAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
AthiA1_00157/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGCGAGATCATGGGTGCCTGGC
AthiA1_00157/RH	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGGTTTCTGGGCTGTAAACGCATAGCC
AthiA1_07018/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGGGAAAGCATGTCCAGTCCATTC
AthiA1_07018/RP	ACCCGTGAGTCAATGATGATGATGATGATGATGATGACTGTGCTTTCAGGATGAATG
24-7 F/NheI	ACCGCTAGCTAAGGAGGCCATCCATGGGCGTTTCTCTA
24-7 R/HindIII	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGAGCTTGATGGGGCGTATCC
AthiA1_08189/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGCATCATAATGCTTATTGAAGCTTTTTTGCCG
AthiA1_08189/RS	ACCGCATGCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGTGCAGCACTCCCAGTAGCT
AthiA1_08219/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGGTGAATCATGACAGCACAATCAC
AthiA1_08219/RH	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGAGGCAGCAGGCGC
AthiA1_08224/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGCATAAAAATGGAACAACCTCTCCAAA
AthiA1_08224/RH	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAGTGGATGAGTTGCCTGA
AthiA1_10484/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGTGCAGCGATGAATAGCTCCCTT

Table S2. (Continued)

AthiA1_10484/RSa	ACCGT <u>CGAC</u> CAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGCTGAGTACCATGGCTACAAC
37-53 F/NheI	ACCGCTAGCAGGAGGAATTCACCATGTACAATAAAGATGAT
37-53 R/SphI	ACCG <u>CATG</u> CTCAATGATGATGATGATGATGATGAGAAATCAATTGAATTG
AthiA1_15675/FN	ACCGCTAGCTAAGGAGGGTCAACTATGCGACAGATGGCA
AthiA1_15675/RH	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATCTTTTTTTTCAGCCGCCAG
135-10 F/NheI	ACCGCTAGCAGGAGGAATTCACCATGTCCCGTGATGCTCCTG
135-10 R/SphI	ACCG <u>CATG</u> CTCAATGATGATGATGATGATGATGATGACTTTCATCTGCATCGCTC
40-113 F/NheI	ACCGCTAGCTAAGGAGGTGAGTAGATGGATAATCAATCCCC
40-113 R/KpnI	ACCGGTACCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGTGATATCTGACGCTTTTTGCTTTT
AthiA1_00152 F	CGTCCATTTATGACCCCAAC
AthiA1_00152 R	CGATCTTCTGCAGTCAACCA
AthiA1_00157 F	GCTTATCATCGCCAGGAATG
AthiA1_00157 R	CGAGCTAGATGACTTTGTCC
AthiA1_01972 F	GAAAGGGTACATCCTTGGAC
AthiA1_01972 R	GGTAGGATTATCGAGGATCGGC
AthiA1_01982 F	GAAAGGACAGCTCCATTACC
AthiA1_01982 R	GTAGATACATCGTCCGGTTCTG
AthiA1_03313 F	CAGCTGAAGCGAAAACATGA
AthiA1_03313 R	GAGGCATTCTTCGGCACTAC
AthiA1_04113 F	GAAAGACCTGCCTATTGACC
AthiA1_04113 R	CTTCAGTCTCTACACCCTCTAC
AthiA1_05539 F	CATTTGCGTAGACAGCCAGA
AthiA1_05539 R	ATGATCGCGAATTCATCTCC
AthiA1_06856 F	GTGACGGTTTCGGCAACTAT
AthiA1_06856 R	ACCAGCGGTTGATACCAAAG
AthiA1_07018 F	CCCGTCAATTACAGGGTATG
AthiA1_07018 R	GACCCGGAATAGACATCAAC
AthiA1_07707 F	ACCCTCAGGATCCCTGCTAT
AthiA1_07707 R	CATATAGGCAAAGGCGGAAA
AthiA1_08179 F	TTCGGCACGCAAAATGTTGGAC
AthiA1_08179 R	CTTCCAGCATATCGGCTTTGGGGT
AthiA1_08184 F	CGATTACAGTCAGGGCTTCTAC
AthiA1_08184 R	CTTCTTCTATGTCACTGACGGG
AthiA1_08189 F	CGTAGTATCACTGAATGGGC
AthiA1_08189 R	CACTCAGCGAGTATATGGTG
AthiA1_08219 F	TTAATCGTCGCCGTATGGAG
AthiA1_08219 R	TAGTAGGGCGCAGCTTT
AthiA1_08224 F	ACGTCTCAATCAGCCAC
AthiA1_08224 R	GCCGGTCTTGAGCTTGAAATAA
AthiA1_09870 F	ACGCAGCAATCTCTTCTGGT
AthiA1_09870 R	AAGCAAGCTTTCACGCAAAT
AthiA1_09875 F	ACATCCTGCCAGCTTATTGG

