

UCH - FC
DOC - Microb.
B275
c.1

Estudio de la vía metabólica de la galactosa en
***Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270.**



Tesis presentada a la

UNIVERSIDAD DE CHILE

en cumplimiento de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias

- Mención Microbiología

FACULTAD DE CIENCIAS

Por Marlén Nayibe Barreto Roa

Agosto, 2005

Directores de Tesis

Dr. David S. Holmes

Dra. Eugenia Jedlicki C



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Marlén Nayibe Barreto Roa

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de Junio del 2005.

Directores de Tesis

Dr. David S. Holmes

David S. Holmes
.....

Dra. Eugenia Jedlicki C.

Eugenia Jedlicki
.....

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Carlos Jerez

Carlos Jerez
.....

Dr. Omar Orellana

Omar Orellana
.....

Dr. Michael Seeger

Michael Seeger
.....

Para mi familia y Pato



Marlén Nayibe Barreto Roa nació el 22 de julio de 1976 en Garagoa, pueblo ubicado en la Región de Boyacá, Colombia. Vivió en este lugar hasta los nueve años y luego se trasladó a la ciudad de Bogotá, Colombia, donde finalizó su educación escolar el año 1992. En el año de 1993 ingresó a la Universidad Nacional de Colombia donde cursó sus estudios de pregrado, graduándose el año 1998 con el título profesional de Química Farmacéutica. Posteriormente y por un período de dos años trabajó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, participando en proyectos de investigación relacionados a tecnología de enzimas. El año 1999 postula al programa de becas del Gobierno Alemán (DAAD), lo que le permite en el período 2000-2005 desarrollar sus estudios de post-grado en Santiago de Chile, en el programa de Doctorado en Ciencias Mención Microbiología, de la Universidad de Chile y Universidad de Santiago de Chile.

Actualmente se encuentra radicada en Santiago de Chile.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Chile, a los Profesores del Programa de Microbiología y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por brindarme la oportunidad de completar mis estudios de Doctorado

Al *Dr. David S. Holmes* y la *Dra. Eugenia Jedlicki* por la confianza que depositaron en mi y el apoyo incondicional que siempre me brindaron durante la realización de este trabajo

Al *Dr. Wolfgang Sand* y las personas que trabajan en su laboratorio en la Universidad de Hamburgo en Alemania, por su colaboración en el desarrollo de parte de este trabajo

Al *Dr. Omar Orellana*, por sus siempre oportunas sugerencias durante la realización de este trabajo

A *mis compañeros* de Laboratorio por su disposición para ayudarme siempre y por brindarme su amistad

A *mis amigas Anita, y Claudia* por estar conmigo en los buenos y malos momentos

A *Raquel, Juan Carlos, Pablo, Alberto, Nieves, Elizabeth* y muchos más por los buenos momentos que compartimos

A *mi familia* porque a pesar de la distancia siempre han estado conmigo apoyándome y estimulándome a seguir adelante

A *Pato* por su amor, que siempre me dio fuerza para continuar

INDICE DE MATERIAS



Agradecimientos	iii
Indice de Materias	iv
Indice de Tablas	ix
Indice de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract	xvi
1. INTRODUCCION	
1.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	1
1.2. Interacción bacteria-sustrato	2
1.3. Vías metabólicas involucradas en la producción del EPS	4
1.3.1 Vía metabólica de la galactosa	5
1.3.2 Producción de EPS	10
1.3.3 Relación entre las enzimas de la vía de Leloir y la producción de EPS	13
1.4. Biopelículas	14
1.5. Hipótesis	17
2. MATERIALES Y METODOS	19

2.1. Métodos Bioinformáticos	19
2.2. Métodos Experimentales	20
2.2.1. Cepas	20
2.2.2. Plásmidos y Construcciones	21
2.2.3. Condiciones de cultivo	21
2.2.4. Extracción de ácidos nucleicos	22
2.2.4.1. Obtención de las células	22
2.2.4.2. Obtención de ácidos nucleicos	22
2.2.5. Transcripción reversa	23
2.2.6. Clonamiento	24
2.2.7. Preparación de células competentes	26
2.2.8. Ensayos de actividades enzimáticas	26
2.2.8.1. Preparación de los extractos celulares	26
2.2.8.2. Actividades enzimáticas	27
2.2.8.2.1. Actividad α -fosfoglucomutasa	27
2.2.8.2.2. Actividad UDP-glucosa pirofosforilasa	27
2.2.8.2.3. Actividad UDP-galactosa-4-epimerasa	28
2.2.8.2.4. Actividad galactosa uridiltransferasa	28
2.2.9. Caracterización del EPS producido por <i>A. ferrooxidans</i>	
ATCC 23270	29
2.2.10. Incorporación de ^{14}C -galactosa en EPS	31
2.2.11. Experimentos de unión de <i>A. ferrooxidans</i> a pirita	31

2.2.12. Observación de células de <i>A. ferrooxidans</i> unidas a pirita	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Análisis bioinformático	33
3.1.1. Vía metabólica de la galactosa	33
3.1.2. Vía metabólica de la producción de EPS	43
3.2. Resultados experimentales	53
3.2.1. Funcionalidad de los genes de la vía metabólica de Leloir	53
3.2.1.1. Amplificación y clonamiento de los genes de la vía de Leloir	53
3.2.1.2. Complementación de mutantes	54
3.2.1.3. Determinación de la actividad enzimática de las proteínas de la vía de Leloir	57
3.2.1.4. Identificación del gen <i>galT</i>	58
3.2.2. Ensayos de cotranscripción	59
3.2.3. Determinación de la expresión génica de los genes involucrados en la síntesis del EPS	62
3.2.4. Efecto de la galactosa en el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	64
3.2.5. Incorporación de galactosa a células y a el EPS producido por <i>A. ferrooxidans</i>	65
3.2.6. Efecto de la galactosa en la producción del EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	67
3.2.6.1. Producción del EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	68

3.2.6.2. Efecto de la galactosa en la composición del EPS producido por <i>A. ferrooxidans</i>	69
3.2.6.3. Efecto de la galactosa en la expresión de los genes de la vía de producción del EPS	72
3.2.6.4. Efecto de la presencia de galactosa en la unión de <i>A. ferrooxidans</i> a pirita	74
3.2.6.5. Efecto de la galactosa en la formación de biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> sobre un sustrato sólido	76
4. DISCUSION	79
4.1. La vía de Leloir en <i>A. ferrooxidans</i>	79
4.2. Genes para la síntesis de EPS	85
4.3. Expresión diferencial de los genes involucrados en la síntesis de los precursores del EPS en diferentes condiciones de crecimiento	90
4.4. Efecto de la galactosa en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los precursores de EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	92
4.5. Efecto de la galactosa en la producción y composición del EPS sintetizado por <i>A. ferrooxidans</i>	93
4.6. Unión y formación de biopelículas sobre el sustrato	95
4.7. Modelo para la síntesis del EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	97
5. CONCLUSIONES	100
6. BIBLIOGRAFIA	102
7. ANEXO	108

INDICE DE TABLAS

Tabla. 1 Programas bioinformáticos usados	19
Tabla. 2 Cepas de <i>E. coli</i>	20
Tabla. 3 Plásmidos y clones	21
Tabla. 4 Partidores usados para clonamiento y RT-PCR	25
Tabla. 5 Genes candidatos de estar involucrados en la vía de Leloir en <i>A. ferrooxidans</i>	34
Tabla. 6 Genes involucrados en la vía de síntesis de EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	45
Tabla. 7 Complementación de mutantes	56
Tabla. 8 Actividades enzimáticas	58
Tabla. 9 Incorporación de ¹⁴ C-galactosa en células y EPS de <i>A. ferrooxidans</i>	66
Tabla. 10 Efecto de la galactosa en la producción del EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	69
Tabla. 11 Composición del EPS producido por <i>A. ferrooxidans</i>	70

INDICE DE FIGURAS

Figura	1. Vía metabólica de la galactosa o vía de Leloir	6
Figura	2. Operón galactosa de <i>E. coli</i>	9
Figura	3. Vía metabólica de producción de EPS en bacterias ácido-lácticas	12
Figura	4. Galactosa permeasa de <i>A. ferrooxidans</i>	36
Figura	5. Galactoquinasa	36
Figura	6. UDP-galactosa 4-epimerasa	39
Figura	7. UDP-glucosa pirofosforilasa	40
Figura	8. Operón galactosa de <i>A. ferrooxidans</i>	42
Figura	9. Organización de los genes del cluster de producción de EPS	48
Figura	10. Translocación del EPS	50
Figura	11. Región c-terminal de las proteínas Wzc	52
Figura	12. Curvas de crecimiento en medio mínimo suplementado con galactosa 0,5%	56
Figura	13. Contexto genético del gen <i>galT</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	59
Figura	14. Cotranscripción del operón galactosa de <i>A. ferrooxidans</i>	60
Figura	15. Cotranscripción de los genes involucrados en la síntesis de LPS en <i>A. ferrooxidans</i>	61
Figura	16. Expresión de los genes de la vía metabólica de la galactosa de <i>A. ferrooxidans</i>	63
Figura	17. Expresión de los genes del operón involucrado en la síntesis de LPS en <i>A. ferrooxidans</i>	64
Figura	18. Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de galactosa	65
Figura	19. Cromatogramas del EPS producido por <i>A. ferrooxidans</i>	71
Figura	20. RT-PCR de los genes involucrados en la síntesis de los precursores de EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	73
Figura	21. Porcentaje de células de <i>A. ferrooxidans</i> unidas a pirita	75

Figura 22. Observación de biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> generadas en pirita por microscopía de fuerza atómica (AFM)	77
Figura 23. Observación de las biopelículas de <i>A. ferrooxidans</i> producidas en pirita por microscopía de fluorescencia	78
Figura 24. Organización del operón galactosa en <i>A. ferrooxidans</i> , <i>E. coli</i> , <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
Figura 25 Modelo de síntesis del EPS en <i>A. ferrooxidans</i>	99

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp,	Ampicilina
BSA,	Seroalbúmina bovina
COG,	Cluster de genes ortólogos
EDTA,	Acido etilén diaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
Gal,	Galactosa
Glu,	Glucosa
LAB	Bacterias Acido Lácticas
LB,	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
OD,	Densidad óptica
ON,	Toda la noche
ORF,	Marco abierto de lectura
pb,	Pares de bases
RT,	Transcripción reversa
SD,	Shine Dalgarno
SDS,	Dodecilsulfato de sodio
Tris,	Tris (hidroximetil) aminometano

RESUMEN

Los microorganismos son usados comercialmente para extraer cobre, zinc, uranio, níquel y cobalto a partir de los sulfuros metálicos respectivos, proceso conocido como biolixiviación. Uno de los microorganismos más estudiados involucrado en el proceso de biolixiviación es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, anteriormente denominado *Thiobacillus ferrooxidans*. *A. ferrooxidans* es una γ -proteobacteria quimiolitotrófica que obtiene la energía y los electrones por la oxidación de compuestos reducidos de azufre a sulfato y de Fe II a Fe III. Esta bacteria es mesófila, aerobia facultativa y capaz de fijar CO₂ y N₂ atmosférico para obtener el carbono y el nitrógeno celular.

La unión y adherencia de *A. ferrooxidans* a la superficie del mineral, con la subsiguiente formación de biopelículas, son prerequisites para que la disolución del metal ocurra, tanto en operaciones industriales como en ambientes naturales. La formación de biopelículas está acompañada de la producción de polisacáridos extracelulares (EPS). Mientras que el papel de la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* en la solubilización de metales ha sido ampliamente estudiada, poco se sabe de la genética subyacente, la bioquímica y la regulación de formación EPS por este microorganismo. Esta carencia de información propició los estudios realizados en esta en esta tesis.

En la bacteria autótrofa *A. ferrooxidans* se ha identificado un loci de cinco genes pertenecientes a la vía de Leloir, cuya función propuesta es la de generar los precursores para la síntesis de EPS. El orden de los genes es *luxA-galE-galK-pgm-galM* y codifican

para las proteínas LuxA, UDP-glucosa 4-epimerasa, galactoquinasa, fosfoglucomutasa y galactosa mutarotasa, respectivamente. Los genes de este loci forman parte de una sola unidad transcripcional, por lo tanto estarían formando parte de un operón. En el genoma de la bacteria se identificaron otros dos genes pertenecientes a la vía de Leloir y que no forman parte de este operón, *galU* potencialmente codificando la UDP-glucosa pirofosforilasa y el probable gen *galT* que codificaría para una galactosa-1-fosfato uridiltransferasa. Usando RT-PCR semicuantitativo, se demostró que los genes del operón gal pueden ser expresados en mayor nivel durante el crecimiento en el medio de hierro comparado al crecimiento en el medio de azufre. Las funciones de *galE*, *pgm*, *galU* y *galT* fueron validadas por complementación de las mutantes de los respectivos genes homólogos en *Escherichia coli* y por ensayos de medición de la actividad enzimática. Los datos sugieren que *A. ferrooxidans* es capaz de sintetizar los precursores de EPS, UDP-glucosa y UDP-galactosa. Además, la presencia de los genes *rfbA*, *B*, *C* y *D* sugiere que también puede sintetizar dTDP-ramnosa, otro precursor para la síntesis del EPS.

Por análisis bioinformático se identificaron en el genoma de *A. ferrooxidans* los genes y las vías metabólicas involucradas en la síntesis del EPS. Por RT-PCR se comprobó que un loci de genes involucrados en la síntesis de los precursores del EPS, está formando parte de dos operones independientes. El primer operón esta implicado en la síntesis del anclador lipídico sobre el cual las unidades repetitivas del EPS son ensambladas, e incluye el gen *uppS*, potencialmente codificando la undecaprenil fosfato sintetasa, juntos con los genes asociados a la formación del anclador *cdsA*, *dxr* y *pirH*. Este operón es expresado en mayor nivel cuando las células son cultivadas en el medio

que contiene sulfato de hierro comparado con el medio en azufre. El segundo operón predicho está implicado en la síntesis de los lipopolisacáridos (LPS). Además, se identificaron los genes candidatos *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx* y *wzy*. En otros organismos los productos de estos genes están formando el complejo "flippase" que está implicado en la inversión, polimerización y exportación de precursores EPS a través de la membrana interna con la regeneración simultánea del anclador lipídico.

El efecto de la galactosa sobre la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* en pirita fue evaluado por microscopía de fuerza atómica y de fluorescencia, comparando las biopelículas generadas por la bacteria en presencia y ausencia de galactosa exógena. El análisis de los genes y de las vías metabólicas propuestas sugiere que la bacteria puede usar varios caminos para la síntesis del EPS, mediante los cuales el organismo puede integrar la formación de las biopelículas con el metabolismo central del carbono. Esto le permitiría regular la composición del EPS según las exigencias fisiológicas y ambientales.

Debido a que el EPS es el componente principal de una biopelícula, se espera que este estudio proporcione un modelo inicial de las vías metabólicas implicadas en la formación del EPS en *A. ferrooxidans*, lo que ayudará en el entendimiento del papel de las biopelículas en el proceso de biolixiviación y en la biominería.

ABSTRACT

Microorganisms are used commercially to extract copper, zinc, uranium, nickel and cobalt from low-grade or difficult-to-process sulfide ores or mineral concentrates by a process known as bioleaching. One of the most studied microorganisms involved in bioleaching is *Acidithiobacillus ferrooxidans*, formerly called *Thiobacillus ferrooxidans*. *A. ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic, γ -proteobacterium that obtains energy and electrons by the oxidation of reduced sulfur compounds to sulfate or FeII to FeIII. It is a mesophilic, facultative aerobe that fixes atmospheric CO₂ and N₂ to provide cellular carbon and nitrogen.

The attachment and adherence of *A. ferrooxidans* to mineral surfaces and the subsequent formation of biofilms are prerequisites to mineral dissolution, both in industrial operations and in natural environments. Biofilm formation is accompanied by the production of extracellular polysaccharides (EPS). Whereas the role of biofilm formation by *A. ferrooxidans* in metal solubilization has been actively studied, little is known regarding the underlying genetics, biochemistry and regulation of EPS formation by this microorganism. This lack of information prompted the studies reported in this thesis.

A cluster of five genes, proposed to be involved in the formation of extracellular polysaccharide (EPS) precursors via the Leloir pathway, have been identified in the acidophilic, autotroph *A. ferrooxidans*. The order of the genes is *luxA-galE-galK-pgm-galM* encoding a LuxA-like protein, UDP-glucose 4-epimerase,

galactokinase, phosphoglucomutase and galactose mutarotase, respectively. The *gal* cluster forms a single transcriptional unit and is therefore an operon. Two other putative genes of the Leloir pathway, *galU* potentially encoding UDP-glucose pyrophosphorylase and a *galT-like* gene that may encode a galactose-1-phosphate uridylyltransferase-like activity were found unlinked in the genome. Using semi-quantitative RT-PCR, the genes of the *gal* operon were shown to be expressed more during growth in iron medium compared to growth in sulfur medium. The functions of *galE*, *pgm*, *galU* and the *galT-like* gene were validated by complementation of *Escherichia coli* mutants and by *in vitro* enzyme assays. The data suggest that *A. ferrooxidans* is capable of synthesizing the EPS precursors UDP-glucose and UDP-galactose. In addition, genes *rfbA,B,C* and *D* were identified in the genome of *A. ferrooxidans* suggesting that it can also synthesize the EPS precursor dTDP-rhamnose.

Genes and metabolic pathways potentially involved in the formation of extracellular polysaccharides (EPS) from modified nucleotide sugar precursors were also identified by bioinformatic analysis in the genome of *A. ferrooxidans*. Two independent clusters of genes predicted to be involved in the synthesis of EPS precursors were each shown to be transcriptional units or operons by RT-PCR analysis. The first operon is suggested to be involved in the synthesis of the lipid anchor on which the repeating units of the EPS are assembled and includes *uppS*, potentially encoding undecaprenyl pyrophosphate synthetase, together with the associated anchor formation genes *cdsA*, *dxr* and *pirH*. This operon is expressed more when cells are grown in medium containing iron sulfate versus sulfur. The

second operon is predicted to be involved in the synthesis of lipopolysaccharides. In addition, putative genes *wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx* and *wzy* were identified. In other organisms it has been shown that the products of these genes form the "flippase" complex that is involved in the inversion, polymerization and exportation of EPS precursors through the inner membrane with the concurrent regeneration of the lipid anchor. Given the similarity of the putative Wzabcxy proteins of *A. ferrooxidans* with predicted orthologs, we speculate that they also form the flippase complex in this organism.

A possible role for galactose in the biosynthesis of EPS and in subsequent biofilm formation was suggested and was supported by fluorescence microscopy examination and atomic force microscopy of biofilms produced on pyrite in the presence or absence of exogenous galactose. Analysis of the proposed genes and metabolic pathways suggests various ways in which the organism can integrate biofilm formation with central carbon metabolism and how it might be able to regulate biofilm composition according to physiological and environmental requirements

Since EPS constitute the major bulk of biofilms, it is hoped that this study will provide an initial model for the metabolic pathways involved in EPS formation in *A. ferrooxidans* and will aid in understanding the role of biofilms in mineral leaching and the formation of acid mine drainage.

1. INTRODUCCION

1.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Especial interés ha despertado el estudio de la bacteria *A. ferrooxidans* debido principalmente a la utilidad que tiene en procesos biomineros (Rawlings y Kusano, 1994). Esta bacteria tiene la capacidad de atacar sulfuros metálicos, es decir solubiliza el metal generando el sulfato metálico correspondiente, iones férrico y ácido sulfúrico, proceso conocido como biolixiviación (Holmes, 1999). El proceso de biolixiviación es llevado a cabo por un consorcio de bacterias como *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Ferroplasma acidarmanus* y otras bacterias heterotróficas pertenecientes al genero *Acidiphilium*. Sin embargo *A. ferrooxidans* es considerado uno de los miembros más importante del consorcio (Gehrke *et al.*, 1998), razón por la cual su genoma ha sido secuenciado ([http:// www.tigr.org/](http://www.tigr.org/)).

A. ferrooxidans es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia de las γ -proteobacterias, acidófila, mesófila, capaz de fijar CO_2 y N_2 atmosférico (Rawlings y Kusano, 1994, Irazabal *et al.*, 1997, Holmes, 1999). La energía necesaria para su crecimiento y metabolismo celular la obtiene de la oxidación de compuestos reducidos de azufre e iones ferroso usando como agente oxidante el oxígeno (Elbehti *et al.*, 2000). Esta bacteria ha sido clasificada como un autótrofo estricto. Los trabajos en los que se ha descrito la capacidad de la bacteria para crecer utilizando como fuente de energía compuestos orgánicos, se consideraron erróneos porque probablemente estaban

contaminados con bacterias acidófilas heterotróficas. En general los compuestos orgánicos inhiben el crecimiento de la bacteria (Rawlings, 1994).

Debido a la naturaleza sólida de muchos de los sustratos usados por la bacteria, ella tiene la necesidad de crear estrategias para mantenerse en estrecho contacto con los mismos. Una de estas estrategias es la formación de biopelículas, en las cuales se presentan condiciones especiales de disponibilidad de nutrientes.

1.2 Interacción bacteria-sustrato

Poco se conoce acerca de cómo ocurre la interacción entre la bacteria y un sustrato sólido. Se sabe que están involucrados procesos interfaciales como las interacciones electroquímicas, bioquímicas y mecanismos superficie específicos (Gehrke *et al.*, 1998).

Se ha postulado que existen dos mecanismos de disolución del metal, denominados de “contacto” y de “no contacto”. El mecanismo de “no contacto” es llevado a cabo por las células planctónicas, las que oxidan iones ferroso en solución. Los iones férrico resultantes entran en contacto con la superficie del mineral donde son reducidos nuevamente entrando a un nuevo ciclo, mecanismo que fue denominado anteriormente como indirecto. El mecanismo de “contacto” tiene en cuenta que muchas de las células están unidas a la superficie del mineral. El proceso electroquímico que resulta en la disolución del metal ocurre en la interfase entre la membrana celular y la superficie del sulfuro metálico. En ambos mecanismos la bacteria contribuye a la disolución del metal generando el agente oxidante (iones férrico), y luego oxidando los sulfuros resultantes de la disolución del metal (Rohwerder *et al.*, 2003). También se ha

comprobado que la formación de una capa orgánica sobre el sustrato sólido es crítica para que el proceso de disolución ocurra (Gehrke *et al.*, 1998; Sand *et al.*, 1999). Esta fase orgánica estaría compuesta fundamentalmente por exopolisacáridos (EPS), cuya presencia en el área de contacto entre la célula bacteriana y el sustrato es un prerequisite para la disolución del metal. De esta manera los EPS se consideran macromoléculas de gran importancia en la interacción sólido-bacteria (Gehrke *et al.*, 1998; Sand *et al.*, 1999; Coto *et al.*, 1999).