Table S2. (Continued)

AthiA1_09875 R	ATGGGATGATCCTCTGTTC
AthiA1_10484 F	CGAGTGGATTCATGTGAGTG
AthiA1_10484 R	GCCTCATCCAGAGTCAGACTATAC
AthiA1_12969 F	GGGTGTCGTGCTGTATCCTT
AthiA1_12969 R	ACGCTGATCTGCGAAGTTTT
AthiA1_12974 F	GACCGGGAGCTGATTATTGA
AthiA1_12974 R	ACATTTCGTGCGGTACCTCTG
AthiA1_13196 F	ACCGAAACCGGATGTCATGT
AthiA1_13196 R	GCCAGAATGTCCTGACCAAT
AthiA1_13201 F	CTGGTCAAATCGAGGTCGT
AthiA1_13201 R	TTCTCTCCATCACGCACAG
AthiA1_14219 F	TGGCTGAGTTCATTGCTGAC
AthiA1_14219 R	TCGTCCAAATCCAGCATACA
AthiA1_14626 F	ATGCAGGATTTCCAGATTC
AthiA1_14626 R	TGAGTATGTCCCGCACAAAA
AthiA1_15675 F	CTGACTCGTCCTACTGAGATT
AthiA1_15675 R	CAACATCTCACCACCAGAAC
AthiA1(13-20)F	TGGCCCGCTTGTATGATTT
AthiA1(13-20)R	TTTCGTAGCCTCCACAGTTATC
AthiA1(24-9)F	TACGATTTCAAGTGGAGTGG
AthiA1(24-9)R	GGTACCGCAGTTGGGTATTT
AthiA1(46-78b)F	TGCAGACGGGTGAAGTAATC
AthiA1(46-78b)R	AGCCTCTGGGAAACACTAAAT
AthiA1(83-30)F	TCCCGATGAGGTGGAAATTTAT
AthiA1(83-30)R	TTGGGACAGCGACTCATAATC
AthiA1(84-35)F	TATCCAGCGACCCGAAATG
AthiA1(84-35)R	TACAGCCCTTGCTCCATAAC
AthiA1(86-8)F	CTATCAAGGGTGGCGGATTAC
AthiA1(86-8)R	CCCAGATAACCTTACCCATCAC
AthiA1(115-12)F	TGGCTCGGGAAGACTATAAGA
AthiA1(115-12)R	ATCATACGCGGCACATCAA
AthiA1(141-36)F	GAGATGCTGTTGGTGGAAATTTG
AthiA1(141-36)R	TAAGCATGGCTGGAATGGAG
AthiA1(FleQ1)F	ATGCGTCTATGGATGGTTATAC
AthiA1(FleQ1)R	AGGGCTTACCACATAATCTAC
AthiA1(FleQ2)F	CCGAAATGAGTCCGCAAATG
AthiA1(FleQ2)R	GAATCCGCTCCTCCAGATTAC
At_MshEN-F	TGCCAGGAAGAGTTTGATTTA
At_MshEN-R	CACCCGAAATCCTTCTCATAG
YajQ_F	AAGTAGATAACGCCCTGCATAC
YajQ_R	CTTTACCAGTCGGGCTGAAA

¹Restriction sites are underlined.

Table S3. Type IV pilin-like protein and pili apparatus subunits encoding genes in *At. thiooxidans*^T. Putative c-di-GMP effectors with PilZ domain are noted with grey background.

Locus¹	BLAST hit
<i>ATHIO_RS16400</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]
<i>ATHIO_RS0105675</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>ATHIO_RS0109125</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. ferrivorans</i> SS3]
<i>ATHIO_RS0110790</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>ATHIO_RS0114620</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]
<i>ATHIO_RS17100</i>	prepilin IVa-type cleavage/methylation domain-containing protein [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]
<i>ATHIO_RS0106075</i>	prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein PilW [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]
<i>ATHIO_RS0106080</i>	prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein PilV [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]
<i>ATHIO_RS0106085</i>	prepilin-type cleavage/methylation domain-containing protein FimT [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]
<i>ATHIO_RS0113585</i>	prepilin IVa-type cleavage/methylation domain-containing protein [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]
<i>ATHIO_RS0113590</i>	prepilin IVa-type cleavage/methylation domain-containing protein [<i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377]

¹ Gene code from NCBI.

Table S4. Putative molecular players for biofilm architecture identified in two iron/sulfur- (orange) and two sulfur- (yellow) oxidizing species of *Acidithiobacillus* ^a.

	<i>Flagella</i>	<i>Cellulose synthase</i>	<i>Pel exopolysaccharide</i>
<i>At. ferrooxidans</i>	-	-	-
<i>At. ferrivorans</i>	+	+	-
<i>At. caldus</i>	+	+	+
<i>At. thiooxidans</i>	+	+	+

^a, Based on this work and references [17, 25; 45]

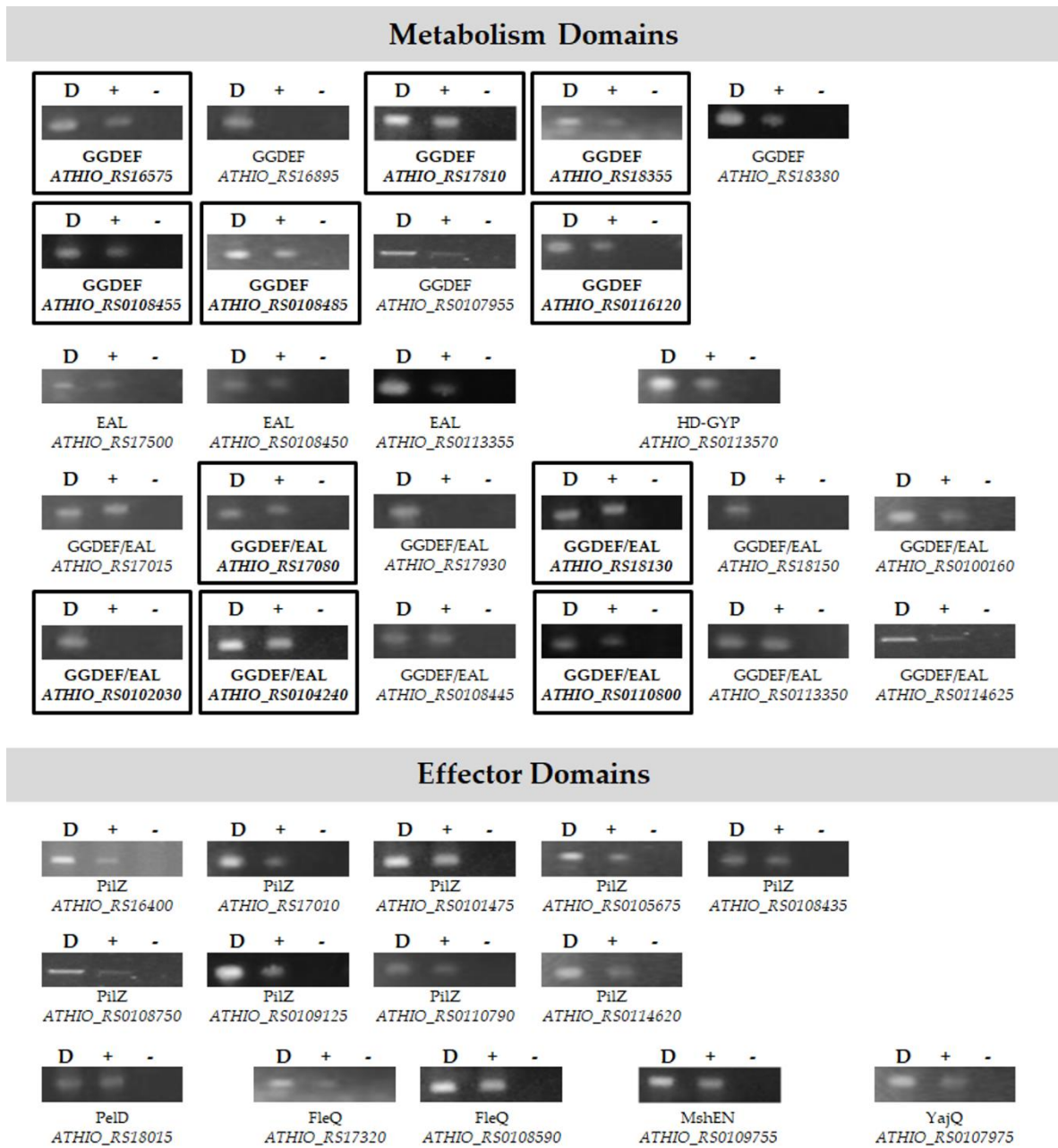


Figure S1. RT-PCR analysis of c-di-GMP metabolism and effectors encoding genes identified in *At. thiooxidans*^T. PCR assays were done with gDNA (D) and cDNA synthesized from total RNA in presence (+) or absence