Se comprobó que la composición del EPS en *A. ferrooxidans* cepa R1 cambia dependiendo del tipo del sustrato en el que crece la bacteria (Gehrke *et al.*, 1998). Esto se explica porque el modo de adhesión de las células que crecen en azufre es distinto al de las células que crecen en pirita, lo que podría estar influenciando la expresión diferencial de genes involucrados en la síntesis de EPS en las dos condiciones de crecimiento (Gehrke *et al.*, 1998).

El EPS sintetizado por *A. ferrooxidans* cepa R1 en pirita se caracteriza por estar compuesto por ácido glucorónico acomplejado a iones férrico (Gehrke *et al.*, 1998). Se cree que los iones férrico se unen al ácido glucorónico que compone el EPS en una relación molar 2:1 generando una carga neta positiva, que le permite a la bacteria una interacción electroquímica con el sustrato. Adicionalmente, el EPS de las células crecidas en pirita estaría compuesto por una variedad de azúcares neutras y ácidos grasos. En el EPS de las células crecidas en azufre, la cantidad de ácido glucorónico disminuye drásticamente, y además no está complejado a iones férrico, lo que ocasiona que las células que crecen en azufre no se puedan unir a pirita debido a la diferencia de la carga del EPS sintetizado en las dos condiciones. Se ha descrito que en el EPS de la

bacteria crecida en azufre el contenido de fosfatos aumenta y la variedad de los azúcares disminuye, siendo la glucosa el único azúcar que lo compone. También se presenta un considerable aumento en la cantidad de ácidos grasos presentes, convirtiéndose en el mayor componente del EPS (Sand y Gehrke, 1999). Por otra parte, la cantidad de EPS producida en las dos condiciones es diferente, ya que en las células crecidas en azufre la producción es 13 veces más baja que en pirita (Gehrke *et al.*, 1998; Sand *et al.*, 1999).

1.3 Vías Metabólicas involucradas en la producción del EPS

En las bacterias productoras de EPS se sabe que las unidades de construcción de estas moléculas son los galactósidos, UDP-glucosa y UDP galactosa. Estas moléculas son de importancia en la construcción de diferentes estructuras de la superficie bacteriana. Las enzimas encargadas de su biosíntesis son la UDP-glucosa pirofosforilasa (GalU) y la UDP-glucosa 4-epimerasa (GalE). En algunas bacterias, GalU y GalE forman parte de la vía catabólica de la galactosa exógena, por lo que se postula que la vía metabólica de la galactosa, también conocida como vía de Leloir, cumpliría una doble función. Por una parte la galactosa puede ser usada como fuente de carbono y energía, y por otra, los metabolitos intermediarios generados a partir de ella harían parte de la vía anabólica del metabolismo de carbohidratos, ya sea en la síntesis de lipopolisacáridos, de componentes de la pared celular y de los EPS (Bettenbrock y Alpert, 1998). Estos galactósidos también pueden ser obtenidos a partir de la glucosa por la acción de la fosfoglucomutasa (PGM), enzima que conecta la glicólisis con la vía de

Leloir, y que permite la obtención de glucosa 1-P a partir de glucosa 6-P (Figura 1) (Levander *et al.*, 2002).

1.3.1 Vía metabólica de la galactosa

La galactosa puede entrar a la célula a través de seis sistemas de transporte diferentes. En *E. coli* se sabe que la galactosa es transportada por dos sistemas de transporte específicos, uno de alta afinidad ($K_m=1 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad ($K_m= 50\text{-}450 \mu\text{M}$) (Weickert y Adhya, 1993). El transporte de alta afinidad es logrado por la acción de tres proteínas del sistema permeasa metil-D-galactósido codificado por el operón *mgl*, mientras que el sistema de baja afinidad es facilitado por la galactosa permeasa, producto del gen *galP*, y donde el transporte se realiza a través de un sistema simporte, asociado a la entrada de protones. Además, la galactosa puede ser transportada inespecíficamente y con baja eficiencia por otros cuatro sistemas de transporte, tres de los cuales pertenecen a la familia de los transportadores protón-simporte como AraE, LacY y MelB, los cuales transportan los azúcares arabinosa, lactosa y melobiosa respectivamente (Weickert y Adhya, 1993). El otro sistema de transporte, *araFGH*, es de alta afinidad por arabinosa y transporta inespecíficamente la galactosa (Horne y Henderson, 1983).

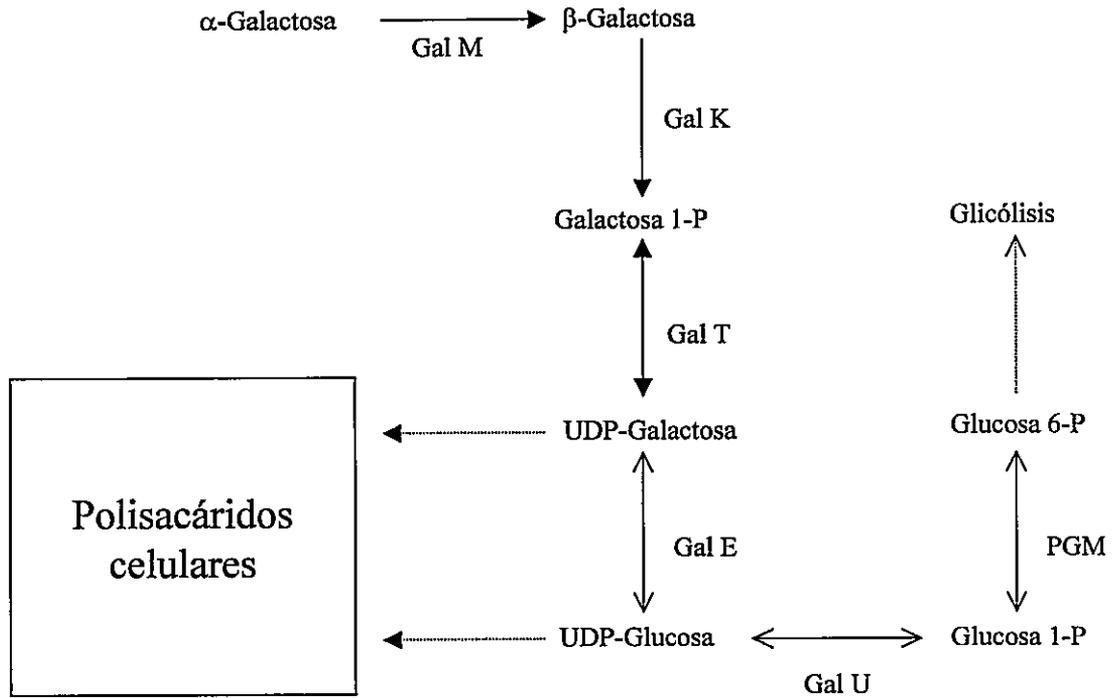


Figura 1. Vía metabólica de la galactosa o vía de Leloir. GalP, Galactosa permeasa; GalK, galactoquinasa; GalT, galactosa 1-fosfato-uridil-transferasa; GalE, UDP-galactosa-4 epimerasa; GalU, UDP-glucosa pirofosforilasa; PGM, fosfoglucomutasa.

La galactosa también puede ser liberada al citoplasma celular como producto de hidrólisis de galactósidos internalizados, tales como lactosa, melibiosa o rafinosa. La hidrólisis de los β -galactósidos genera β -D-galactosa, la cual es convertida a α -D galactosa por la aldosa 1-epimerasa (GalM), reacción con la que se da inicio a la vía de Leloir.

La vía de Leloir permite el metabolismo de galactosa generando glucosa 6-fosfato, producto que entra a la vía de la glicólisis. Como productos intermediarios de la vía de Leloir están la UDP-glucosa y la UDP-galactosa que son precursores de la síntesis de los polisacáridos celulares (Figura 1) (Boels *et al.*, 2001).

La importancia de la vía de Leloir radica en que a partir de la galactosa se producen los intermediarios de la síntesis de los EPS y además se generan la glucosa 1-fosfato y la glucosa 6-P, que son productos que conectan la vía de Leloir con la glicólisis y la vía de las pentosas. Adicionalmente, en ausencia de galactosa los genes de la vía de Leloir aseguran la producción de UDP-glucosa y UDP-galactosa a partir de glucosa 6-P, ya que las enzimas de esta vía metabólica catalizan reacciones que son reversibles (Figura 1) (Bettenbrock y Alpert, 1998).

En las bacterias, los genes pertenecientes a la vía de Leloir están organizados en el operón denominado operón galactosa, pero su organización es especie-específica. En *E. coli* los genes involucrados en el transporte específico de galactosa (*galP* y el operón *mgl*) y el operón galactosa (*galETKM*) hacen parte del regulón galactosa (regulón gal). Sin embargo, los genes *galU* y *pgm* no están sujetos a regulación por galactosa. Los reguladores del regulón gal son: el represor gal (GalR), el isorrepresor gal (GalS) y la

proteína de unión a AMP_c (CAP). El operón galactosa tiene dos promotores: P₁ y P₂, que son reconocidos por los tres reguladores del operón. En ausencia de galactosa, GalR y GalS regulan negativamente la transcripción desde P₁ y P₂. La proteína CAP, en tanto, actúa como un complejo con AMP_c, estimulando la transcripción en ausencia de glucosa a partir de P₁, pero la inhibe a partir de P₂ (Weickert y Adhya, 1993) (Figura 2). En *E. coli*, a pesar que los genes del operón gal son traducidos a partir de un mRNA policistrónico, la síntesis relativa de las enzimas del operón cambia bajo diferentes condiciones metabólicas, fenómeno que se ha denominado expresión descoordinada. Cuando los niveles de cAMP disminuyen debido a mutaciones (*cya*) o por represión catabólica, los niveles de GalK y GalT disminuyen mientras que los de GalE permanecen altos. Se produce un incremento en la relación GalE-GalK de cuatro veces. Esto se debe a que el complejo AMP_c-CAP regula negativamente la expresión del gen *spf*, cuyo producto es un RNA antisentido conocido como Spot 42. Este RNA se une específicamente a la región Shine-Dalgarno del gen *galK*, en el mRNA policistrónico del operón gal, bloqueando su unión al ribosoma e inhibiendo su traducción (Moller *et al.*, 2002). Este tipo de regulación se ejerce con el fin de mantener niveles altos de GalE en la célula, generando la UDP-galactosa necesaria para las glicosilaciones biosintéticas, evitando producir enzimas que no se necesitan en determinadas condiciones metabólicas como por ejemplo en presencia de glucosa u otro azúcar (Moller *et al.*, 2002).

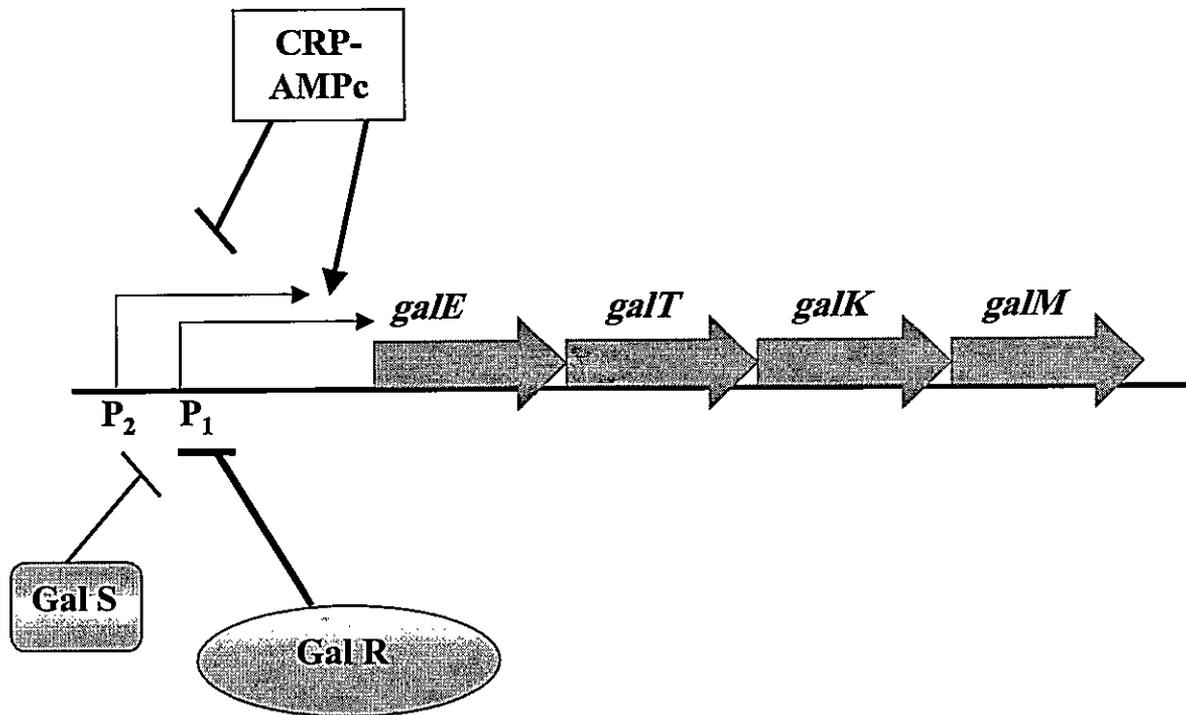


Figura 2. Organización y regulación del Operón galactosa de *E. coli*. → Regulación Positiva. —| Regulación negativa. P_1 y P_2 , promotores 1 y 2 del operón. GalE, UDP-galactosa -4epimerasa; GalT, galactosa 1-fosfato-uridil-transferasa; GalK, galactoquinasa; GalU, UDP -glucosa pirofosforilasa; GalM, aldosa 1-epimerasa.

1.3.2. Producción de EPS

Los EPS son polisacáridos bacterianos que se excretan extracelularmente y que pueden permanecer asociados a la superficie celular en forma de cápsula o liberados al medio. En las bacterias ácido-lácticas y termófilas, se ha visto que la síntesis del EPS ocurre durante la fase exponencial de crecimiento y en general su vía de biosíntesis es bastante compleja, explicando el escaso conocimiento al respecto (Degeest and De Vuyst, 2000)

La biosíntesis de los EPS comienza con la formación de los precursores galactósidos, los cuales son ensamblados repetitivamente sobre un anclador lipídico (Glucksmann *et al.*, 1993, Whitfield y Paiment, 2003). En bacterias gram negativas, este anclador lipídico está localizado en la membrana citoplasmática y la molécula que actúa como tal es el undecaprenil fosfato (Broadbent *et al.*, 2003). Cuando la unidad básica repetitiva es ensamblada, el intermediario anclado a la membrana es translocado a través de ella y la polimerización es finalizada en la cara periplasmática de la membrana interna (Figura 3) (Looijesteijn *et al.*, 1999, Broadbent *et al.*, 2003).

La biosíntesis de EPS es un proceso con un gran gasto energético que involucra un gran número de enzimas. Entre ellas, están las encargadas de la producción de los precursores o azúcares activados, una glicosil-1-fosfato transferasa que transfiere el primer azúcar al anclador lipídico fosforilado, diferentes glicosiltransferasas que adicionan secuencialmente los diferentes azúcares a la unidad repetitiva creciente, y enzimas involucradas en la regulación del largo de cadena del polisacárido, en la translocación a nivel de membrana y en la maduración de EPS. Las proteínas que participan en estas reacciones generalmente tienen funciones adicionales en otros

procesos celulares. Este es el caso de las enzimas “housekeeping” que participan en la formación de los UDP-azúcares y en la síntesis de moléculas como el anclador lipídico, que son requeridas para la síntesis de otros polímeros (Looijesteijn *et al.*, 1999, Boels *et al.*, 2001, Broadbent *et al.*, 2003). Estas enzimas podrían ser las limitantes en la producción de EPS, ya que la disponibilidad de los nucleótidos de azúcar determina la cantidad del EPS generado.

Los genes involucrados en la biosíntesis de EPS están organizados en locus genéticos que son generalmente conservados. Estos locus genéticos se caracterizan por poseer una región conservada donde están los genes involucrados en la regulación, la determinación del largo de cadena del polímero y la exportación, seguido de una región variable correspondiente a los genes que codifican para las glicosiltransferasas y las enzimas que participan en la polimerización y translocación del EPS (Boels *et al.*, 2001, Levander *et al.*, 2002).

Son muchos los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de los polisacáridos de la superficie celular pero son muy pocos los que se han caracterizado con respecto a la función de las glicosiltransferasas (GTFs) (Kranenburg *et al.*, 1999).

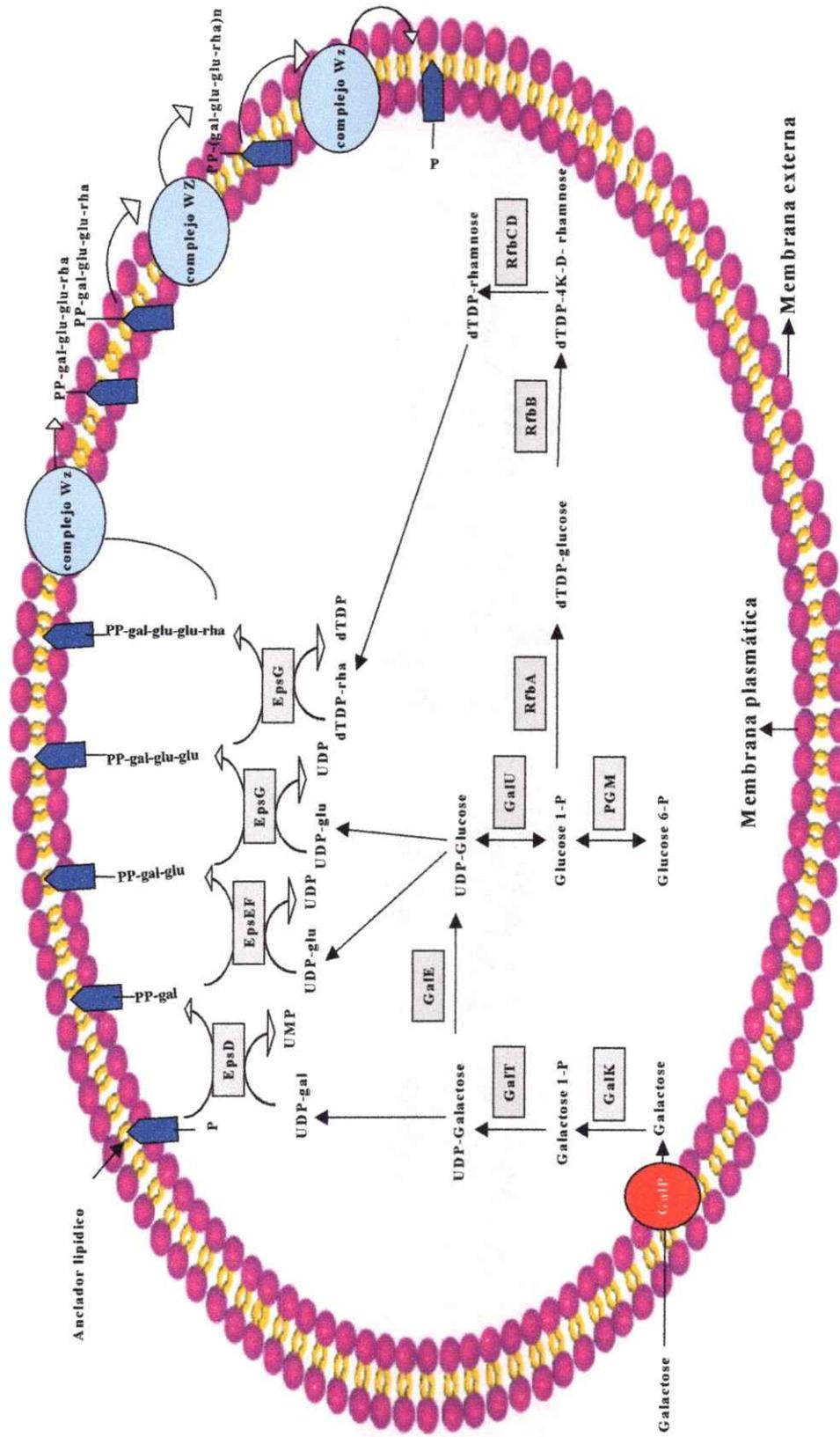


Figura 3. Representación esquemática de la vía metabólica de producción de exopolisacáridos en las bacterias ácido-lácticas (Laws *et al.*, 2001).

1.3.3 Relación entre las enzimas de la vía de Leloir y la producción de EPS

La disponibilidad de los precursores necesarios para la síntesis de EPS es el paso limitante en su biosíntesis. Se ha tratado de encontrar la relación entre la actividad enzimática de las proteínas de la vía de Leloir y la cantidad de EPS generado. En las bacterias acidolácticas (LAB) se han realizado el mayor número de estudios. Es el caso del *Streptococcus thermophilus* LY03, donde se encontró que la cantidad de EPS dependía de la actividad de tres enzimas: α -fosfoglucomutasa, UDP-glucosa epimerasa y UDP-glucosa pirofosforilasa (Degeest y De Vuyst, 2000; Levander *et al.*, 2002). La importancia de la α -fosfoglucomutasa radica en que es la enzima responsable de unir la vía catabólica con la vía anabólica en el metabolismo de azúcares, mientras que las otras dos enzimas son las encargadas de generar los galactósidos (Degeest y De Vuyst, 2000).