of Reverse Transcriptase (-). Gene code was obtained from NCBI. Black boxes indicate ORFs tested for DGC activity.

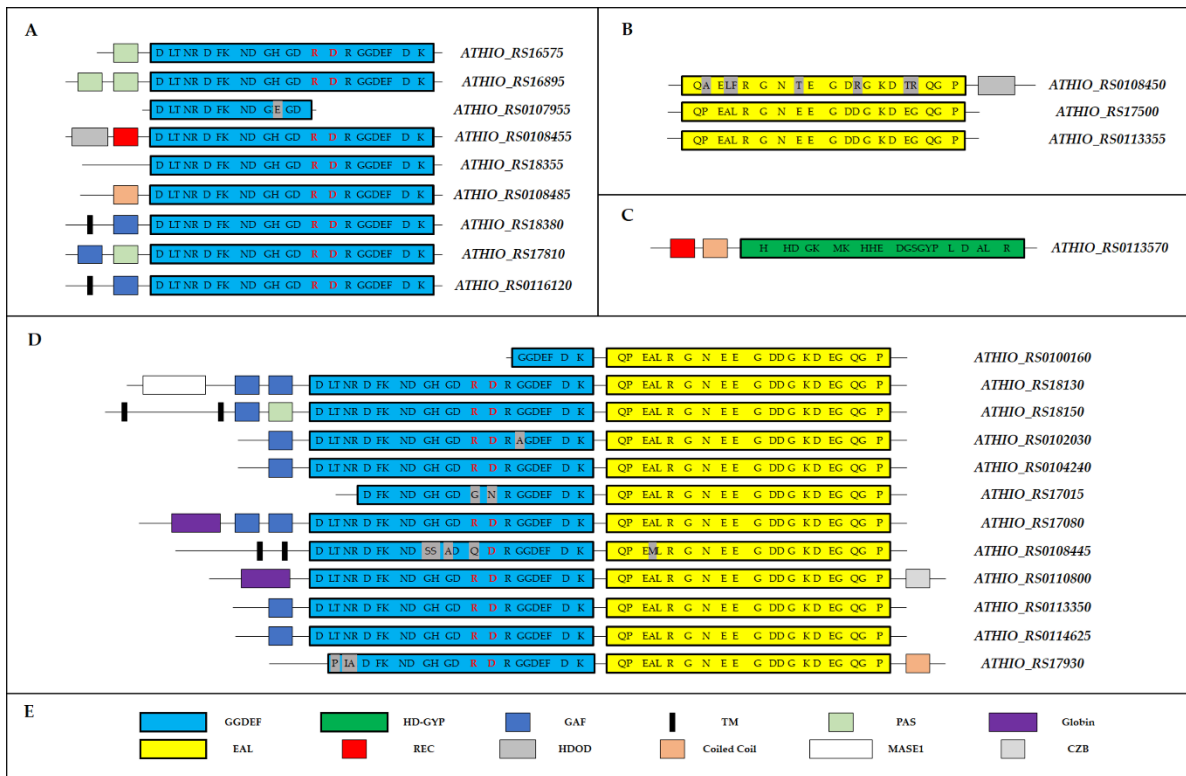


Figure S2. Domain organization of *At. thiooxidans*^T ATCC 19377 proteins involved in c-di-GMP metabolism. Schematic representations of single GGDEF- (A), single EAL- (B), single HD-GYP (C) and GGDEF/EAL- (D) domain containing proteins from *At. thiooxidans*^T. Color codes for the different domains are noted (E). Key aminoacids for catalytic activity are noted and non-conserved aminoacids are marked in grey. Domains are not drawn to scale. TM: transmembrane segment; CZB: chemoreceptor zinc-binding.

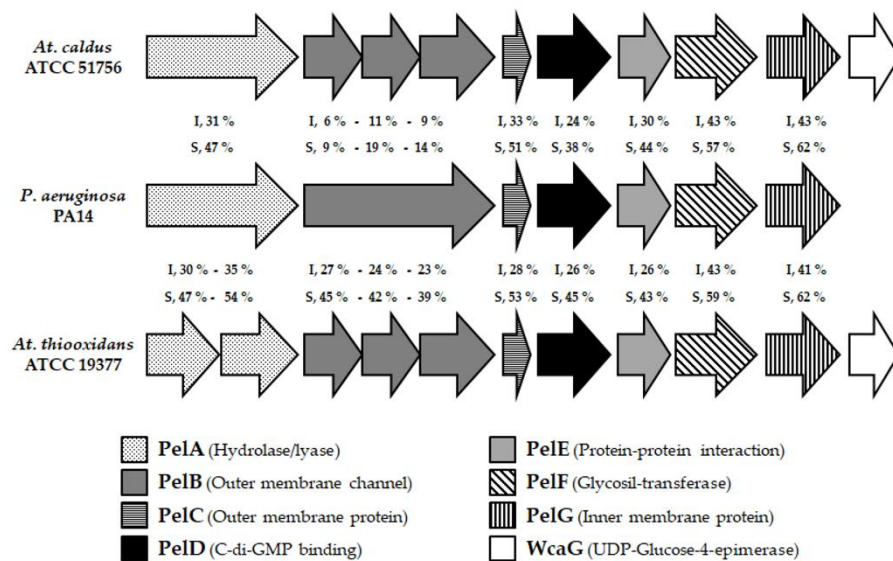


Figure S3. Comparative analysis of *pel* operon structures. Identity and similarity at protein level are noted. *Acidithiobacillus* sequences were obtained from NCBI genome database. Sequencing and/or annotation errors cannot be excluded for PelA and PelB proteins.

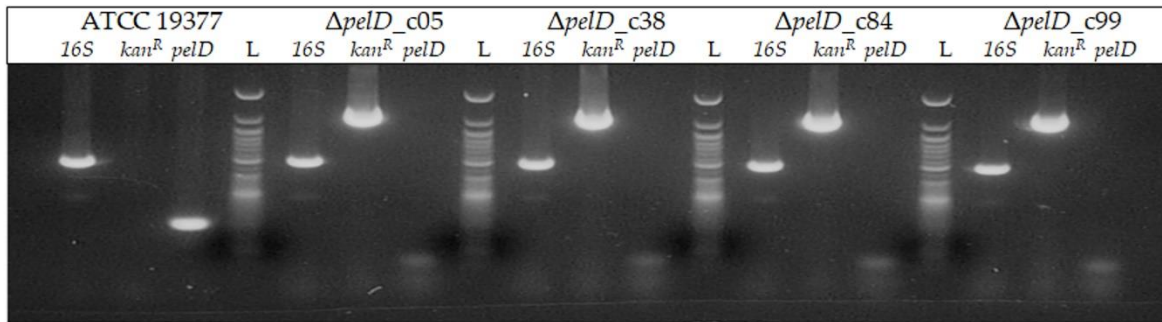


Figure S4. PCR analysis of *At. thiooxidans*^T wild type and the four double recombinant $\Delta pelD$ mutant strains to check double-recombination. DNAs genomic were analyzed with primers for *DNA 16S*, *kan^R* and *pelD* genes for 30 cycles. PCR products were run in 1 % agarose gel in TAE buffer 1X. L: DNA ladder. As expected wild type strain is positive for *DNA 16S* and *pelD* genes while double recombinant are negative for *pelD* gene and positive for *DNA 16S* and *kanR* gene.