Es importante destacar que la presencia de los genes de la vía de Leloir no necesariamente implica que la bacteria sea capaz de utilizar la galactosa como fuente de energía. En *S. thermophilus* se ha descrito que a pesar que posee los genes necesarios para el catabolismo de la galactosa, muchas cepas de esta bacteria son incapaces de usar la galactosa como única fuente de energía. En esta especie las actividades enzimáticas de las proteínas de la vía de Leloir son bajas, por lo que se ha postulado que en *S. thermophilus* el rol primario de estas enzimas es la generación de los intermediarios de síntesis necesarios para el ensamblaje de los EPS y otros polímeros celulares (Vaughan *et al.*, 2001; Vaillancourt *et al.*, 2002 y Broadbent *et al.*, 2003).



1.4 Biopelículas

La pirita es uno de los minerales más abundantes en la superficie terrestre (Schrenk *et al.*, 1998). Por esta razón, ha sido uno de los más estudiados con respecto a la actividad bacteriana en su superficie para así entender y mejorar los procesos de biolixiviación (Liu *et al.*, 2003). Los mecanismos de disolución de la pirita por acción bacteriana implican no solamente un ataque electroquímico por parte de los iones ferroso y férrico, sino que también involucra un contacto físico entre la bacteria y el sulfuro metálico bajo condiciones aeróbicas con la formación de biopelículas (Liu *et al.*, 2003).

Las bacterias tienen la capacidad de cambiar su estilo de vida libre (células planctónicas), en medio líquido, a una vida multicelular asociada a una superficie, conocida como biopelícula (Webb *et al.*, 2003). Las células que hacen parte de una biopelícula se diferencian notablemente de las células de vida libre. Aquí las bacterias se encuentran ensambladas, rodeadas por una matriz extracelular (EPS), formando una estructura compleja y multicelular (microcolonias), rodeadas por una red de canales de agua (Donlan, 2002, Webb *et al.*, 2003).

Las biopelículas están compuestas principalmente por células bacterianas, EPS, que son el componente principal de la matriz extracelular, y sustancias poliméricas que incluyen ácidos nucleicos y proteínas (Friedman y Kolter, 2004). El EPS podría llegar a constituir entre el 50% y el 90% del carbono orgánico total en la matriz y éste puede variar con respecto a su composición química y a sus propiedades físicas. Estos cambios de composición están influenciados por las condiciones ambientales y por los microorganismos presentes en la biopelícula (Donlan, 2002, Parsek y Fuqua, 2004).

Presumiblemente, bajo condiciones adecuadas, las células pueden influenciar su entorno químico y físico secretando macromoléculas específicas al medio, EPS, enzimas, señales de comunicación intercelular, etc. Adicionalmente el medio también puede verse afectado por las macromoléculas liberadas a la matriz extracelular como consecuencia de la lisis celular en las microcolonias, como polisacáridos, proteínas, compuestos orgánicos, etc. (Parsek y Fuqua, 2004).

El fenotipo de microcolonia diferenciada ha sido encontrado en muchas biopelículas bacterianas estudiadas hasta el momento, como en las de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Vibrio cholerae*. Las microcolonias están rodeadas por canales de agua que permiten el transporte de nutrientes, proteínas, enzimas, moléculas de señalización intercelular, etc. Adicionalmente se ha demostrado que en *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Aeromonas hydrophyla* el desarrollo de las microcolonias está controlado por las moléculas de señalización intercelular. En *P. Aeruginosa* PAO1 se comprobó que el mantenimiento de los canales de agua alrededor de las microcolonias se lleva a cabo por la producción de surfactantes tipo ramnolípidos cuya producción es controlada por “quorum sensing”. La formación de la microcolonia es resultado de una respuesta adaptativa coordinada que facilita el desarrollo continuo de la biopelícula y su dispersión (Webb *et al.*, 2003, Parsek y Fuqua, 2004).

Debido a que una biopelícula implica una organización multicelular, se piensa que podrían existir rasgos comunes con las organizaciones multicelulares de organismos más complejos. En organismos multicelulares, la muerte celular es un componente normal del desarrollo. Se podría pensar que la autólisis sería indeseable para un organismo unicelular, pero podría ser ventajoso para una población bacteriana a nivel

multicelular. Webb *et al.* (2003) demostraron que en una biopelícula madura (10 días) de *P. aeruginosa*, más del 50% de las microcolonias presentaban muerte celular y lisis en el centro de las mismas. Los autores proponen que la muerte celular en las microcolonias es esencial para la diferenciación y la dispersión de la población de células sobrevivientes de la biopelícula. Este fenómeno permite la liberación de nutrientes como compuestos orgánicos y proteínas al medio que pueden ser utilizados por las bacterias que sobreviven en la biopelícula.

Es evidente que las bacterias que hacen parte de una biopelícula están expuestas a diferentes concentraciones de nutrientes, estímulos, moléculas de señalización y a nuevas necesidades, debido a lo cual su expresión génica y fenotipo es muy diferente a su estado planctónico. En los últimos años, son muchos los estudios realizados con el fin de identificar los genes y productos génicos expresados diferencialmente durante la formación de las biopelículas. Estos estudios han revelado la complejidad del sistema e indican que los genes que aumentan o disminuyen su expresión en una biopelícula varían en un rango entre el 1 y el 38% del genoma total de la bacteria (Sauer, 2003).

A. ferrooxidans es una bacteria que produce EPS para interactuar con el sustrato que utiliza como fuente de energía. Además, en el caso de sustratos sólidos, es capaz de generar biopelículas sobre éstos (Sand y Gehrke, 1999). Como se mencionó, en una biopelícula la bacteria está en contacto con una serie de compuestos con los que usualmente no se encuentra, tales como azúcares liberados como resultado de la lisis celular o degradación de polisacáridos, proteínas, aminoácidos, etc.

Teniendo en cuenta que existe la posibilidad de que *A. ferrooxidans* pudiera llegar a utilizar algunos de esos compuestos (azúcares o aminoácidos) en sus actividades metabólicas, se inició una búsqueda utilizando herramientas bioinformáticas en la secuencia parcial de genoma disponible en la red (ERGO y TIGR), de genes que codificaran para proteínas encargadas del transporte de azúcares. Se encontró que esta bacteria posee un gen que posiblemente codificaría para un transportador de galactosa tipo simporte, *galP*, y a la vez se encontraron la mayoría de los genes pertenecientes a la vía metabólica de la galactosa, la vía de Leloir.

1.5 Hipótesis

Basados en los antecedentes anteriormente expuestos, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

A. ferrooxidans es capaz de utilizar la galactosa para generar intermediarios necesarios para la síntesis de exopolisacáridos.

Para comprobar esta hipótesis, se realizó primero una aproximación a nivel bioinformático utilizando la secuencia disponible del genoma de *A. ferrooxidans*. Se buscaron los genes potencialmente involucrados en la vía metabólica de la galactosa y los genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos. Una vez identificados los genes de la vía metabólica de la galactosa y de la producción de EPS, se estudió la organización genética de los mismos y se determinaron sus niveles de expresión en diferentes condiciones de cultivo. Adicionalmente, para los genes de la vía de Leloir, se comprobaron sus funcionalidades. Además se estudió la influencia de la galactosa en las

propiedades de unión de la bacteria a su sustrato, en la composición y cantidad del EPS sintetizado y en la formación de la biopelícula.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Métodos Bioinformáticos

Se buscó información acerca de la vía metabólica de la galactosa y de la producción de polisacáridos en las páginas disponibles en la internet: BIOCYC (www.biocyc.org), KEGG (<http://genome.ad.jp/kegg/>) y ERGO (www.ergo.integratedgenomics.com/ IGwit). Usando las secuencias disponibles de los genes y proteínas involucrados en la vía, se realizó una búsqueda de cada uno de ellos en la secuencia parcial del genoma de *A. ferrooxidans* disponible en TIGR (<http://www.tigr.org/>) y en la base de datos de ERGO, usando programas como tblastn, blastn y blastp. Una vez identificado un posible candidato para cada gen, se obtuvo la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína y se realizó un blastp en la base de datos no redundante del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) Los mejores resultados del análisis bidireccional se consideraron para la identificación de los posibles homólogos en la bacteria. Las secuencias nucleotídicas y sus respectivas secuencias proteicas se utilizaron para realizar una caracterización completa de cada uno de los genes candidatos. Los programas usados para esta caracterización se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Programas bioinformáticos empleados

Aplicación	Programa	Dirección
Predicción de ORF's	ORF finder	www.ncbi.nlm.nih.gov/
Alineamientos de secuencia	Clustal w	
Búsqueda de dominios y motivos	Transmembrana	www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
	Blocks	www.blocks.fhcre.org/
	PRODOM	www.toulouse.inra.fr/prodom.html

	PROSITE	www.expasy.ch/prosite
	INTERPRO	www.sanger.ac.uk/cgi-
	PFAM	bin/pfamwww.ebi.ac.uk/interpro/
	PRINTS	
	MOTIV	
Análisis y predicción de estructura secundaria	PROTPARAM	www.expasy.ch/tools/protparam.html
	MULTALIN	npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-
	PSIRED	bin/align_multalin.pl
	PREDICPROTEIN	insulin.brunel.ac.uk/psipred/
Predicción de estructura secundaria de RNA	RNAFold	maple.bioc.columbia.edu/predict_protein). www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/

2.2 Métodos experimentales

2.2.1 Cepas

En este trabajo se utilizó la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270, que está parcialmente secuenciada por ERGO y TIGR, y cuyos resultados se encuentran disponibles en la red.

Las cepas de *E. coli* que se utilizaron en este trabajo se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Fuente ó Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>end A1 hsdR17</i> (<i>r_Km_K⁺</i>) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 ϕ80dlacZ ΔM 15</i>	Gibco BRL
S491	F ⁻ <i>galT22 his lac proA tonA uraP</i>	National Institute of Genetics. SHIGEN
HB101	F ⁻ λ^- <i>ara-14 galK2 hsdS20 (r-B,m-B)</i> <i>lacY1 leu mtl-1 proA2 recA13 rpsL20</i> <i>supE44 thi xyl-5</i>	Bettenbrock and Alpert (1998)
CSH41	F ⁺ $\Delta(lac-pro)$ <i>galE thi</i>	National Institute of Genetics. SHIGEN
JW1091	λ^- <i>lacZ125 relA1 spoT1 trp-49 zbf-</i> <i>507::Tn10 pgm /zbf-507::Tn10</i>	National Institute of Genetics. SHIGEN
FF4001	MC4100 <i>galU95</i>	Mollerach <i>et al.</i> (1998)

Las cepas mutantes para los genes de la vía metabólica de la galactosa son incapaces de crecer en medio mínimo (MM) con galactosa, y en agar McConkey presentan una coloración blanca o translúcida. Las cepas galactosa positivo presentan crecimiento en MM con galactosa y en agar McConkey generan colonias rojas.

2.2.2 Plásmidos y construcciones

Los plásmidos comerciales y las construcciones generadas en este trabajo se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos y clones

Plásmido	Genotipo	Origen
pKK 233-3	Vector de clonamiento	Gibco BRL
pUC18	Vector de clonamiento	Gibco BRL
pPgalE-1	Vector pKK 233-3 y gen <i>galE</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pgalE-2	Vector pUC18 y gen <i>galE</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
ppgm-1	Vector pKK 233-3 y gen <i>pgm</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pgalU-1	Vector pKK 233-3 y gen <i>galU</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
pgalT-1	Vector pUC18 y gen con actividad <i>gal T</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis

2.2.3 Condiciones de cultivo

La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270 se creció a 30°C con agitación constante (150 rpm) en sales del medio 9K (0,04g K₂HPO₄, 0,4g MgSO₄ y 0,1g (NH₄)₂SO₄ por litro) agregando azufre al 0.5% y ajustando el pH entre 3,5 y 5,0 o FeSO₄ (33.3g/l) y ajustando el pH a 1,6. El pH de las soluciones fue ajustado con H₂SO₄ diluido (Yates y Holmes, 1987). El crecimiento se cuantificó por conteo del número de células en cámara de Petroff-Hausser.

Los cultivos de las cepas de *E. coli* se hicieron a 37°C con agitación constante en caldo Luria Bertani (LB). En los casos que se requirió, se adicionó ampicilina (100µg/ml).

2.2.4 Extracción de ácidos nucleicos

2.2.4.1 Obtención de las células

Los cultivos de *A. ferrooxidans* en sulfato de hierro o azufre se centrifugaron a 800 rpm con el fin de remover las partículas de azufre o la jarosita presentes en el medio. Luego se realizó una nueva centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min con el fin de obtener las células. Las células se lavaron dos veces con H₂SO₄ 10 mM, centrifugando cada vez a 10.000 rpm por 10 min. Finalmente se hizo un lavado con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), centrifugando de nuevo a 10.000 rpm durante 10 min. Las centrifugaciones se hicieron a 4°C.

2.2.4.2 Obtención de ácidos nucleicos

El DNA cromosomal de *A. ferrooxidans* se extrajo según el procedimiento descrito por Yates y Holmes (1987), a partir de cultivos que estuvieran en fase exponencial tardía de crecimiento.

El DNA plasmidial de *E. coli* se obtuvo utilizando el sistema de purificación de DNA plasmidial Wizard (Promega) y procedimientos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

La extracción del RNA total de *A. ferrooxidans* se hizo según el procedimiento descrito por Guacucano *et al.* (2000), a partir de cultivos crecidos en FeSO₄ o azufre hasta la fase exponencial intermedia.

2.2.5 Transcripción reversa

La reacción de transcripción reversa se hizo utilizando la transcriptasa reversa ImProm-IItm reverse transcriptase (Promega) y la reacción de PCR se hizo con la DNA Taq polimerasa (Invitrogen). En ambos casos se siguieron las recomendaciones dadas por el proveedor para su uso. Se utilizaron 2 µg de RNA en cada reacción y los partidores específicos (Tabla 4). Cada experimento se hizo por duplicado y como controles se realizaron: PCR directo usando el RNA como molde, RT-PCR sin RNA y RT-PCR con RNA tratado con RNAasa como molde. Se utilizó como control de expresión el gen *cydA*, que tiene el mismo nivel de expresión en cultivos crecidos en FeSO₄ ó azufre (resultados no publicados). Para poder evaluar las diferencias de expresión de los genes en las dos condiciones de crecimiento bacteriano, se detuvieron las reacciones a diferente número de ciclos del PCR y se compararon los resultados en aquellos donde aún no se llegaba a saturación.

En los ensayos de cotranscripción, para cada par de genes adyacentes se utilizó para la reacción reversa el partidador del gen que estaba río abajo.

2.2.6 Clonamiento

Los genes *galE*, *galU*, *pgm*, *galP* y *galK* se amplificaron por PCR utilizando la DNA Taq polimerasa (Invitrogen) utilizando los partidores específicos para cada uno de los genes basados en las secuencias disponibles (Tabla 4).

El vector utilizado para realizar los clonamientos fue el pKK 233-3, el cual fue cortado con la enzima de restricción *EcoRI* y posteriormente reparado con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Luego se defosforiló con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera, CIAP (Promega), siguiendo las recomendaciones de los proveedores para el uso de las enzimas y los procedimientos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

Los productos de PCR se fosforilaron usando la T4 polinucleotido quinasa (Promega) y las ligaciones al vector cortado y defosforilado se efectuaron a 16°C, durante 12-20 h, usando la T4-ligasa (Promega) según especificaciones del proveedor.

Los productos de la ligación se transformaron por electroporación (Cell Porator Gibco BRL Life Technologies) en la cepa huésped correspondiente, a través de un pulso de 2.4 kV (25UF, 330Ω).

Las transformantes se seleccionaron por crecimiento en medio LB con ampicilina o por presencia de colonias rojas en agar McConkey con ampicilina. Con el fin de comprobar la presencia del inserto en la dirección correcta, los clones seleccionados se sometieron a análisis por PCR. Los clones orientados en la dirección correcta se seleccionaron para los experimentos subsiguientes.

Tabla 4. Partidores usados para los clonamientos (A) y partidores usados para RT-PCR (B).

Gen	A	
<i>luxA</i>	A	5' ATGCGGCATTTATTTGGAGG '3
	B	5' CGGTGACCAGCACCTGC '3
<i>galE-1</i>	A	5' ATGCAGGTGTTGGTCACCGGCG '3
	B	5' CAAAGTTCATAAGCCATTCTGCCACG '3
<i>pgm</i>	A	5' ATGGCGGTATTGCAGATTG '3
	B	5' TCAGGTGATGACAGTGGGG '3
<i>galU</i>	A	5' ATGGCTGAAGTGCGCAAGGC '3
	B	5' ACCCACCACCGGACGGGC '3
<i>galP</i>	A	5' ATGACAGACAAGGTGGCCTGCCC '3
	B	5' GCACCTGGAGCTTTGAATAGGCAAC '3
<i>cdsA</i>	A	5' ATGGTCAGTACGGTGTGG '3
	B	5' TAGGACAGTTCCTCGGTAG '3
<i>uppS</i>	A	5' CCGCCACATTGCCGTCATCA '3
	B	5' TGATCGCCCGTACGTCCGAA '3
<i>pirH</i>	A	5' AGCGCGGCAACTCAAGGTCT '3
	B	5' GCTGATACTCGGCGTGCAAC '3
<i>dxr</i>	A	5' ATGACACGAGGCATCTGC '3
	B	5' GTGCCTCGAACTGAAGGT '3
<i>galE-2</i>	A	5' ATGGCACGCATGATGACC '3
	B	5' AGGGGATCAGATGGCTCT '3
OPERON GALACTOSA		
	B	
<i>rbn</i>	1	5' ATGTCCCGAAAGCGATGGT '3
<i>luxA</i>	2	5' TAAATGCCGCATCCACCCCG '3
	3	5' ATGCGGCATTTATTTGGAGG '3
<i>galE</i>	4	5' CGGTGACCAGCACCTGC '3
	5	5' ATGCAGGTGTTGGTCACCGGCG '3
<i>galK</i>	6	5' TCACAAGGCAAAGCCCTGGGTG '3
	7	5' ATGAACTTGGCTCATCATATTCCTGC '3
<i>pgm</i>	8	5' TGC AAT ACC GCC ATG GCA '3
	9	5' ATGGCGGTATTGCAGATTG '3
<i>galM</i>	10	5' GCCAATGGTATCGAGCAGT '3
	11	5' GACAACGGCATGGGCTAC '3
<i>mgt</i>	12	5' CACTTCCGTGGGCTC '3
OPERON LPS		
<i>exo</i>	1	5' GCAGGAATGGATCACGCCG '3
<i>dedA</i>	2	5' CGCTGTAGCGTTGGCGTA '3
<i>rpsB</i>	3	5' TGATCCGCCACGCGCC '3
<i>pirH</i>	4	5' ATGGTCAGTACGGTGTGG '3
<i>uppS</i>	5	5' AATGTGGCGGGGCATGG '3
	6	5' CCGCCACATTGCCGTCATCA '3
<i>cdsA</i>	7	5' GTCGCTGACGGAGCAATC '3
	8	5' ATGGTCAGTACGGTGTGG '3
<i>dxr</i>	9	5' CCTCGTGTCAATCCACCA '3
	10	5' ATGACACGAGGCATCTGC '3
<i>zn</i>	11	5' TATCTACGGGGCGCGAACGA '3
<i>ompS</i>	12	5' CCCTTGAGTTTACTGTGGG '3
	13	5' CCCTTGAGTTTACTGTGGG '3
<i>ompH</i>	14	5' GGCAATTCGAATGC '3
<i>lpxA</i>	15	5' ATGACGGTGCAGATTCATCC '3
	16	5' CGGCTATTACGAATAAAGTCCA '3
<i>gnaA</i>	17	5' CTGCAGGTGCGGGTAGCC '3
<i>gnaB</i>	18	5' CGCGCGCAAATCGACC '3
<i>lpxB</i>	19	5' GCAGCCTGCTGGAAGG '3
<i>rnhB</i>	20	5' CACTGGACCCGCAAG '3

<i>dnaE</i>	21 5' CGCGAGGATTCAATGGGAAG '3
<i>phpA</i>	22 5' GTACATTTCCGCGAACCCG '3

2.2.7 Preparación de células competentes

Para cada una de las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo (Tabla 1), se prepararon 100 ml de medio LB que fueron inoculados al 1% usando preinóculos crecidos a 37°C O.N. Cada cultivo se creció a 37°C hasta llegar a una DO de 0,75 a 550 nm. Las células se obtuvieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C, se resuspendieron en 100 ml de solución de lavado fría (glicerol al 10% en agua destilada estéril) y centrifugaron nuevamente a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C. Este procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de solución de lavado fría y se alicuotaron en volúmenes de 20 y 40 µl. Las células se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su utilización.

2.2.8 Ensayos de actividades enzimáticas

2.2.8.1 Preparación de los extractos celulares

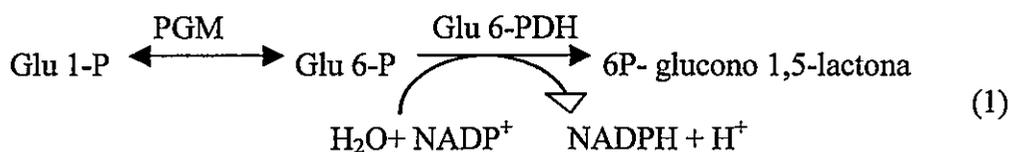
Las células de cada una de las cepas transformantes de *E. coli* se recuperaron por centrifugación (5.000 rpm por 15 min) a partir de un cultivo fresco de 50 ml. Las células se lavaron con amortiguador fosfato 0,05 M pH 7 y se resuspendieron en un volumen final de 10 ml. Inmediatamente después se sonicaron (Degeest y De Vuyst, 2000) durante 10 min, con pulsos de 40 s de sonicación y 40 s en hielo. Los restos celulares se separaron por centrifugación (5.000 rpm por 15 min), el sobrenadante se utilizó inmediatamente en los ensayos de actividades enzimáticas.

2.2.8.2 Actividades enzimáticas

Los ensayos enzimáticos se realizaron a 30⁰C, en un volumen total de 1 ml y usando cantidades variables del extracto celular recientemente preparado. La actividad se midió cuantificando la aparición de NADH o NADPH a 340 nm. Como blanco se utilizó la misma mezcla de reacción pero sin el extracto enzimático, y se realizó también un control con extracto hervido. Cada experimento se hizo por duplicado. La cantidad de proteína total presente en el extracto celular se determinó usando el kit "Biorad protein assay", el cual utiliza el método de Bradford (1976) y como estándar se utilizó BSA (Degeest y Vuyst, 2000).

2.2.8.2.1 Actividad α -fosfoglucomutasa

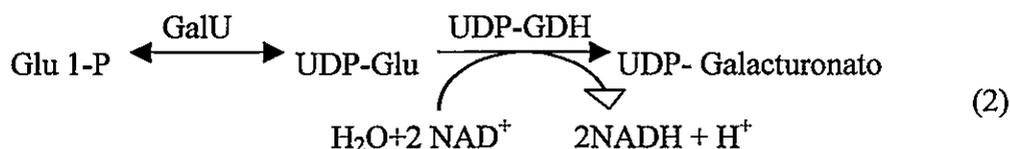
La mezcla de reacción que se utilizó en este ensayo consistió en amortiguador glicil-glicina 179 mM, β -NADP 0,67mM, glucosa 1,6-bifosfato 0,02 mM, MgCl₂ 30 mM, L-cisteína 43 mM, extracto celular y 1 U de glucosa 6-fosfato dehidrogenasa (glu-6PDH). La reacción se inició agregando glucosa 1-fosfato 5 mM (Ecuación 1) (Degeest y Vuyst, 2000).



2.2.8.2.2 Actividad UDP-glucosa pirofosforilasa

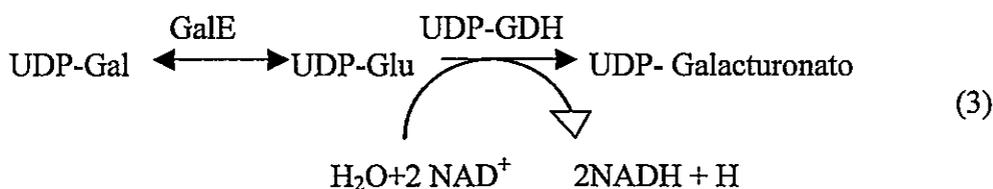
La mezcla de reacción usada en este ensayo consistió en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 8 mM, cisteína-HCl pH 7.5 1,58 mM, NAD 0,5 mM, UTP 1,25

mM, UDP-glucosa dehidrogenasa (UDP-GDH) 25 μ g y extracto celular. La reacción se inició agregando α -glucosa 1-fosfato 1mM (Ecuación 2) (Degeest y Vuyst, 2000).



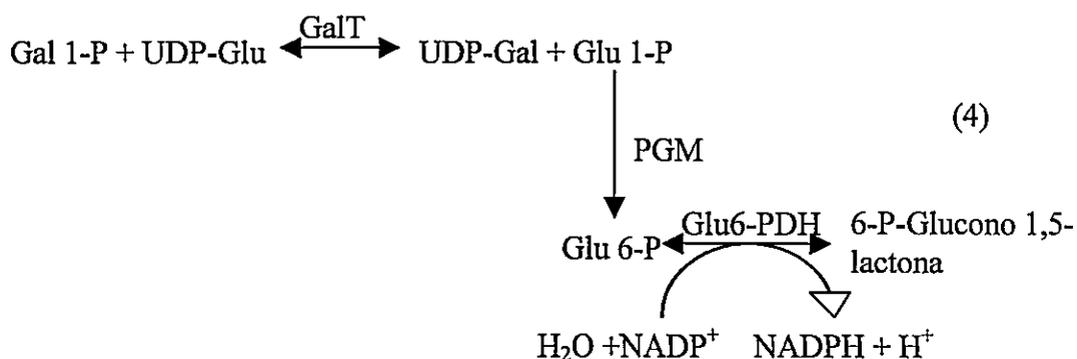
2.2.8.2.3 Actividad UDP-galactosa-4-epimerasa

La mezcla de reacción consistió en amortiguador Tris-HCl pH 8,5 40 mM, MgCl_2 5 mM, NAD 0,6 mM, UDP-glucosa dehidrogenasa (UDP-GDH) 25 μ g y extracto celular. La reacción se inició con UDP-galactosa 0,2 mM (Ecuación 3) (Degeest y Vuyst, 2000).



2.2.8.2.4 Actividad galactosa uridiltransferasa

La reacción poseía amortiguador Tris-HCl pH 7,8 100 mM, MgCl_2 10 mM, NADP 1 mM, glucosa 1,6 bifosfato 0,25 mM, PGM 3U, 5U de glucosa 6-P deshidrogenasa (Glu6-PDH) y extracto celular. La reacción se inició con UDP-glucosa 1 mM y galactosa 1-fosfato 1 mM (Ecuación 4) (Levander *et al*, 2002).



2.2.9 Caracterización del EPS producido por *A. ferrooxidans* ATCC23270

Se prepararon 60 lt de cultivo de *A. ferrooxidans* en medio 9K según procedimiento descrito anteriormente. Luego se recuperó la masa celular de este cultivo y se reinoculó en 10 lt del mismo medio de cultivo. Este procedimiento se repitió hasta obtener 5×10^{12} células/ml, cantidad necesaria para iniciar la producción de EPS. Las células se recuperaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min y luego se resuspendieron en 20 ml de sales minerales 9K para ser inoculadas en 500 ml de sales del medio 9K con pirita al 10% en presencia o en ausencia de galactosa al 0,25%. El cultivo se incubó hasta llegar a 5×10^9 cél/ml de células planctónicas.

Para separar las células planctónicas del mineral se dejó decantar el cultivo por dos horas. El sobrenadante que contenía las células planctónicas se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min con el fin de separar las células del EPS, que permanecía en solución. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su posterior diálisis.

La pirita obtenida se filtró al vacío, utilizando un tamaño de poro ($25 \mu\text{M}$) que permitía el paso de las células no unidas a la pirita y que retenía el mineral. La pirita se lavó con 1 litro de solución de sales minerales (9K) con el fin de retirar las células no unidas. Luego, para obtener las células unidas a la pirita y el EPS, se incubó el mineral con 100 ml de solución de zwittergent-EGTA (Gerhrke *et al.*, 1998) durante 30 min y posteriormente se homogenizó la suspensión (equipo Ultra Turrax T25 IKA) a 12.000 rpm durante 3 min. Luego se centrifugó a 800 rpm durante 5 min, para separar la pirita de las células que se despegan del mineral, y el sobrenadante se sometió a una nueva centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min con el fin de separar las células del EPS. El

sobrenadante, que contenía el EPS se guardó a -20°C . Este procedimiento se repitió dos veces para tratar de recuperar el mayor número de células y la mayor cantidad de EPS unidos al mineral.

Con el fin de eliminar el Fe^{+2} y Fe^{+3} presente y para purificar el EPS, los sobrenadantes obtenidos de células planctónicas y células unidas se sometieron a diálisis consecutivas, con agua destilada a pH 2, pH 4, pH 6 y agua bidestilada pH 7. Luego el dializado se liofilizó con el fin de obtener el EPS seco. La cantidad de EPS se determinó pesando en balanza analítica, el producto seco obtenido.

El exopolisacárido obtenido se sometió a análisis por cromatografía de gases con el propósito de definir su composición en azúcares. Para poder realizar la cromatografía de gases, primero fue necesario hidrolizar el polisacárido obtenido, para lo cual se trató la muestra con ácido trifluoroacético según el procedimiento descrito por Gehrke *et al.* (1998). Posteriormente la muestra se sometió a tratamiento químico con el fin de obtener el derivado alditolacetato de cada azúcar presente en el EPS, según el procedimiento descrito por Hanson y Phillips (1981). Este derivado puede, posteriormente, identificarse por cromatografía de gases. Este tratamiento también se realizó con cada uno de los estándares de azúcar usados. Se utilizó como estándar interno m-eritrito (Merck).

Para la cromatografía de gases se utilizó el cromatógrafo Carlo-Erba Fractovap 4160 y una columna capilar de sílica gel de 30 m de largo y 32 mm de diámetro interno. El programa de temperatura fue desde 150°C hasta 200°C ($4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, período de espera inicial de 10 min). El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μl . La temperatura del inyector fue de 200°C y la del detector de ionización de llama fue de 275°C .

2.2.10 Incorporación de ^{14}C -galactosa en EPS

Se cultivaron 500 ml de *A. ferrooxidans* en medio 9K, como se describe en el punto anterior. Las células se recuperaron por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min y se utilizaron para inocular un cultivo de 20 ml del mismo medio con ^{14}C -galactosa 50 μM (Actividad específica 52.2 mCi/mmol). Luego de 48 h de crecimiento, se separaron las células del sobrenadante por centrifugación en las condiciones descritas en el punto anterior. El sobrenadante se usó para la purificación del EPS según el procedimiento descrito por Gehrke *et al.* (1998). De la fracción de EPS en solución, se tomó una muestra para medir radiactividad en el contador de centelleo.

Las células se filtraron al vacío y se lavaron 3 veces con solución de sales minerales 9K, el filtro con las células lavadas se llevó al líquido de centelleo y la radiactividad se midió en el contador de centelleo.

2.2.11 Experimentos de unión de *A. ferrooxidans* a pirita

A partir de 1 lt. de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido hasta la fase estacionaria temprana en medio 9K en ausencia o presencia de galactosa al 0,25%, se recuperaron las células por centrifugación a 10.000 rpm por 20 min y se lavaron tres veces con sales minerales. Las células se resuspendieron en 10 ml de solución de FeCl_3 (2g/lt) y se incubaron toda la noche a 17°C con agitación constante (200 rpm). Las células se utilizaron para inocular 50 ml de sales del medio 9K con pirita al 10% (5×10^8 cel/ml) en ausencia y presencia de galactosa al 0,25%. El cultivo se incubó a 28°C con agitación constante (200 rpm). Se tomaron muestras de 1 ml a los 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120,

240, 420, 600 min, las cuales se centrifugaron inmediatamente a 1.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente, con el fin de separar la pirita presente. El número de células en el sobrenadante y en el inóculo fue determinado por conteo en cámara de Petroff-Hausser. El número de células unidas a pirita se determinó indirectamente descontando al número inicial de células el número de células no unidas al mineral. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2.12 Observación de las células unidas de *A. ferrooxidans* a pirita

Se obtuvieron las células de la misma manera que en el experimento descrito en el punto anterior y se utilizaron para inocular 50 ml de sales minerales del medio 9K (5×10^8 cel/ml) con trozos de pirita en presencia y ausencia de galactosa al 0,25%. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación constante (200 rpm) y se retiraron trozos de pirita a las 24 y 48 h, los cuales se analizaron por microscopía de fuerza atómica (AFM) y/ ó por microscopía de fluorescencia. En la AFM se utilizó el instrumento digital, Nanoscope III, y como control negativo se observaron los trozos de pirita estériles.

Para la microscopía de fluorescencia, las muestras fueron teñidas con naranja de acridina según procedimiento descrito por Yeh *et al.* (1987). La luz incidente fue filtrada entre 450 y 490nm. Para comparar la cantidad de células unidas en cada una de las condiciones evaluadas, se realizó un barrido de toda la superficie de la pirita.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis bioinformático

Basados en las secuencias descritas en otros organismos con respecto a las enzimas que participan en la vía metabólica de la galactosa y en la producción de EPS, se hizo una búsqueda de cada uno de los genes involucrados en estas vías en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Se encontró que esta bacteria posee genes potenciales cuyos productos proteicos predichos están involucrados en el transporte y metabolismo de la galactosa, excepto para el gen *galT* (Tabla 5). Este gen codifica para la proteína encargada de la transferencia reversible del grupo UMP de la UDP glucosa a la galactosa 1-fosfato, generando UDP-galactosa y glucosa 1-fosfato (Holden *et al.*, 2003).

Con respecto a la biosíntesis de EPS, se encontró que la bacteria posee toda la información genética necesaria para generar los intermediarios de la síntesis de los polisacáridos, las glicosiltransferasas necesarias para las reacciones de transferencia de azúcar, las proteínas que sintetizan el anclador lipídico y las proteínas exportadoras del polisacárido. Además se predijo que estos genes se encuentran organizados en operones, lo que coincide con lo descrito en otros organismos.

3.1.1 Vía metabólica de la galactosa

En el genoma de *A. ferrooxidans* se encontraron ortólogos para la mayoría de los genes de la vía de Leloir. En la Tabla 5 se presenta un resumen de los resultados bioinformáticos de los genes candidatos de la vía.

Tabla 5. Genes candidatos involucrados en la vía de Leloir en *A. ferrooxidans*.

Gen	Actividad enzimática propuesta	Mejor Blast P hit	% Sim.	score	Valor E	Motivos
<i>galP</i>	Galactosa permeasa	<i>Legionella pneumophila</i>	41%	116	1e-24	Prosite 50850, COG 0477, pfam 0083
<i>galE-1</i>	UDP-glucosa epimerasa EC 5.1.3.2	<i>Mycobacterium avium</i>	42%	84	3 e -15	pfam 1370, COG 1087
<i>galE-2</i>	UDP-glucosa epimerasa EC 5.1.3.2	<i>Methylobacillus sp.</i>	75%	399	1 e -110	pfam 1370, COG 1087
<i>galK</i>	Galactokinasa EC 2.7.1.6	<i>Streptomyces coelicor</i>	48%	106	5 e -22	PD 339735
<i>pgm</i>	Fosfoglucomutasa EC 5.4.2.2	<i>Synechococcus elongatus</i>	77%	711	0.0	pfam 2878, 2879, 2880, 0408, COG 0033
<i>galM</i>	Aldosa-1epimerasa EC 5.1.3.3	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	52%	33.9	1.1	
<i>galU</i>	UDP-glucosa pirofosforilasa EC 2.7.7.9	<i>Burkholderia fungorum</i>	73%	371	2 e -73	pfam 0483, COG 0451, PD 01252
<i>luxA</i>	Proteína tipo LuxA proteína	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	44%	157	3 e -37	pfam 0296, COG 2141

Galactosa Permeasa

La galactosa permeasa es una proteína de membrana interna que ingresa la galactosa a la célula de manera específica, asociada al ingreso de protones, sin ocasionar ninguna modificación química en el azúcar (Horne y Henderson, 1983).

La galactosa permeasa pertenece a la familia de los transportadores de azúcares: H⁺-"symporter", grupo al que pertenecen otras permeasas para azúcares como: glucosa, fructosa, mannososa, arabinosa, xilosa, etc. (Saier, 2002). Estos transportadores se caracterizan por poseer 12 α -hélices transmembránicas, donde las hélices 6 y 7 están conectadas por un dominio citoplasmático de 60-70 aminoácidos. La especificidad por el

sustrato está dada por las diferencias en los sitios de unión de cada transportador (McDonald y Henderson, 2001).

En el genoma de *A. ferrooxidans* se encontró un ortólogo para el gen de la galactosa permeasa, el cual posía una similitud de 38% y una identidad de 25% con la galactosa permeasa de *E. coli*. Por análisis bioinformático, se encontró que poseía las hélices transmembránicas características, dos dominios de unión de azúcar (Prosite 50850 y COG0477) y residuos característicos de unión a galactosa. Según el trabajo realizado por McDonald y Henderson (2001) con la galactosa permeasa de *E. coli*, los residuos más importantes en la unión del azúcar son el triptofano, asparragina y probablemente una cisteína ubicados en las hélices X y XI (Figura 4).

El gen *galP* de *A. ferrooxidans*, al igual que el de *E. coli*, no hace parte de ningún operón, presenta una transcripción divergente con un posible operón que codifica para proteínas involucradas en la síntesis de dTDP-ramnosa, y río abajo de él se encuentra una proteína hipotética (Figura 4C).

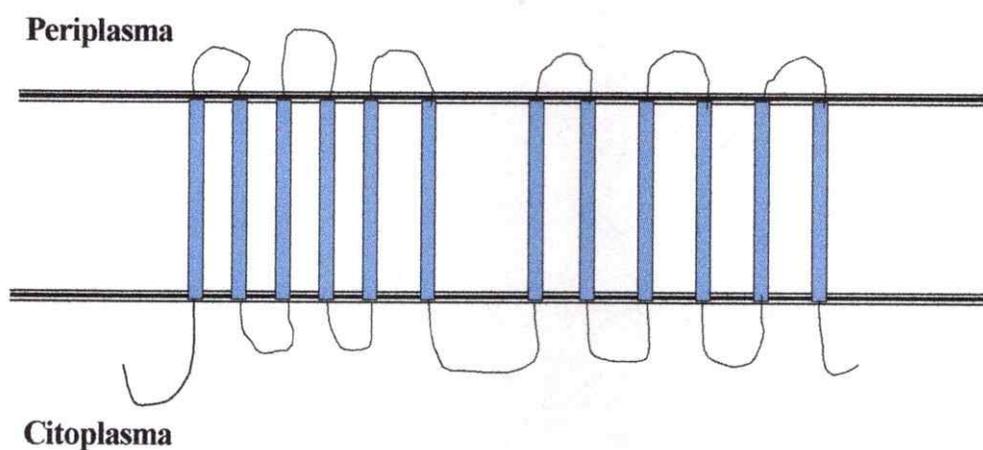
Galactosa aldolasa (GalM)

Esta enzima se encarga de la interconversión intracelular de D- α -galactosa y D- β -galactosa (Weickert y Adhya, 1993). Su importancia está asociada a la necesidad de generar el sustrato adecuado para la galactoquinasa (D- α -galactosa). Esta enzima es necesaria en casos donde se libera galactosa a partir de disacáridos donde generalmente está en forma de D- β -galactosa (Bettenbrock y Alpert, 1998).

A.

MNRQGLPTANVPPVQVADRQRGHALGAAMLGMLLDGYDLSIMAVVLLPLHSAWHLHATQTGPLMA
 MALLGSLGGLAGGVFTDRFGRRKLLFPNIFLYVIGALVSALSPNPVFLGRFLTGLAIGLDYPLVATI
 VAEYSQSANRGNRFARVNLAWYVYGALLSTGIGWALLFTGDDSWRWMLGSAVVPALALLWLRRLPE
 SPRWLARNGHVGAARAALARLSPESTPAELGAQLATFQGHRQSWRVLLRKVWLRLLLLSIFPWFLDQV
 GLGIGLYFPLVLRNGLASSNGTAAAINAVFLVISALGILYLRLDRWGRIPLQSAGFGMMSLGLALFAL
 CSWNGWIAGIYGAAVYSLGVGIGPGVTVFALAVEIFPTEL RASAAGLATGLSRLGAFVSALLFPILEKS
 WGIPLVLLVMALVSLGMFTTLLIYGVESRQKSLEDLERVDAPVATP

B.



C.

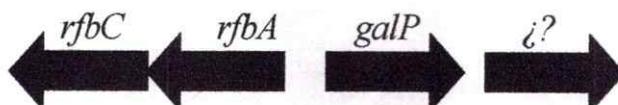


Figura 4. Galactosa permeasa de *A. ferrooxidans*. A. Secuencia de aminoácidos, en azul se marcan hélices transmembránicas. En rojo se señalan los residuos conservados. B. Representación de la estructura de *galP* en la membrana plasmática. C. Contexto genético de *galP* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

En el genoma de *A. ferrooxidans* se identificó con baja probabilidad un ortólogo del gen *galM*. Este gen formaría parte del hipotético operón galactosa, como sucede en *E. coli* (Weickert y Adhya, 1993).

Galactoquinasa (GalK)

Esta enzima es la encargada de fosforilar la galactosa después de que ésta ha entrado a la célula, por lo tanto uno de sus dominios característicos es el de unión a ATP. En el ortólogo de este gen encontrado en *A. ferrooxidans* se identificó un dominio PD 339735, que corresponde al dominio característico de las quinasa y que está involucrado en la unión a ATP (Mollet y Pilloud, 1991).

La región del sitio fosfoquinasa es muy conservado entre las galactoquinasa y se encuentra ubicada en la región carboxiterminal de la proteína (Adams *et al.*, 1988) (Figura 5).

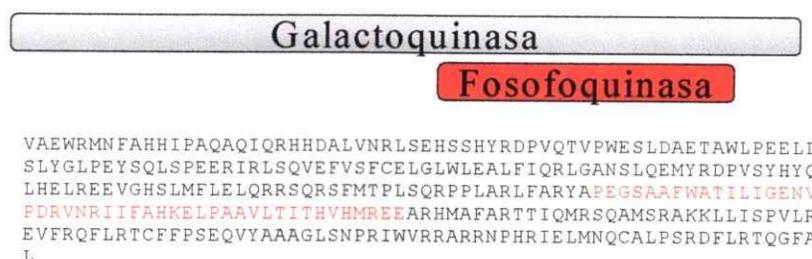


Figura 5. Galactoquinasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En rojo se señala el dominio fosfoquinasa de la proteína.

Galactosa-1 fosfato-uridiltransferasa (Gal T)

Esta es la tercera enzima de la vía de Leloir y se encarga de la producción de UDP-galactosa y glucosa-1-fosfato a partir de galactosa-1-fosfato y UDP-glucosa. Esta enzima pertenece a la superfamilia de las proteínas de la triada de histidinas “histidine

triad" (HIT). Los miembros de esta familia actúan como nucleótido hidrolasas o transferasas y actúan sobre el fosfato alfa de los nucleótidos (Holden *et al.*, 2003).

Usando herramientas bioinformáticas, no se identificó un ortólogo para el gen *galT* en el genoma de *A. ferrooxidans*.

UDP-Galactosa 4-epimerasa (Gal E)

Esta proteína es la encargada de generar los galactósidos necesarios para los procesos de biosíntesis de polisacáridos. En bacterias tales como *L. lactis* se ha reportado que esta proteína tiene un papel crucial en la biosíntesis de la pared celular, la síntesis del lipopolisacárido (LPS) y del EPS (Boels *et al.*, 2001).

Esta enzima forma parte de un grupo de proteínas que son conocidas como la superfamilia de las deshidrogenasas /reductasas de cadena corta. Todas estas enzimas tienen un motivo conservado Tyr-X-X-X-Lys que está involucrado en la catálisis (Figura 6) (Holden *et al.*, 2003).

En *A. ferrooxidans*, se encontraron dos ortólogos del gen que codifica para esta proteína. Uno de los ortólogos forma parte del posible operón galactosa, y el otro es parte de un posible operón junto a otros genes involucrados en la síntesis de polisacáridos.