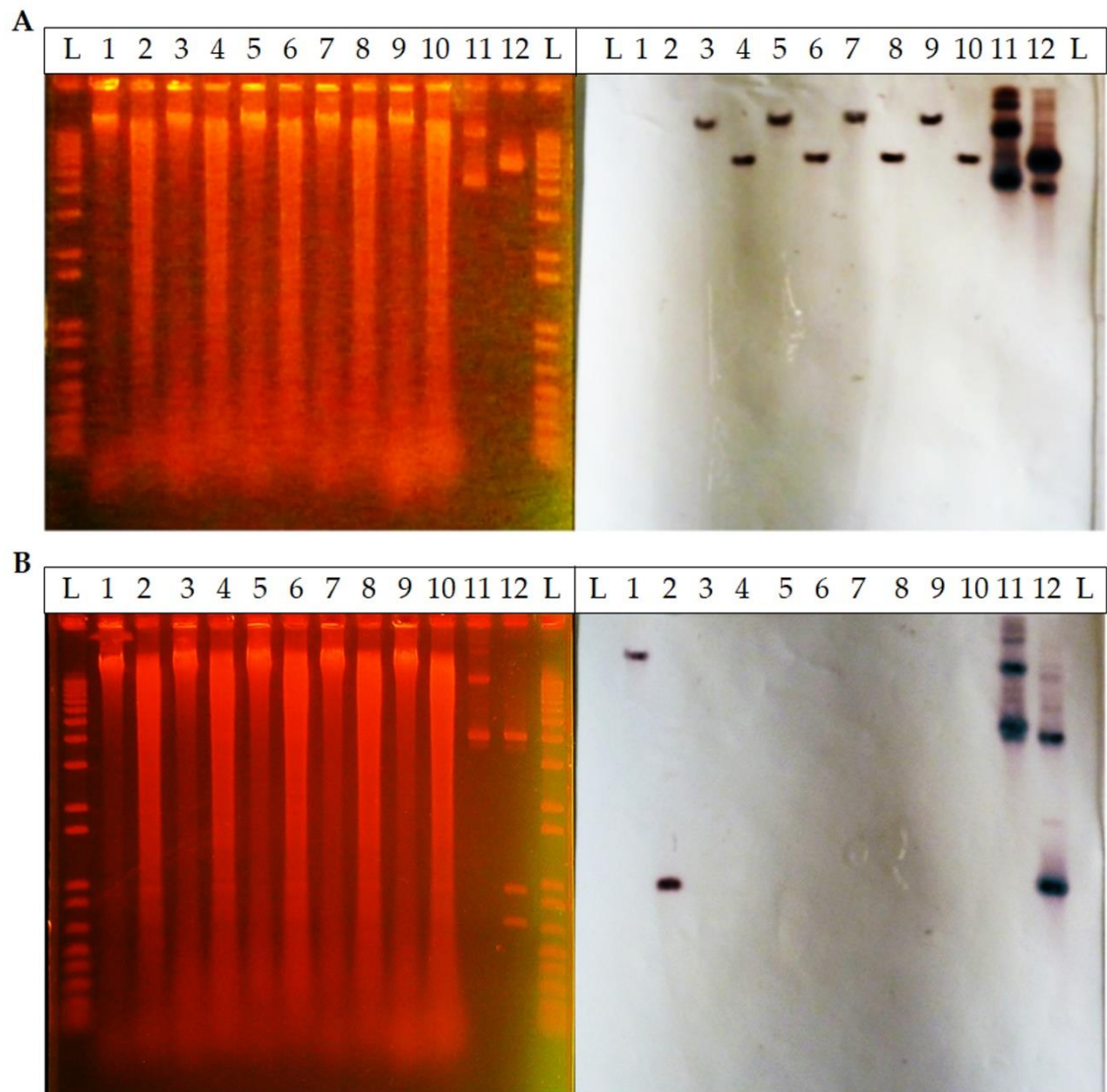


Figure S5. Southern Blot analysis of *At. thiooxidans*^T wild type and the four double recombinant $\Delta pelD$ mutant strains. 10 μ g of genomic DNA no digested (odd numbers) or digested by *Bam*HI (A) or *Sph*I (B) (even numbers) were separated by running a DNA electrophoresis in a 1.5 % agarose gel and stained with GelRed® (left panels). Then DNA fragments were transferred onto nitrocellulose membranes for hybridization experiments with two specific digoxigenin-labelled DNA probes *kan*^R (A) and *pelD* (B). Positive results for *kan*^R and *pelD* probes correspond to 6-kb and 900-bp restriction fragments, respectively (red circles). L: DNA ladder; 1-2: ATCC 19377 DNA; 3-4: $\Delta pelD_{c05}$ 5-6: $\Delta pelD_{c38}$; 7-8: $\Delta pelD_{c84}$; 9-10: $\Delta pelD_{c99}$; 11-12: positive control, pOT plasmids harboring *kan*^R (A) or *pelD* (B) genes.