En *E. coli* se conoce la estructura de la galactosa epimerasa y se sabe que existen aminoácidos claves para la interacción con el cofactor, NADH (Krispin y Allmansberger, 1998); los dos ortólogos presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* presentan el dominio de unión para el cofactor (Figura 6). Además se identificó por pfam un dominio epimerasa NAD-dependiente y un dominio COG característico de estas enzimas (Tabla 5).

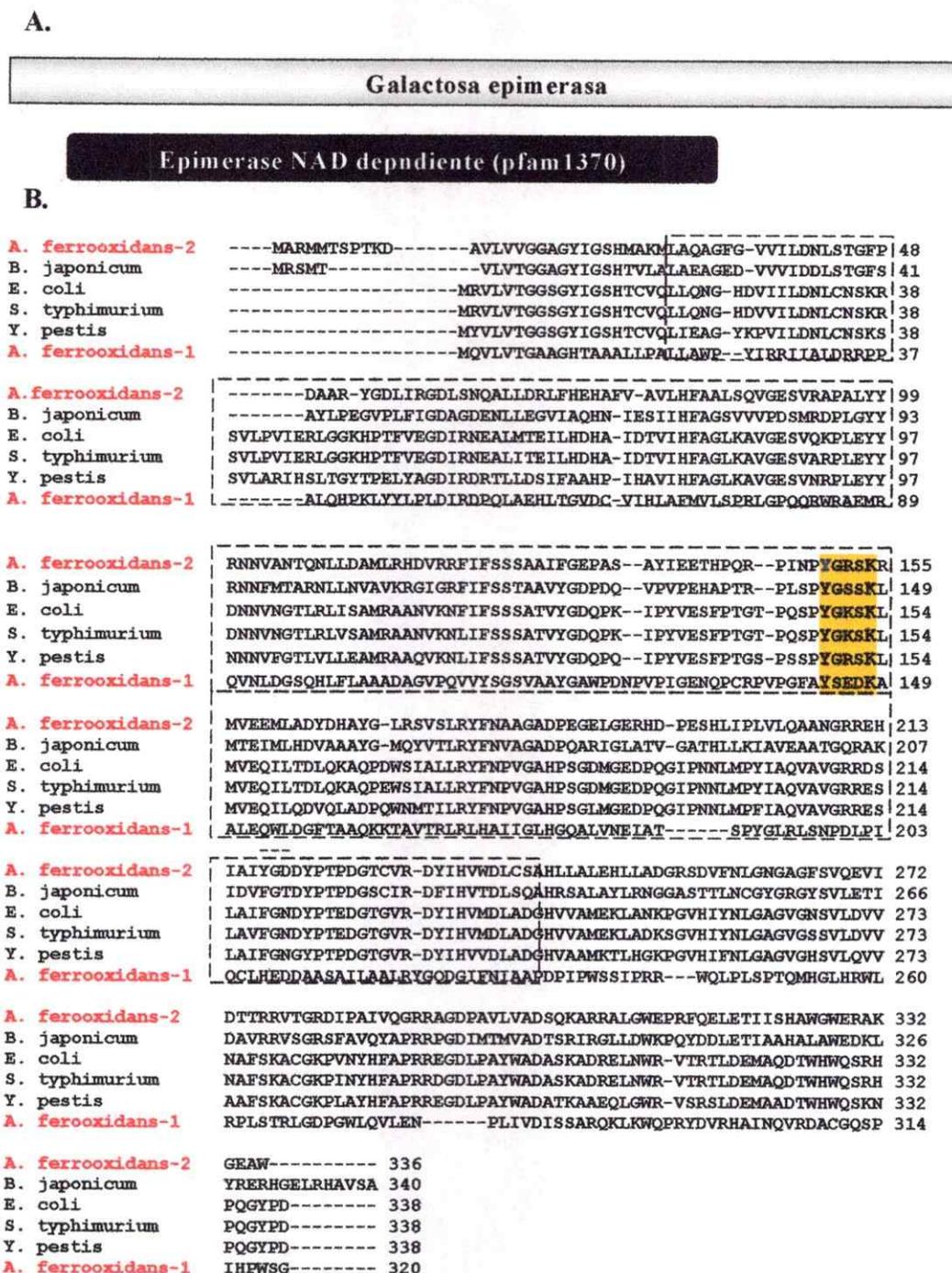


Figura 6. UDP-galactosa 4-epimerasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. A. Dominios conservados en la UDP-galactosa 4-epimerasa de *A. ferrooxidans*. **B.** Alineamientos de las secuencia de aminoácidos de las UDP-galactosa 4-epimerasas de *A. ferrooxidans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Yersinia pestis*. Línea punteada (----): pfam 1370. En amarillo el dominio tirosina (Y)-xxx-lisina (K).

UDP-Glucosa pirofosforilasa (Gal U)

Esta enzima tiene un papel crítico en la producción de galactósidos, ya que en ausencia de galactosa es la única vía para generar UDP-glucosa y UDP galactosa. La reacción que cataliza esta enzima consiste en la síntesis de UDP-glucosa a partir de glucosa-1-fosfato (Mollerach *et al.*, 1998., Boels *et al.*, 2003).

En *A. ferrooxidans* se identificó un ortólogo para el gen que codifica para esta proteína el cual tiene una similitud de 77% y una identidad del 54% con la UDP glucosa pirofosforilasa de *Burkholderia fungorum*. Se identificaron los dominios característicos de estas proteínas como COG1210 UDP-glucosa pirofosforilasa y pfam 00483 NTP-nucleotidil transferasa.

Tal como sucede en *A. ferrooxidans*, en *E. coli*, *B. fungurum* y otros organismos, el gen *galU* no hace parte del operón galactosa ya que no está sujeto a regulación por galactosa (Weickert y Adhya, 1993, Adams *et al.*, 1988). En *A. ferrooxidans* el gen está formando un posible operón con genes que codifican para proteínas hipotéticas y proteínas involucradas en la síntesis del nucleótido de azúcar dTDP-ramnosa (Figura 7).

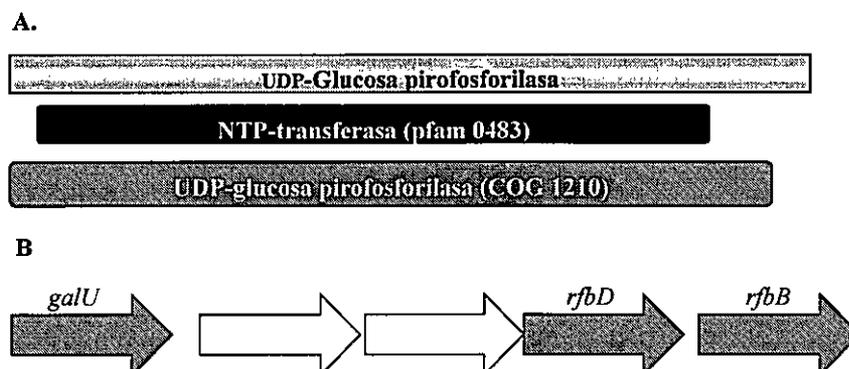


Figura 7. UDP-Galactosa pirofosforilasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270. A. Dominios conservados en GalU de *A. ferrooxidans*. B. Contexto genético de *galU* en *A. ferrooxidans*. Flechas blancas: Proteínas hipotéticas.

Fosfoglucomutasa (PGM)

Esta es la enzima que permite conectar la vía de Leloir y la glicólisis, ya que se encarga de catalizar la interconversión de glucosa 6-fosfato a glucosa 1-fosfato (Levander *et al.*, 2002). En *A. ferrooxidans* se identificó un ortólogo para el gen que codifica para esta enzima. Este gen hace parte del posible operón galactosa de la bacteria. En él se identificaron los dominios pfam característicos de estas proteínas (Tabla 5).

En *E. coli* el gen *pgm* no hace parte del operón galactosa, aunque está ubicado río abajo de éste. Esto podría explicarse porque su expresión no debe estar sujeta a regulación por este azúcar debido a su importancia en otros procesos metabólicos (Weickert y Adhya, 1993).

En resumen, usando herramientas bioinformáticas, se logró identificar en el genoma de *A. ferrooxidans* todos los genes de la vía metabólica de la galactosa, excepto el gen *galT*. Adicionalmente se identificaron dos copias del gen *galE* ubicadas en diferentes contextos genéticos.

Teniendo en cuenta el tamaño de las regiones intergénicas y analizando la presencia de un posible promotor en la región río arriba de los genes, se identificó en *A. ferrooxidans* un posible operón galactosa, del cual formarían parte uno de los genes *galE*, los genes *galK*, *pgm*, *galM* y adicionalmente río arriba del gen *galE* se encontró el gen *luxA* que codificaría para la subunidad α de la luciferasa, enzima que tiene una actividad monooxigenasa y que no es parte del metabolismo de la galactosa (Figura 8). En otros organismos este gen no forma parte del operón galactosa.



Figura 8. Operón galactosa de *A. ferrooxidans*. Los genes en blanco no forman parte del operón.  Posible terminador Rho independiente. *rbn*, ribonucleasa; *mgt*, transportador de magnesio; *luxA*, subunidad α de la luciferasa. *galE*, UDP-galactosa 4-epimerasa; *galK*, galactoquinasa; *pgm*, fosfoglucomutasa; *galM*, aldosa 1-epimerasa.

En las bacterias bioluminiscentes, *luxA* forma parte del operón Lux y codifica para la subunidad α de la luciferasa bacteriana encargada de la producción de luz (Czyz *et al.*, 2000). Haciendo un análisis bioinformático del gen *luxA* de *A. ferrooxidans*, se encontró el dominio conservado COG 2141, que corresponde al sitio de unión del cofactor F420. Al hacer un Blast P contra la base de datos no redundante del NCBI, los primeros resultados muestran una alta similitud con la subunidad α de la luciferasa (Tabla 5). Dentro de los resultados se encontró un “hit” con alta probabilidad (valor de $e: 2e-14$) que corresponde a la proteína glucosa 6-fosfato dehidrogenasa de *Rhizobium sp*, enzima que utiliza como cofactor y aceptor de electrones a F420. Esta enzima cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato en 6-fosfogluconolactona, reacción inicial del ciclo de las pentosas (Purwantini *et al.*, 1997; Purwantini y Daniels, 1998).

Río abajo del gen *galM* se identificó un posible terminador Rho independiente, lo que indicaría que éste podría ser el último gen del operón galactosa. La predicción de este terminador se hizo utilizando el programa RNAfold, y la horquilla formada tendría una energía libre de -47Kcal .

3.1.2 Vía metabólica de la producción de EPS

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de EPS pueden dividirse en cuatro grupos: a) Las enzimas responsables del metabolismo inicial de carbohidratos, b) Las enzimas involucradas en la síntesis de los azúcares activados e interconversión de ellos, c) Las glicosiltransferasas (GTFs) que son las encargadas de generar la unidad repetitiva unida a un transportador lipídico glicosilado y d) Las translocasas y polimerasas encargadas de polimerizar el EPS y trasportarlo (Looijesteijn *et al.*, 1999, Whitfield y Paiment, 2003).

Síntesis de azúcares activados

Los dadores de los monómeros que forman la estructura básica de los polisacáridos son los azúcares activados: UDP-glucosa, UDP-galactosa y dTDP-ramnosa (Looijesteijn *et al.*, 1999, Boels *et al.*, 2003). La vía de Leloir en las bacterias tiene dos funciones, actuar como vía catabólica para la degradación de la galactosa y generar los intermediarios de la síntesis de los polisacáridos (UDP-glucosa y UDP-galactosa) (Bettenbrock y Alpert, 1998).

Por otra parte la dTDP- ramnosa se obtiene a partir de la glucosa 1-fosfato por la acción de cuatro enzimas: d-TDP-glucosa pirofosforilasa (RfbA), d-TDP-glucosa 4,6 dehidratasa (RfbB), d-TDP-4-dehidroramnosa 3,5-epimerasa (RfbC) y d-TDP-4-dehidroramnosa reductasa (RfbD) (Laws *et al.*, 2001). En el genoma de *A. ferrooxidans* se encontraron ortólogos de las cuatro enzimas encargadas de la síntesis de dTDP-ramnosa (Tabla 6).

Con respecto a la organización génica, se encontró que los genes *rfbA* y *rfbC* están formando un posible operón, que se transcribe divergentemente del gen de la

galactosa permeasa (*galP*) y convergentemente con un posible operón involucrado en la síntesis de la cápsula bacteriana. Los genes *rfbB* y *rfbD* están formando otro posible operón junto a un gen de una proteína de función desconocida, un gen para una proteína hipotética y el gen que codifica para GalU (Figura 7).

Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de residuos de azúcar de un sustrato dador activado a una molécula aceptora. La molécula dadora puede ser un azúcar activado difosforilado, pero también puede ser un azúcar fosfato o un disacárido. La molécula aceptora en muchos casos es una cadena creciente de carbohidratos, pero también puede ser un transportador lipídico u otra variedad de compuestos (Saxena *et al.*, 1995). En la actualidad existen más de 7200 secuencias anotadas como glicosiltransferasas en la base de datos. Debido a la dificultad que existe para la caracterización bioquímica de la actividad glicosiltransferasa, sólo a una pequeña parte de las secuencias disponibles se les ha comprobado experimentalmente la actividad propuesta. Por tanto, la clasificación de las glicosiltransferasas se ha hecho en base a la similitud de secuencia de aminoácidos, y se han descrito a la fecha 27 familias de estas proteínas (Coutinho *et al.*, 2003).

Tabla 6. Genes potencialmente involucrados en la vía de síntesis de EPS en *A. ferrooxidans*

Gen	Actividad enzimática propuesta	Mejor Blast P hit	% Sim.	score	E valor	Motivos
Síntesis de nucleótidos de azúcar						
<i>rfbA</i>	d-TDP-glucose pyrophosphorylase EC 2.7.7.24	<i>Azotobacter vinelandii</i>	80%	406	1 e - 112	pfam 0483, COG 1209, COG1208
<i>rfbB</i>	d-TDP-glucose 4,6 dehidratase EC 4.2.1.46	<i>Pseudomona putida</i> KT2440	72%	443	1 e - 123	pfam 1370, COG 1088, COG 0451
<i>rfbC</i>	d-TDP-4-dehidrorhamnose 3,5 epimerase EC 5.1.3.13	<i>Pseudomona stutzeri</i>	79%	245	3 e - 64	pfam 0908, COG 1898
<i>rfbD</i>	d-TDP-4-dehidrorhamnose reductase EC 1.1.1.133	<i>Synechococcus elongatus</i>	63%	261	1 e - 68	pfam 4321, COG 1091
Síntesis de lipopolisacárido						
<i>pir H</i>	Uridina monofosfato quinasa	<i>Methylobacillus flagelatus</i> BP-1	86%	320	2 ^e -86	
<i>uppS</i>	Undecaprenil difosfato sintetasa	<i>Methylococcus capsulatus</i>	65%	259	3e-68	Cd 0475, pfam 1255, COG 0020
<i>cdsA</i>	citidiltransferasa	<i>Legionella pneumophila</i>	60%	137	3e-31	pfam 1148, COG 0575
<i>dxr</i>	1-deoxi D-xilosa 5-fosfato reductoisomerasa	<i>Ralstonia solanacearum</i>	68%	426	1e-118	pfam 2670
<i>lpxD</i>	UDP-3-O-glucosamina N-aciltransferasa	<i>Burkholderia cepacia</i>	59%	287	2e-76	çd 0208, pfam 4613, COG 1044
<i>fabA</i>	Proteína transportadora de acilos 3R-hidroximiristoil	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	67%	147	1e-34	COG 0764, cd 0208
<i>lpxA</i>	UDP-N-acetylglucosamina acetyltransferasa	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	100%			COG 1043
<i>gmnA</i>	Oxidoreductasa	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	100%			pfam1408, COG 0673
<i>gmnB</i>	Aminotransferasa	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	100%			pfam 1041
<i>lpxB</i>	lípidos-A-disacárido	<i>Acidithiobacillus</i>	100%			pfam 2684,

	sintetasa	<i>ferrooxidans</i>	COG 0763			
Síntesis de EPS						
<i>epsD</i>	Undecaprenilfosfato galactosa fosfotransferasa	<i>Salmonella typhimurium</i>	56%	311	2 e-83	pfam 2397, COG 2148
<i>epsH</i>	Ramnosiltransferasa grupo2	<i>Pseudomonas syringae</i>	60%	258	1e-67	COG 1216, pfam 0535
<i>epsF</i>	Glicosiltransferasa grupo1	<i>Desulfotalea psychrophila</i> LSV54	55%	271	3e-71	COG 0438, pfam 0534
<i>epsG</i>	Glicosiltransferasa Grupo2	<i>Nostoc sp.</i> PCC7120	53%	168	2e-40	pfam 0535, COG 1216
<i>epsE</i>	Glicosiltransferasa grupo1	<i>Burkholderia cepacia</i> R18194	67%	376	1e-103	pfam 0534, COG 0438
<i>epsJ</i>	Glicosiltransferasa grupo 2	<i>Pseudomonas syringae</i>	58%	248	2e-64	COG 1216, pfam 0535
<i>wzx</i>	Proteína exportadora de polisacarido	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	56%	316	1e-84	pfam 1943, COG 2244
<i>wza</i>	Proteína exportadora de polisacarido	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47%	133	7e-30	pfam 2563
<i>wzc</i>	Proteína tirosinquinasa	<i>Burkholderia cepacia</i> R1808	41%	211	6e-33	COG 0484, COG 0489
<i>wzb</i>	Proteína de biosíntesis de EPS	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	50%	111	2e-23	COG 4464
<i>gdhGA</i>	UDP-glucosa/GDP-manosa dehidrogenasa	<i>Chlorobium tepidum</i> TLS	76%	563	1e-159	
<i>metW</i>	Metiltransferasa	<i>Nostoc punctiforme</i>	57%	92	1e-17	pfam 7021, COG 2227
<i>manC</i>	Fosfomanosa isomerasa/GDP-manosa pirofosforilasa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	89%	68.6	4e-11	pfam 0483, COG 0836
<i>epsJ</i>	Glicosiltransferasa grupo 2	<i>Pseudomonas syringae</i>	58%	248	2e-64	COG 1216, pfam 0535
<i>wbaZ</i>	Manosiltransferasa	<i>Deinococcus radiodurans</i>	60%	261	2e-68	pfam 0534, COG 0438

En el genoma de *A. ferrooxidans* se encontraron al menos 56 marcos de lectura abiertos que, por similitud de secuencia, estarían codificando para glicosiltransferasas pertenecientes a las distintas familias descritas. Al revisar los contextos genéticos en los

que se encuentran los genes predichos, se observó que la mayoría estarían formando operones, en los cuales hay uno o varios genes que codificarían para glicosiltransferasas. Al analizar los otros genes que hacen parte de estos operones, se podría eventualmente predecir los procesos celulares en los que podrían estar participando estas enzimas. Para definir los posibles operones se tuvieron en cuenta las distancias intergénicas, y se observó que estaban formando parte de operones con genes que codifican para proteínas involucradas en síntesis de membrana celular, glicógeno, cápsula bacteriana, lipopolisacárido, EPS.

En la Figura 9 se muestran los operones involucrados en la síntesis de lipopolisacáridos, polisacáridos de cápsula bacteriana y EPS en *A. ferrooxidans*. Las primeras etapas en las síntesis de estas estructuras bacterianas son iguales, tales como la síntesis de nucleótidos de azúcar (descrita anteriormente), la síntesis del undecaprenil fosfato, el anclador lipídico, la transferencia de los primeros azúcares, etc. Al igual a lo que ocurre en otros organismos, estos genes están formando posibles operones.

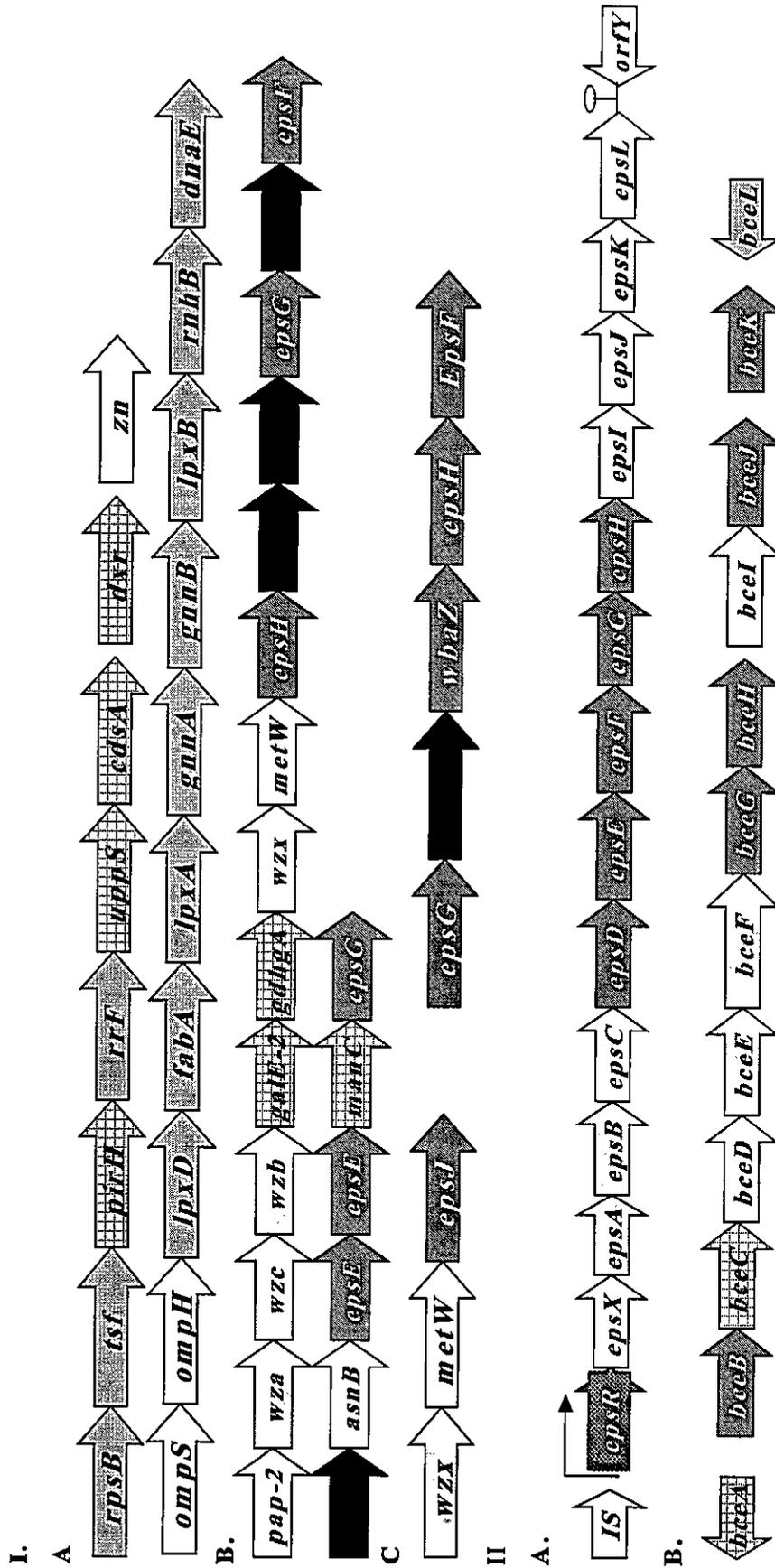


Figura 9. Organización de los genes del loci de producción de EPS en: I. *A. ferrooxidans*. A. Operones para la síntesis de lipopolisacáridos. B. Operones para la síntesis de EPS. C. Operones de glicosiltransferasas. II. Otras bacterias. A. L. *Lactis B. B. cepacia*. Genes de síntesis de precursores. Genes de regulación. Genes de exportación. Genes de glicosiltransferasas. Proteínas hipotéticas. Genes de función no definida en la síntesis de EPS.



Translocasas y polimerasas

La síntesis de los polisacáridos es un proceso complejo que involucra una serie de reacciones que ocurren en diferentes compartimentos celulares. La síntesis de los azúcares activados ocurre en el citoplasma, en cambio la generación de la unidad repetitiva sobre el anclador lipídico fosforilado ocurre en la cara citoplasmática de la membrana interna. Después de que se ha sintetizado la unidad repetitiva, ésta es translocada unida al anclador lipídico, a través de la membrana, por acción de una translocasa. Posteriormente una polimerasa se encarga de unir las unidades repetitivas en la cara periplasmática de la membrana interna, formando el polisacárido. Finalmente una enzima se encarga de catalizar la liberación del polímero de su unión con el anclador lipídico y de controlar el largo de cadena del mismo, mientras una proteína de membrana externa se encarga de exportarlo al exterior de la célula. (Laws *et al.*, 2001, Whitfield y Paiment, 2003) (Figura 10).

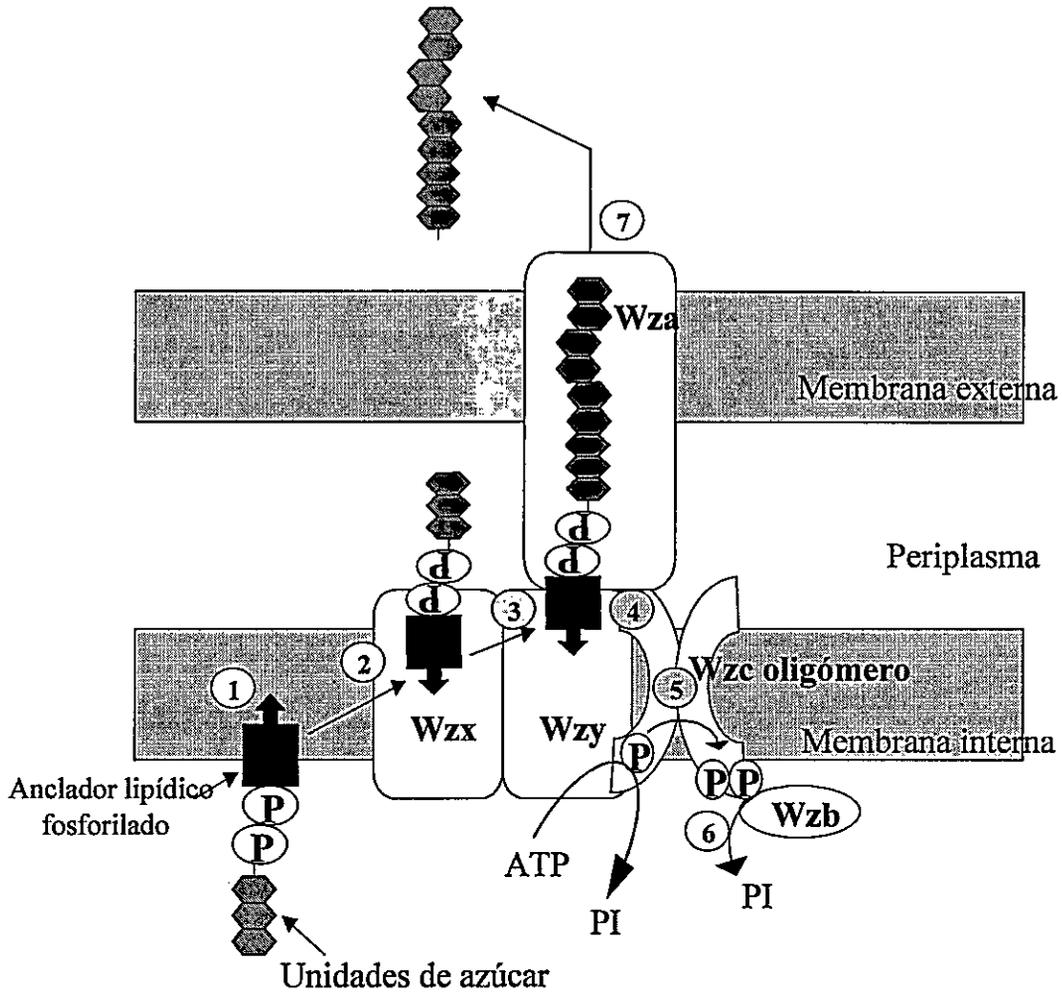


Figura 10. Translocación del EPS. 1. Unidad repetitiva del azúcar unida al anclador lipídico. 2. La unidad repetitiva unida al anclador lipídico es translocada hacia la cara periplasmática de la membrana interna por acción de Wzx. 3. Polimerización de la unidad repetitiva por Wzy. 4. La polimerización requiere de la función de Wzc como regulador del largo de cadena. 5. La función de Wzc depende de la autofosforilación seguida de transfosforilación en la forma oligomérica. 6. Wzc es desfosforilada por Wzb. 7. Exportación del EPS por Wza.

En el genoma de *A. ferrooxidans* se encontró un gen ortólogo que codificaría para la translocasa de membrana interna (Wzx) con una similitud de 56% con la Wzx de *G. xylinus*. Adicionalmente se encontró un gen putativo para la proteína de membrana externa encargada de exportar el polisacárido sintetizado (Wza), que tiene una similitud de 47% con la proteína Wza de *V. parahemolyticus* (Tabla 6).

Con respecto a la proteína que determina el largo de cadena y libera el polímero (Wzc), se encontró en *A. ferrooxidans* el ortólogo del gen que codifica para esta proteína, con una similitud de 41% con la proteína de *B. cepacia*, que se caracteriza por poseer en su extremo C-terminal un sitio de unión a ATP, así como también un C-terminal rico en tirosinas (Figura 11). Río abajo del gen *wzc* se encontró un ortólogo para el gen *wzb*, el cual codifica para una fosfatasa encargada de desfosforilar a Wzc, con una similitud de 50% con la fosfatasa de *P. gingivalis* (Tabla 6).

Tanto los genes de las proteínas involucradas en el transporte del polímero, como los de las proteínas que determinan el largo de la cadena, los de las glicosiltransferasas e incluso de las proteínas que participan en la síntesis de azúcares activados, son parte de un posible operón. Esta organización ha sido descrita en *E. coli*, bacterias ácido-lácticas, y en general en las bacterias productoras de EPS (Germond *et al.*, 2001., Laws *et al.*, 2001) (Figura 9 B).

E. amylovora	DVQAGQEIYMQLLNRRQELNISKASTVGDVRIIDHAETAAPVAPKSIILIVAGSLILGLV	437
K. pneumoniae	DVQVGQDVYLLQLLNKEQELSIKASTVGNVRIIDNAVTPDPKPKKLLVIVVLTVFVGM	437
B. cepacia	DAKVAEDIYVLLLNRRVQELSVQKAGTGGNIHLIDSALRPGDPVKPKKVLILSAAVFLGMI	462
B. pseudomallei	NAKVAEDIYVLLLNRRVQELSVQKAGTGGNIRLVDAALRPGVPVKPKKVLILSAATLLGLI	462
A. ferrooxidans	SSEVLGKLYMFLLEKQEEAAISKASTLTKNRILDTALIANLPVAPKAGKEVALYGFGLV	469
	. : * :*: : : : . . :*: * * : : :* .	
E. amylovora	VSVGLVLMKALFHHGIDNPEQLE--ELGLNVYASVPLSEWQRKKDQETLLKRRKLDARTDP	495
K. pneumoniae	LSIMYVIVKVAFHKGVSQAEQLE--ENGLNVYASIPLSDWQLKNVNN---SRKKDKK---	489
B. cepacia	LGTVVFLRRNMFQGIEDPDRIER-AFNLPYGLVPQSAAEQVKLDAQAEKGGSRARP---	518
B. pseudomallei	LGTSVFLRRNLFHGIEDPDRVER-AFNLPYGLVPMSAEQARFDADK--GNRVRP---	516
A. ferrooxidans	LGLSIVFGRYLLHPGFRSDEELRRRYPFLPVYGLLPAHAHSRPTKET-----	517
	. . : . . : . . :	
E. amylovora	HNRLLAGNPTDLSIEAIRSLRSLHFAMMDAQNILMITGASPGIGKTFVCANLATLVA	555
K. pneumoniae	KFDVLIKENGADLAIEAIRGLRTRLYFAMLEAKNNILMISGPSPEIGKTFVSTNLAVVA	549
B. cepacia	---ILASLRPKDLSVESLRSRRTAMQFAMMDAKNRVIVLTGPTPGIGKSFLTVNLAVLLA	575
B. pseudomallei	---ILACARPKDLSVESLRSRRTAMQFALMDAKNRVIVLTGPTPGIGKSFLAVNLALVA	573
A. ferrooxidans	---IFSPDPRSQYGEALRRLRGNFYLAARGEARGQVAMTSAIAGDGKSTLAFQLASALA	574
	: . . :* : : : : : : : : : : * : * : * *	
E. amylovora	KTGEKVLFIIDGDMRRGYTHELLGAES-KTGLSDILSGKLPFNTDLVQRGDYGFDFIARGQ	614
K. pneumoniae	QAGQKVLIDADMRRGYMHYFGGLP--NNGLSEILTGRVDYKAVVHTDIAGLDYIGRGE	608
B. cepacia	HSGKRVLLIDADMRRGLLDRYFGLTS-QPGLSELLSDQSALEDVAVRETPVQGLSFISAGT	634
B. pseudomallei	HSGKRVLLIDADMRRGSLDRHFGTGG--RRGLSELLSDQVALEEAIRETSVPGLSFIPSGA	632
A. ferrooxidans	QDGKRVLLIDADLRNPHAHAFHVTTQ--EPGLAGILVGRSTWQAAALHHIADVGIDLITAGN	633
	: * . * :*: :* . * * : * : : * . . : : *	
E. amylovora	VPPNPSELLMNSRMKELVHWASQNYDLVLIDTPPI LAVTDASIIIGKLAGTSLMVARFETN	674
K. pneumoniae	IPPNPAELLMGSRIEKFLWASGKYDLVLVDTPPILAVTDAAIIGRHVGTLLVVARFEKN	668
B. cepacia	RPPNPSELLMSTRLPQYLEGLGKRYDVVLIDSPPVAVTDAIIGRMAGSTFLVLRSGMH	694
B. pseudomallei	RPPNPSELLMSPRLSQYLDGLAKRYDMVIVDSPPI LAVTDATIFGELAGSTFLVLRSGMH	692
A. ferrooxidans	TPPNPSEHLGSGRLEQVLADLRSGYDIIFIDTPPPFPMVDILTIGPLADRLIIIAKVNHT	693
	****: * * : : : * :*: :* : * : * . . : : :	
E. amylovora	TVKEVEISYKRFIQN----GIDIKGIILNAVVR-KSANNYGYGYDYDYDYSYQQGEKS---	726
K. pneumoniae	TVKEIDVAKNRLEHS----GVIVKGVILNAVTR-KASNKYG-EYAYYEYKSKSKE-----	717
B. cepacia	TEGEIADAIKRLRTA----GVDLEGGIFNGVPP-KAR-GYGRGYAAVHEYL SA-----	741
B. pseudomallei	TEGEIGDAIKRLRTA----GVQLQGGIFNGVPA-RTR-GYGRGYAAVHEYL SA-----	739
A. ferrooxidans	PRRAYQEHQILGLNRPVGLIVNGIRVQSGSYGYGYGYGYGYGASDKALTPPKGWRRY	753
	: : * : : * :	

Figura 11. Alineamiento de región c-terminal de proteínas Wzc de *Erwinia amylovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei* y *A. ferrooxidans*. En amarillo se señala el sitio de autofosforilación (rico en tirosinas).

3.2 Resultados experimentales

3.2.1 Funcionalidad de los genes de la vía metabólica de Leloir

Como se mostró en la sección 3.1, el análisis bioinformático de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* permitió predecir la existencia de los genes de la vía metabólica de la galactosa en esta bacteria. Por esto, el paso siguiente fue la comprobación experimental de la funcionalidad de las proteínas codificadas por ellos.

Teniendo en cuenta la dificultad que existe para hacer estudios genéticos a *A. ferrooxidans*, y con el fin de confirmar la función de los genes identificados por bioinformática, se decidió hacer complementación de mutantes de *E. coli* para cada uno de los genes de la vía de Leloir. Las mutantes en los genes de la vía son incapaces de crecer en medio mínimo con galactosa y cuando crecen en agar MacConkey generan colonias de color blanco o translúcido, fenotipo característico de las bacterias que no degradan el azúcar. La complementación, por tanto, se puede evaluar por la restitución del crecimiento en MM con galactosa y la aparición de colonias rojas en agar MacConkey.

3.2.1.1 Amplificación y clonamiento de los genes de la vía de Leloir

Cada uno de los genes de la vía de Leloir se amplificó sin sus regiones reguladoras, usando los partidores a partir del ATG iniciador (Tabla 4). La ligación del vector (pKK233-3) con el producto de PCR se realizó teniendo en cuenta que la secuencia "Shine-Dalgarno" del vector (secuencia consenso de *E. coli*) quedara a una distancia adecuada del ATG del gen (3- 13pb), para lo que se usó el sitio *EcoRI* como sitio de clonación. Los plásmidos recombinantes generados fueron nombrados como

pgalE-1, pgalU-1 y ppgm-1. Todos los plásmidos obtenidos se propagaron en la cepa de *E. coli* JM105, para luego ser transformados en la mutante de *E. coli* correspondiente (materiales y métodos, Tabla 3). La presencia del fragmento en la dirección correcta fue evaluada por PCR.

Al intentar clonar el gen *galK* de *A. ferrooxidans*, sistemáticamente todos los clones obtenidos tenían el inserto en dirección contraria al sitio promotor y por tanto no se podía expresar la proteína deseada. Esto pudo deberse a que el producto de la reacción catalizada por la proteína GalK es la galactosa 1-fosfato, que al acumularse provoca un efecto tóxico en la célula, causando la lisis de las mismas (Krispin y Allmansberger, 1998). Por lo tanto, probablemente las bacterias que poseían el plásmido recombinante con el inserto en la dirección correcta estaban sobreexpresando GalK y ocasionando una alta producción de galactosa 1-fosfato, causando la muerte de la célula.

Por otra parte, tampoco fue posible clonar el gen *galP* de *A. ferrooxidans*, lo que pudo ser ocasionado por que la proteína codificada por este gen corresponde a una proteína de membrana que posee 12 hélices transmembránicas y que al ser sobreexpresada en la célula puede causar su muerte, debido a que la hace más permeable.

3.2.1.2 Complementación de mutantes

Cada una de las mutantes disponibles de *E. coli* se transformó por electroporación con el plásmido recombinante correspondiente, las transformantes se seleccionaron en agar MacConkey con ampicilina. La complementación de las mutaciones se detectó por el fenotipo de las colonias como se describió anteriormente.

Con respecto al gen *galT*, del que no se encontró un ortólogo en el genoma de *A. ferrooxidans* por métodos bioinformáticos, se realizó la complementación de la mutante correspondiente (Tabla 4), utilizando la genoteca de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 construída previamente en el laboratorio. Esta genoteca se construyó digiriendo el DNA genómico de la bacteria con *Sau3A*, obteniendo fragmentos de tamaño promedio de aproximadamente 1-3 Kb, los que posteriormente fueron clonados en el vector pUC-18.

Como se observa en la tabla 7, se obtuvo complementación positiva para todos los genes de *A. ferrooxidans* evaluados, incluso para el gen *galT*, con lo cual se comprueba que estos son funcionales en *E. coli*. Debido a que se presentan diferentes intensidades del color rojo en las colonias obtenidas de las distintas mutantes complementadas con los genes de *A. ferrooxidans*, se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo con galactosa con el fin de cuantificar la complementación observada (Figura 12).

Como se observa en la Figura 12, las mutantes son incapaces de crecer en medio mínimo con galactosa, mientras que la cepa silvestre crece normalmente. Con respecto a las cepas mutantes transformadas con el gen respectivo de *A. ferrooxidans* podemos ver que las mutantes con los genes *galE* y *galU*, presentan una velocidad de crecimiento similar a la de la cepa silvestre, lo que se correlaciona con una mayor intensidad en el color rojo de la colonia en agar MacConkey. La mutante complementada con el gen *pgm* de *A. ferrooxidans* presenta un crecimiento un poco mas lento que la cepa silvestre, al igual que la mutante *galT* complementada con la genoteca de la bacteria, que es la que presenta el crecimiento mas lento en este medio, las que también presentaron una menor intensidad en el color rojo de las colonias al ser plaqueadas en agar MacConkey. Esta

correlación entre la intensidad del color rojo en la placa de agar MacConkey y la velocidad de crecimiento en medio mínimo con galactosa, nos indica que la intensidad del color rojo de las colonias observadas en agar MacConkey es una medida de la capacidad del gen evaluado para complementar una mutación.

Tabla 7. Complementación de mutantes, colonias rojas en agar MacConkey. + Intensidad de color rojo. nd: no determinada.

Gen	Cepa	Complementación	
		Directa	Genoteca
<i>galE</i>	CSH41	+++	+++
<i>galU</i>	FF4001	+++	nd
<i>pgm</i>	JW1091	++	nd
<i>galT</i>	S491	nd	+
Silvestre	DH5 α		+++

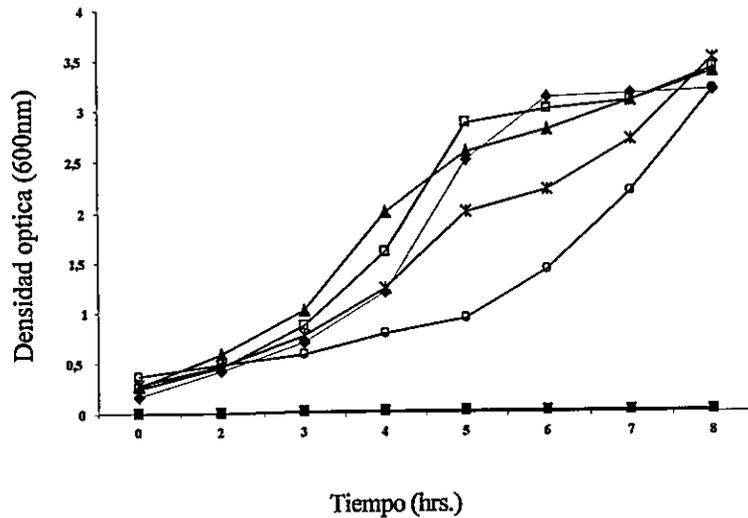


Figura 12. Curvas de crecimiento en medio mínimo suplementado con galactosa 0,5%. ■ Cepas de *E. coli* mutantes (CHS41, JW1091, FF4001 y S491), □ *E. coli* DH5 α (WT), ◆ Cepa CSH41(mutante *galE*) con pgalE-1, * Cepa JW1091 (mutante *pgm*) con ppgm-1, ▲ Cepa FF4001 (mutante *galU*) con pgalU-1 y ○ Cepa S491 (mutante *galT*) con pgalT-1.

3.2.1.3 Determinación de la actividad enzimática de las proteínas de la vía de Leloir

Con el fin de comprobar si la complementación de las funciones observadas en el punto anterior correspondía a la presencia de la actividad enzimática esperada, se midieron estas actividades usando el extracto celular obtenido a partir de cada una de las mutantes de *E. coli* complementadas con el gen respectivo de *A. ferrooxidans*. Como control negativo se utilizó la mutante transformada con el plásmido sin inserto y como control positivo la cepa silvestre de *E. coli*.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de las actividades enzimáticas de los extractos de las cepas de *E. coli* complementadas con los genes de *A. ferrooxidans*. Se observó que las actividades de GalE, GalU y PGM son altas con respecto al control positivo, lo que podría explicarse por la sobreexpresión de los genes de estas enzimas a partir de las secuencias reguladoras del vector. En cambio, la actividad GalT es baja, lo que podría deberse a que la complementación se realizó con un gen de *A. ferrooxidans* presente en la genoteca utilizada y que probablemente se expresaba a partir de sus propias secuencias reguladoras, puesto que el fragmento de DNA, al ser secuenciado, mostró contener alrededor de 200 pb río arriba del ORF identificado. Existen antecedentes que la maquinaria transcripcional y traduccional de *E. coli* no reconoce eficientemente a las secuencias reguladoras de *A. ferrooxidans* (Guiliani *et al*, 1997). Otra explicación podría ser que la enzima GalT de *A. ferrooxidans* no sea tan efectiva como la de *E. coli*, lo que se correlaciona con la menor velocidad de crecimiento en medio mínimo con galactosa de la mutante de *E. coli* complementada con el gen *galt* de *A. ferrooxidans* (Figura 12).

En algunos casos se puede observar que el control negativo tiene actividad enzimática. Esto se debe a que se trabajó con extractos celulares lo que ocasiona que el sustrato que utiliza la enzima de la reacción acoplada, esté presente en la mezcla de reacción, producto de vías metabólicas alternativas (materiales y métodos).

Tabla 8. Actividades enzimáticas de algunos genes de la vía de Leloir de *A. ferrooxidans* expresados en *E. coli*.

Cepa Mutante	^a Actividad enzimática		
	^b Control Negativo	^c Control positivo	^d Mutante Complementada
CSH41 (<i>galE</i>)	0	67.8±4.5	108.9 ± 2.1(pgalE-1)
JW1091 (<i>pgm</i>)	27.4±1.2	59.5± 12.3	120.8± 7.2 (ppgm-1)
FF4001 (<i>galU</i>)	0.5 ± 0.1	18.9 ± 5.7	45.0± 7.0 (pgalU-1)
S491 (<i>galT</i>)	5.6±1.0	9.7± 2.3	18.3 ± 1.1 (pgalT-1)

^a Actividad enzimática expresada como nmol x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína total. ^b Actividad enzimática en la cepa mutante transformada con el vector pKK233-3 sin el inserto de *A. ferrooxidans*. ^c Actividad enzimática tipo silvestre (DH5 α). ^d Actividad enzimática de la cepa mutante complementada con el plásmido que lleva el respectivo inserto de *A. ferrooxidans*. Cada valor es el promedio de tres medidas.

3.2.1.4 Identificación del gen *galT*

El DNA que complementó la mutación del gen *galT* fue secuenciado usando el kit de secuenciación de Promega fmol. A la secuencia resultante se le realizó un blastP con la base de datos no redundante del NCBI. El mejor resultado obtenido correspondía a la proteína GalT de *Kinecoccus radiotolerans* con un valor de e=4.3 y un porcentaje de similitud del 42%.

En la Figura 13 se muestra el contexto genético del gen *galT* identificado en el genoma de *A. ferrooxidans*. Se encontró que está formando parte de un locus genético, donde río arriba de *galT* se encuentra un gen que codifica para una helicasa (*hel*) y río

arriba de este se encuentra un gen que codifica para una α -galactosidasa (*araR*) que produce glucosa y galactosa a partir de melibiosa. Rio abajo del gen *galT* se encontraron genes que codificarían para los dominios ATPasa y permeasa de un transportador ABC involucrado en la resistencia a diferentes drogas (*mldB*). También se encontró un gen involucrado en conjugación (*trbE*) y otro que codifica para una proteína de membrana (*ompA*) y un gen que codificaría para una proteína hipotética. Teniendo en cuenta las distancias intergénicas de estas secuencias se podría suponer que están formando parte de un posible operón.



Figura 13. Contexto genético del gen *galT* en el genoma de *A. ferrooxidans*. En negro proteína hipotética

3.2.2 Ensayos de cotranscripción

Según la predicción bioinformática, los genes involucrados en la vía metabólica de la galactosa y de la producción de EPS están formando operones. Con el fin de confirmar experimentalmente esta predicción, se realizaron ensayos de cotranscripción usando como molde RNA total obtenido de *A. ferrooxidans* crecido en FeSO_4 .

Como se observa en la Figura 14 los genes *luxA*, *galE*, *galK*, *pgm* y *galM* de *A. ferrooxidans* están formando parte de un operón, denominado operón galactosa, mientras que el gen *rbn* río arriba de *luxA* y el gen *mgt* río abajo de *galM* no son parte del operón.

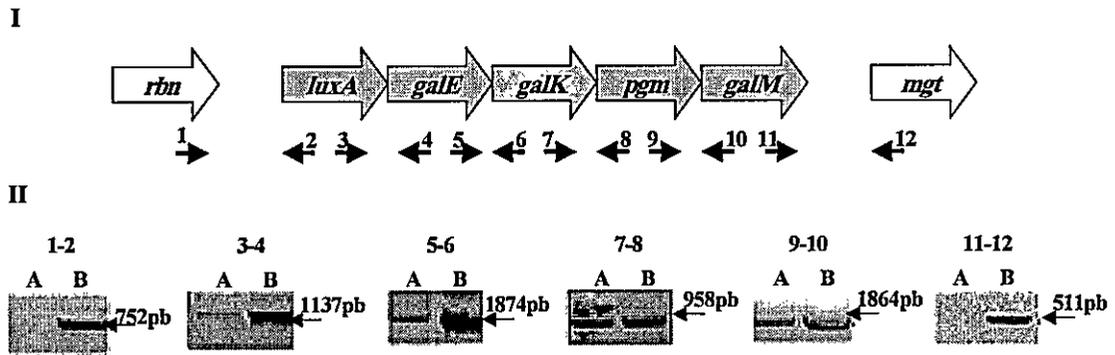


Figura 14. Cotranscripción del operón galactosa de *A. ferrooxidans*. I. Esquema del operón, y partidores usados para RT y PCR (tabla 4) II. A. Fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR utilizando RNA como sustrato. B. Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando DNA genómico como sustrato.

También se evaluó la organización del operón de producción del lipopolisacárido. En la Figura 15 se observa que los genes involucrados en esta vía metabólica están formando dos operones contiguos en el genoma de *A. ferrooxidans*. El primero codifica para enzimas encargadas de la síntesis del undecaprenil fosfato, que es el anclador lipídico que se usa para sintetizar EPS, y el segundo para enzimas que se encargan de la síntesis del lípido A, componente estructural del lipopolisacárido. Los genes con los que no se realizó el ensayo de cotranscripción corresponden a aquellos que se encuentran sobrepuestos en el genoma de *A. ferrooxidans* (ej: *rnhB* y *dnaE*).

En el operón en el que está el gen que codifica para la undecaprenil fosfato sintetasa (*uppS*), se encuentran además genes que se encargan de la generación de la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas, *rpsB* (proteína ribosomal S2), *tsf* (factor de elongación TSF) y *rrF* (Factor de reciclamiento de ribosoma). Mientras que en el operón de síntesis de lípido A se encuentran además de los genes propios de la vía (*lpxD*, *lpxA*, *LpxB*, *gmmB*, *gmmA*), genes que codifican para una ribonucleasa (*rnhB*), una

DNA polimerasa III (*dnaE*) y genes que codifican para proteínas de membrana (*ompH*, *ompS* y *zn*) (Figura 15).

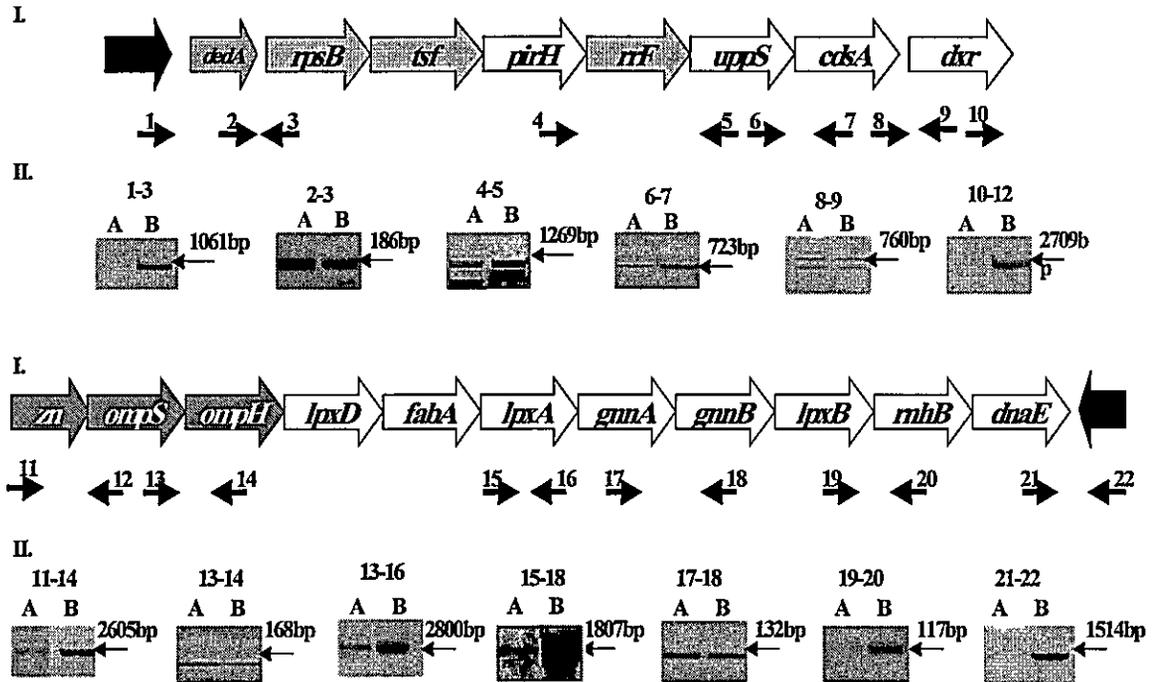


Figura 15. Cotranscripción de los genes involucrados en la síntesis de lipopolisacárido en *A. ferrooxidans*. I. Esquema de los operones y partidores usados para RT y PCR (Tabla 4) II. A. Fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR utilizando RNA como sustrato. B. Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando DNA genómico como sustrato.

3.2.3 Determinación de la expresión génica de los genes involucrados en la síntesis del EPS

En los trabajos realizados en *A. ferrooxidans* por Sand *et al.* (1999), se encontró que la composición y la cantidad del EPS sintetizado cambiaba dependiendo de la fuente de energía usada (FeSO_4 o azufre elemental). Con el fin de evaluar si estas diferencias se ven reflejadas en la expresión diferencial de los genes involucrados en la vía de síntesis del EPS, se realizaron ensayos de RT-PCR usando 2 μg de RNA total extraído en fase exponencial de crecimiento de células crecidas usando FeSO_4 o azufre elemental como fuente de energía. Con el fin de comparar los niveles de transcripción de los genes en las dos condiciones de crecimiento, se realizaron los respectivos PCR a diferente número de ciclos. Los resultados se muestran en la Figura 16.

Con respecto a los genes del operón galactosa de *A. ferrooxidans*, se puede ver que hay una expresión diferencial de estos genes en las condiciones de crecimiento evaluadas. Cuando se usa FeSO_4 como fuente de energía, los niveles de RNAm de los genes del operón galactosa son mayores que los encontrados en azufre. Mientras que el gen *galU*, que no hace parte del operón galactosa, presenta los mismos niveles de transcripción cuando se usan iones ferroso o azufre como fuente de energía. La galactosa permeasa, identificada por métodos bioinformáticos, presenta un mayor nivel de transcripción cuando se usa iones ferroso como fuente de energía, mientras que los niveles de transcripción en azufre son bastante bajos. Otro aspecto que vale la pena destacar es con respecto a la copia del gen *galE* (*galE-2*), que hace parte de un posible operón involucrado en la producción de EPS, el cual presenta mayores niveles de

transcripción cuando se usa azufre como fuente de energía, contrariamente a lo que sucede con el gen *galE-1* que se transcribe principalmente cuando la fuente de energía son los iones ferroso. Como control de no cambio se utilizó el gen *cydA* (Figura 16).

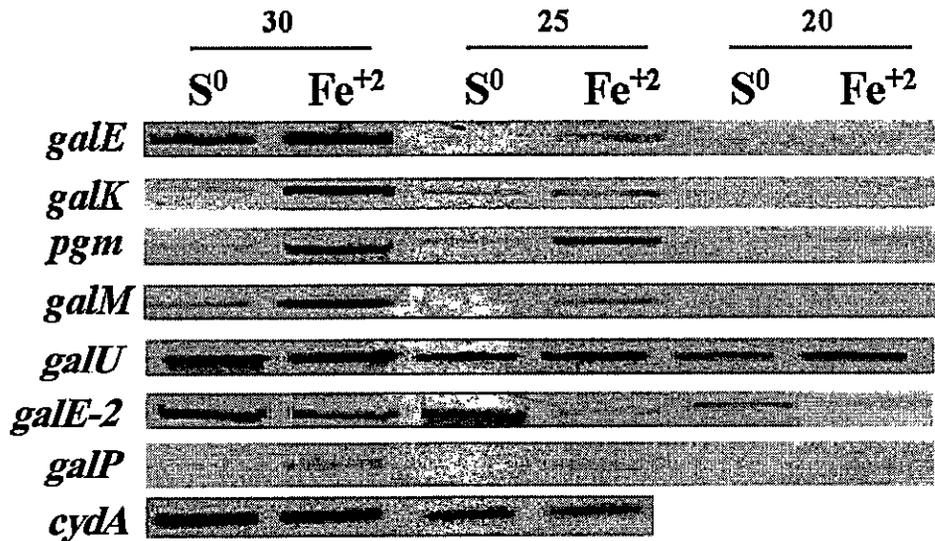


Figura 16. Expresión de los genes de la vía metabólica de la galactosa de *A. ferrooxidans* crecido en sales de medio 9K con FeSO₄ (Fe⁺²) ó azufre elemental (S⁰). La determinación se realizó por RT-PCR a diferente número de ciclos (20, 25 y 30).

También se realizaron ensayos de RT-PCR para el operón involucrado en la síntesis del lipopolisacárido, que incluye etapas comunes con la síntesis de EPS, como es la formación de undecaprenilfosfato. En la Figura 17 se observa que en los genes que forman parte de este operón hay un mayor nivel de transcripción cuando la bacteria se crece usando FeSO₄ como fuente de energía.

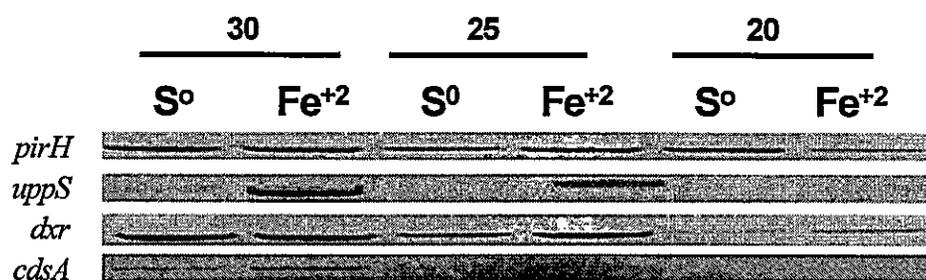


Figura 17. Expresión de los genes del operón involucrado en la síntesis de lipopolisacáridos en *A. ferrooxidans* crecido en sales de medio 9K con FeSO₄ (Fe⁺²) ó azufre elemental (S⁰). La determinación se realizó por RT-PCR a diferente número de ciclos (20, 25 y 30).

3.2.4 Efecto de la galactosa en el crecimiento de *A. ferrooxidans*.

A. ferrooxidans ha sido descrito como un autótrofo estricto, incluso se ha determinado que la presencia de compuestos orgánicos como glucosa, peptona, extracto de levadura, aminoácidos, ácidos carboxílicos, detergentes aniónicos, surfactantes catiónicos, inhiben su crecimiento y la oxidación de la fuente de energía (Tabita y Lundgren, 1971, Tuttle y Dugan, 1976, Rawlings y Kusano, 1994). Por ello fue interesante estudiar si la bacteria era capaz de utilizar galactosa como única fuente de energía, para lo cual se cultivó la bacteria en las sales del medio 9K suplementado con galactosa (concentraciones desde 0,25% hasta 7%) y a diferentes pH (entre 3,5 y 5,5). En las condiciones ensayadas, no se observó crecimiento de la bacteria en presencia de galactosa y ausencia de azufre, por lo que se puede deducir que *A. ferrooxidans* no es capaz de utilizar galactosa como única fuente de energía.

Para determinar si la galactosa tenía efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria se realizaron curvas de crecimiento evaluando diferentes concentraciones de

galactosa. Como se observa en la Figura 18, en los cultivos con galactosa no hay ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans*, como el que se había descrito para otros compuestos orgánicos (Rawlings y Kusano, 1994).

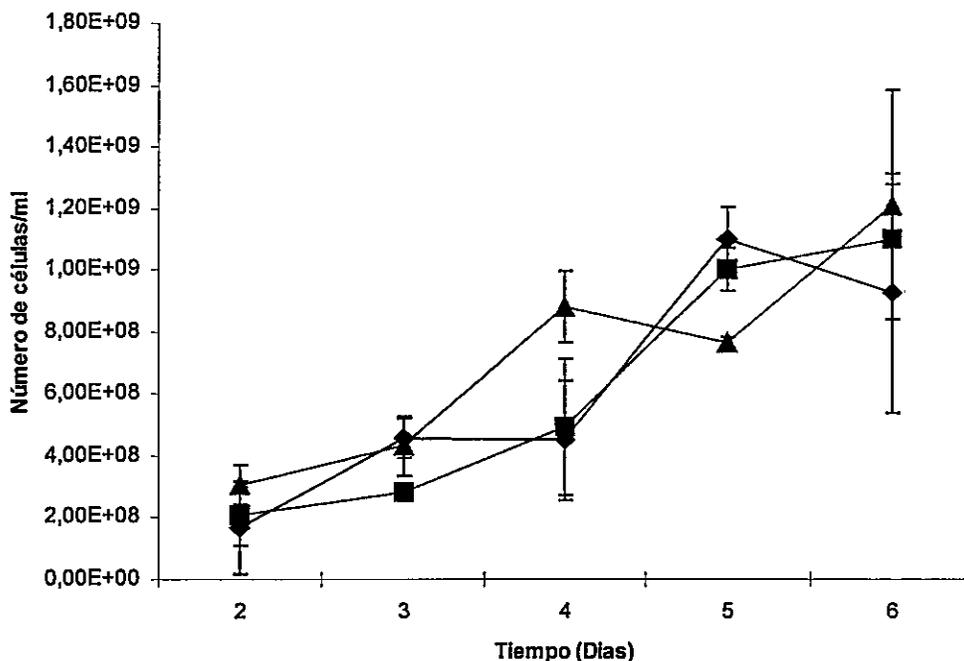


Figura 18. Crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de galactosa. Los cultivos se realizaron en sales de medio 9K con azufre, en presencia de galactosa 1% (■), galactosa 7% (◆) y sin galactosa (▲). Cada curva fue realizada por triplicado.

3.2.5 Incorporación de la galactosa a células y a el EPS producido por *A. ferrooxidans*

Con el fin de determinar si *A. ferrooxidans* era capaz de incorporar la galactosa y metabolizarla generando los intermediarios de síntesis necesarios para la producción de EPS, se realizaron experimentos utilizando ^{14}C -galactosa.

Se ha descrito que la galactosa permeasa de *E. coli* tiene una baja afinidad por este azúcar y por lo tanto sólo transporta galactosa cuando las concentraciones en el medio son altas (entre 50 μM y 200 μM) (Weickert y Adhya, 1993). Con el fin de alcanzar las concentraciones de galactosa deseadas en el medio de cultivo, se realizaron mezclas de galactosa radiactiva y galactosa fría.

Se creció *A. ferrooxidans* en medio 9K en presencia de galactosa 50 μM (mezcla de galactosa fría y galactosa marcada), el cultivo se detuvo en fase exponencial tardía de crecimiento. Las células se separaron del sobrenadante (EPS en solución) por centrifugación, luego se resuspendieron y se filtraron, se lavaron sucesivamente con sales minerales (9K) para eliminar la radiactividad que no ingresó a la célula (materiales y métodos) y posteriormente se midió la radiactividad presente en las células.

Para determinar el porcentaje de la radiactividad que se incorporó al EPS, al sobrenadante del cultivo se le realizó una diálisis contra agua destilada pH 2, la cual se cambió cada 12 h, hasta que no se detectaron azúcares ni radiactividad en el agua de desecho. Los azúcares se midieron usando el método de Dubois (1956). Finalmente se determinó la radiactividad que permanecía en la fracción soluble donde estaba el EPS (Tabla 9).

Tabla 9. Incorporación de ^{14}C -galactosa en células y EPS de *A. ferrooxidans*.

	Concentración (μM)	Radiactividad Total (cpm)	% Incorporación
^{14}C -galactosa inicial	50	3.38×10^6	-
^{14}C -galactosa en células	0.35 ± 0.05	115850 ± 495	$0.7\% \pm 0.1$
^{14}C -galactosa en EPS	0.037 ± 0.007	7965 ± 1350	$0.074\% \pm 0.013$

Se realizaron cultivos de *A. ferrooxidans* en medio 9K, en presencia de ^{14}C -galactosa radiactiva (Actividad específica 52.2 mCi/mmol). Los experimentos se realizaron por duplicado.

Como se observa en la Tabla 9, la incorporación de galactosa radiactiva en las células es cercana al 1%, y la radiactividad incorporada en el EPS soluble es cercana al 0.1%. Teniendo en cuenta que la radiactividad presente en el EPS, es un reflejo de la galactosa incorporada y metabolizada, se puede estimar que la incorporación final de galactosa corresponde aproximadamente al 1.1%. Es importante destacar que este trabajo constituye el primer informe que demuestra incorporación de un azúcar en *A. ferrooxidans*.

La radiactividad detectada en el EPS fue bastante baja, lo cual era esperable puesto que el cultivo que se realizó fue de 20 ml, siendo que para obtener una cantidad cuantificable de EPS en un cultivo de *A. ferrooxidans* en FeSO_4 , se utilizan por lo menos 60 lt de cultivo. Adicionalmente sabemos que la galactosa no es el único azúcar que compone el EPS, por tanto si la producción de EPS es baja, es esperable que la galactosa radiactiva incorporada en el EPS no sea alta.

3.2.6 Efecto de la galactosa en la producción de EPS en *A. ferrooxidans*

Debido a que se observó una baja incorporación de galactosa a la célula, se decidió determinar si la presencia de galactosa en el medio tenía algún efecto en la cantidad y composición del EPS generado por *A. ferrooxidans*. Esto nos permitiría ver un efecto directo o indirecto de la galactosa en la vía metabólica de producción del EPS de la bacteria.

3.2.6.1 Producción del EPS en *A. ferrooxidans*

Se purificó el EPS producido por *A. ferrooxidans* cuando creció usando como fuente de energía FeSO_4 o pirita (FeS_2) en presencia o ausencia de galactosa 0,25%. Debido a que la pirita es un sustrato sólido, se puede obtener el EPS que producen las células planctónicas y el EPS sintetizado por las células unidas al mineral.

Sand y Gehrke (1999) describieron que la cantidad de EPS producido por *A. ferrooxidans* cepa R1 era mayor cuando la bacteria crecía en un sustrato sólido en comparación con el EPS producido cuando la bacteria crecía en un sustrato soluble. Se quiso establecer si ocurría lo mismo con la cepa usada en este trabajo (*A. ferrooxidans* ATCC 23270). Como se observa en la Tabla 10, la cantidad de EPS producido por *A. ferrooxidans* crecido en FeSO_4 es menor que la producida cuando la bacteria crece en pirita.

En el caso de la pirita podemos comparar la cantidad de EPS generado en presencia y ausencia de galactosa. En la Tabla 10 se observa que con respecto a las células planctónicas, la cantidad de EPS producido en presencia de galactosa es tres veces mayor que la cantidad producida en ausencia del azúcar. Si observamos lo que ocurre con las células unidas al mineral también hay mayor producción de EPS cuando existe galactosa en el medio de cultivo (Tabla 10). Es importante recalcar que el valor obtenido para la producción de EPS por células unidas puede ser inferior al real, ya que es difícil asegurar que el tratamiento mecánico realizado logre liberar el total de las células presentes y por tanto no se logre la recuperación de todo el EPS presente.

Tabla 10. Efecto de la galactosa en la producción de EPS en *A. ferrooxidans*

Medio	^a ng de EPS/10 ¹⁰ cel.	
	-	+
^b FeSO ₄	38.9 ± 2.3	nd
^c Pirita (células adheridas)	90.2 ± 18.2	160.80 ± 11.3
^d Pirita (planctónicas)	50	150

a. La masa de EPS producido en cada condición de cultivo fue normalizado por 10¹⁰ células. (b) EPS producido por *A. ferrooxidans* crecido en medio 9K. EPS producido por células adheridas (c) y por células planctónicas (d) de *A. ferrooxidans* crecidas en sales de medio 9K suplementado con pirita 10%, en ausencia (-) y presencia de galactosa 0.25% (+). nd: no determinado

3.2.6.2 Efecto de la galactosa en la composición del EPS producido por *A. ferrooxidans*

Los EPS obtenidos en el punto anterior se hidrolizaron para obtener los azúcares en forma de monómeros. Las muestras se trataron químicamente con el fin de obtener el derivado alditol acetato de cada una de las azúcares presentes, para ser analizados por cromatografía de gases (materiales y métodos). Los resultados de estos cromatogramas se muestran en la Figura 19 (A-D). Un resumen de la naturaleza y cantidad de cada azúcar presente en el EPS obtenido en cada condición de cultivo se muestra en la Tabla 11.

Como se observa en la Tabla 11, todos los EPSs producidos por *A. ferrooxidans* estaban compuestos de azúcares como glucosa, ramnosa, manosa y xilosa. Adicionalmente se encontró que la galactosa sólo fue detectable en el EPS obtenido a partir del cultivo en FeSO₄.

Si comparamos la composición del EPS producido en pirita en presencia y ausencia de galactosa, la única diferencia es con respecto a la xilosa. El EPS sintetizado en pirita en presencia de galactosa no tiene xilosa, mientras que las proporciones de los otros azúcares se mantienen prácticamente igual.

Tabla 11. Composición del EPS producido por *A. ferrooxidans*.

	^a FeSO ₄	Pirita		
		^b Planctónicas	^c Adheridas sin gal	^d Adheridas con gal
Ramnosa (μmol)	0.52	1.19	0.52	0.71
Xilosa (μmol)	0.26	0.13	0.13	-
Manosa (μmol)	0.09	0.12	0.08	0.08
Glucosa (μmol)	0.24	0.71	0.40	0.55
Galactosa (μmol)	0.62	-	-	-

a. Composición de EPS producido por *A. ferrooxidans* en medio 9K. b. Composición de EPS producido por células planctónicas de *A. ferrooxidans* en sales de medio 9K suplementado con pirita al 10%. c. Composición de EPS producido por células de *A. ferrooxidans* adheridas a pirita, en sales de medio 9K suplementado con pirita al 10%. d. Composición de EPS producido por células de *A. ferrooxidans* adheridas a pirita en sales de medio 9K suplementado con pirita al 10% y galactosa 0,25%. Para el análisis se usaron 10 mg de cada uno de los EPS evaluados.



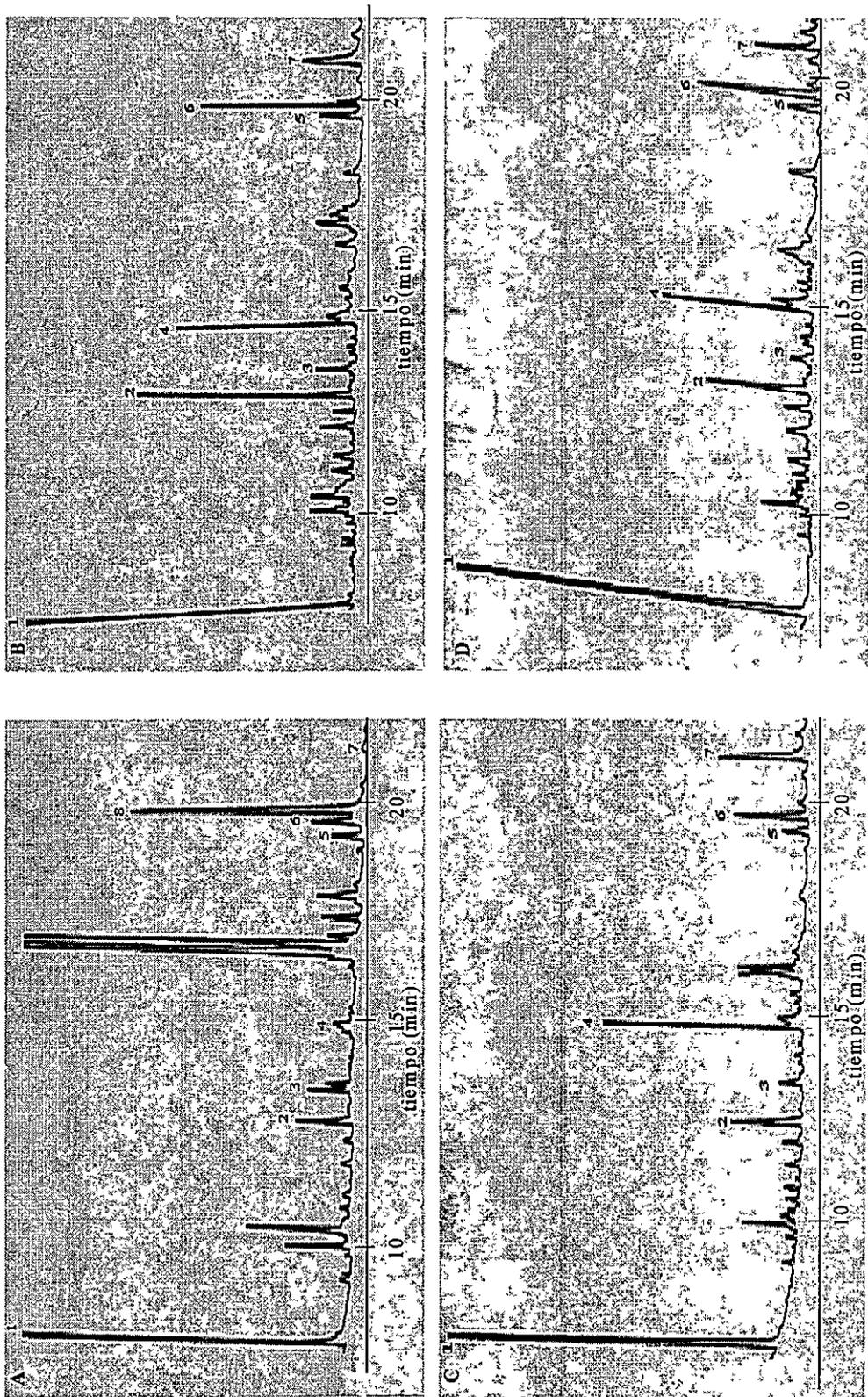


Figura 19. Cromatogramas del EPS producido por *A. ferrooxidans* crecido en sales de medio 9K con A. FeSO₄, B. Pirita (células planctónicas), C. Pirita (células adheridas), D. Pirita con galactosa 0,25% (células adheridas). 1. Estándar interno 2. Ramnosa 3. Xilosa 4. Desconocido 5. Manosa 6. Glucosa 7. Desconocido 8. Galactosa.

También se evaluó la presencia de azúcares como arabinosa y fucosa, los cuales no se detectaron en los EPS obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo.

Vale la pena destacar la presencia en los cromatogramas (Figura 19 A-D) de los EPS sintetizados en las diferentes condiciones de cultivo, de dos picos que no corresponden a ninguno de los estándares de azúcares usados. Uno de ellos podría corresponder al ácido glucurónico, que por predicción bioinformática debería estar siendo parte del EPS.

3.2.6.3 Efecto de la galactosa en la expresión de los genes de la vía de producción del EPS

Debido a que se estableció que la presencia de galactosa en el medio de cultivo ocasionaba una mayor producción de EPS, era necesario determinar si al crecer la bacteria en la presencia del azúcar, los niveles de transcripción de los genes de la vía de Leloir y de producción de EPS se veían afectados. Para ello, la bacteria se creció usando como fuente de energía FeSO_4 , ya que en este medio los genes de síntesis de precursores presentaron mayores niveles de transcripción (Figuras 16 y 17), en presencia y en ausencia de galactosa. El RNA mensajero se obtuvo desde las células en fase exponencial de crecimiento, en las dos condiciones ensayadas. Como se muestra en la Figura 20, los genes del operón galactosa de *A. ferrooxidans* presentaron un mayor nivel de transcripción cuando la bacteria creció en presencia de galactosa, comparado con el medio sin galactosa. El gen *galE-2* que se encuentra en el operón de producción de EPS, al contrario de lo que sucede con el gen *galE-1* que se encuentra en el operón galactosa, presentó mayores niveles de transcripción en ausencia de galactosa. También es

3.2.6.4 Efecto de la presencia de galactosa en la unión de *A. ferrooxidans* a pirita

Según Sand *et al.*, (1999), la producción de EPS es un prerrequisito para que *A. ferrooxidans* se una al sustrato sólido. Como se demostró anteriormente, en presencia de galactosa, *A. ferrooxidans* produce mayor cantidad de EPS, por lo que fue interesante investigar si la presencia de este azúcar modificaba la capacidad de unión de la bacteria a un sustrato sólido como la pirita.

En este experimento las células fueron precultivadas en FeSO_4 en presencia o ausencia de la galactosa 0,25%, lo que nos permitiría evaluar si existía un efecto debido a cambios metabólicos provocados por el crecimiento de la bacteria en presencia del azúcar. Estas células se recuperaron por centrifugación y se lavaron dos veces para realizar el ensayo de unión (materiales y métodos). El ensayo de unión a pirita, con células precultivadas en presencia o ausencia de galactosa, se realizó en ausencia o presencia de galactosa (0,25%).

Se observó que la galactosa agregada en el momento de realizar el ensayo de unión no tenía ningún efecto en la unión de la bacteria a la pirita, tanto en células precultivadas en ausencia de la galactosa como en presencia de la misma (datos no mostrados). En la Figura 21 podemos comparar los resultados obtenidos con células precultivadas con galactosa y de células precultivadas en ausencia de ésta. Se observa que la unión ocurre más rápidamente y hay un mayor número de células unidas en células precultivadas con galactosa. En células precultivadas sin galactosa los máximos se alcanzan en la primera hora de ensayo, mientras que células precultivadas con galactosa la unión a pirita ocurre principalmente en los primeros 10 minutos de ensayo.

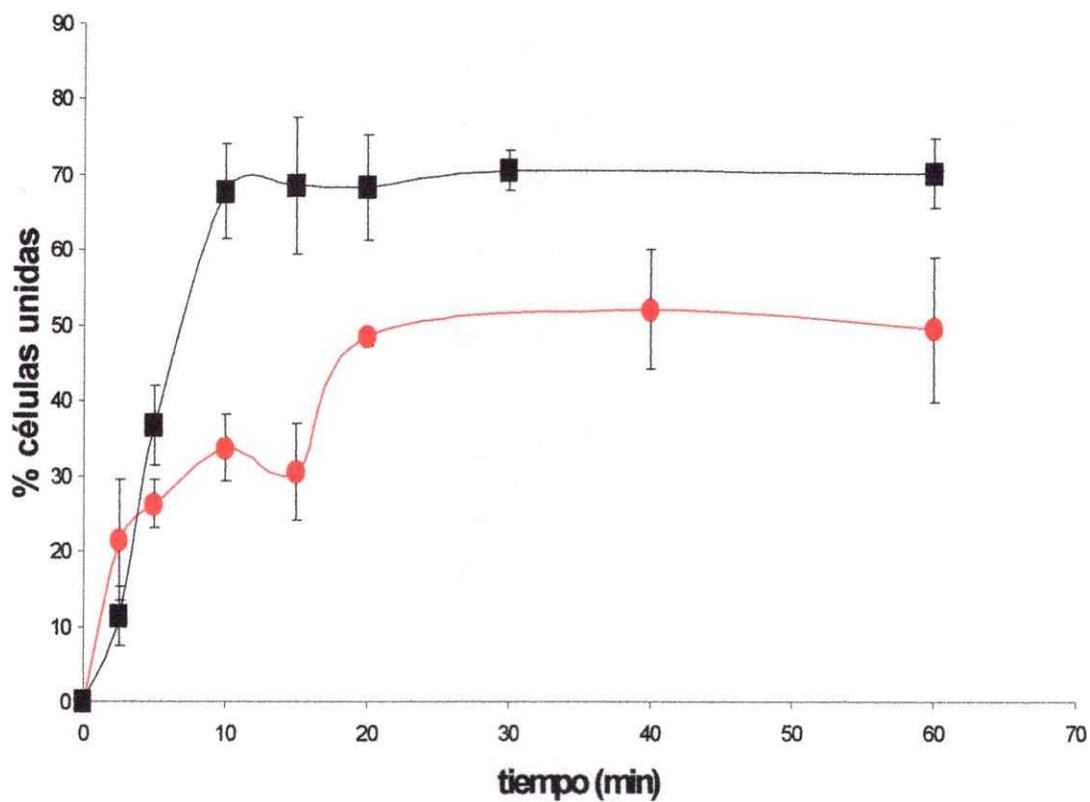


Figura 21. Porcentaje de células de *A. ferrooxidans* unidas a pirita. Células crecidas previamente en medio 9K en presencia de galactosa 0,25% (Negro). Células crecidas previamente en medio 9K en ausencia de galactosa (rojo).

3.2.6.5 Efecto de la galactosa en la formación de biopelículas de *A. ferrooxidans* sobre un sustrato sólido

La formación de biopelículas de una bacteria sobre un material abiótico depende de la capacidad de unión de ésta a la superficie del material. A su vez, esta capacidad depende en gran medida de la producción de EPS, que permite que la adhesión de la bacteria a la superficie sea irreversible. El EPS también contribuye a la maduración de la biopelícula ya que permite la formación de las estructuras tridimensionales características de una biopelícula madura (Lauriano *et al.*, 2004). En los resultados obtenidos en el punto anterior, se muestra que la galactosa tiene un efecto en la unión de la bacteria al sustrato y en la producción de EPS, por lo que se quiso ver si este efecto se veía reflejado en la formación de biopelículas.

Con este fin, se creció *A. ferrooxidans* en sales de medio 9K usando como fuente de energía pirita, en ausencia y presencia de galactosa 0,25%. Se tomaron muestras de trozos de pirita a las 24 y 48 h. Las biopelículas formadas se observaron por microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de fluorescencia.

En las Figuras 22 y 23 se observa que cuando las células se cultivaron en pirita en presencia de galactosa, existía un mayor número de bacterias en la superficie de la pirita a las 24 h y 48 h. Adicionalmente podemos ver que a las 48 h, en presencia de galactosa, hay una mayor cobertura de la superficie de la pirita por células y EPS con respecto al cultivo sin galactosa.

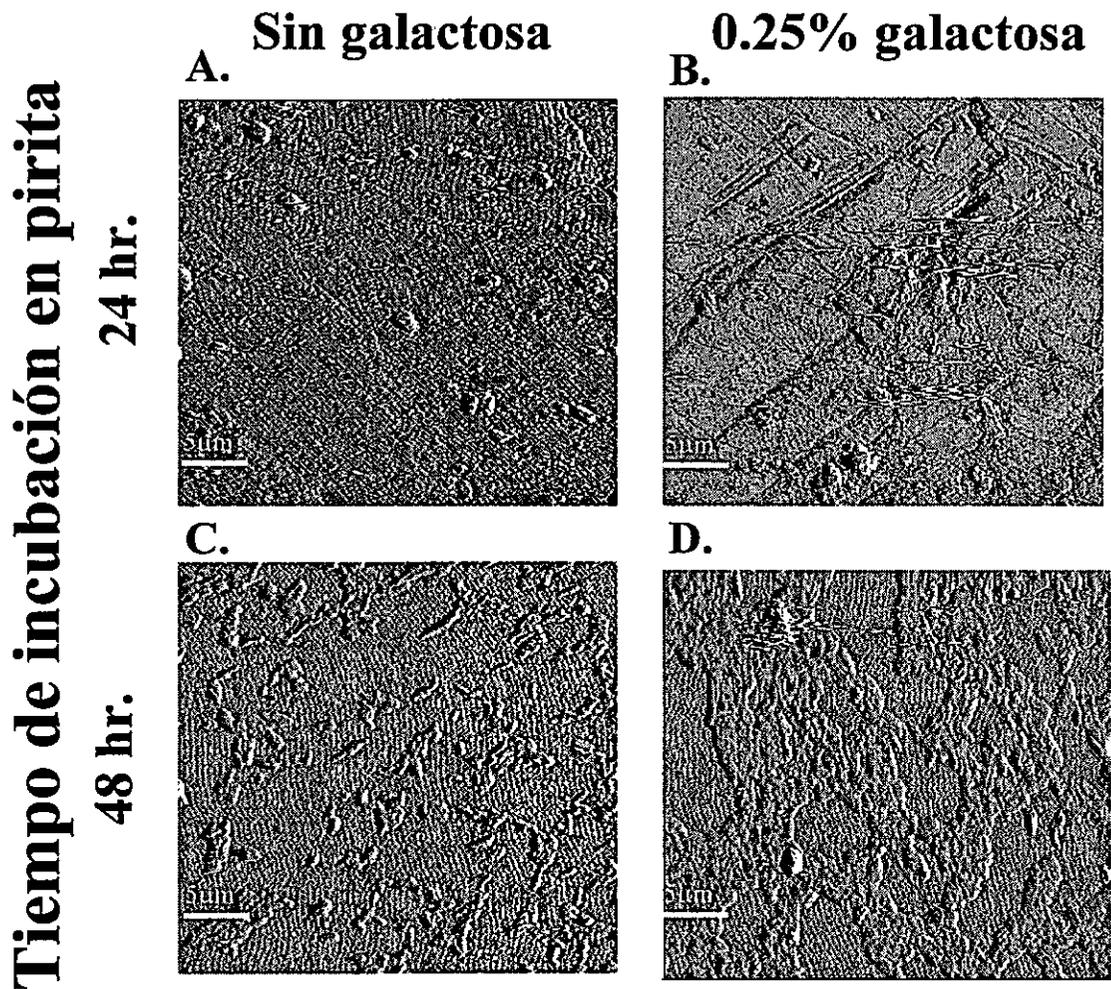


Figura 22. Observación de biopelículas de *A. ferrooxidans* en pirita por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM). Se tomaron muestras del cultivo de *A. ferrooxidans* en sales del medio 9K con pirita en A. Ausencia de galactosa a las 24 h. B. Presencia de galactosa 0,25%, a las 24 h. C. Ausencia de galactosa a las 48 h. D. Presencia de galactosa 0,25% a las 48 h.

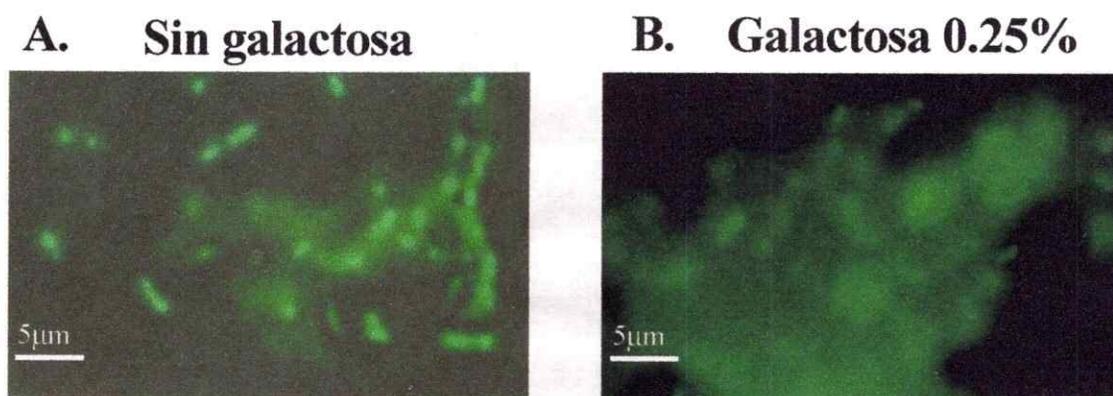


Figura 23. Observación de biopelículas de *A. ferrooxidans* en pirita por microscopía de fluorescencia. Se tomaron muestras del cultivo de *A. ferrooxidans* en sales del medio 9K con pirita en ausencia (A) ó presencia de galactosa 0,25% (B). Las muestras se tiñeron con naranja de acridina según procedimiento descrito por Yeh *et al.* (1997).

4. DISCUSION

4.1 La vía de Leloir en *A. ferrooxidans*

Usando herramientas bioinformáticas y experimentales se logró comprobar que la bacteria *A. ferrooxidans* ATCC 23270 poseía todos los genes involucrados en la vía metabólica de la galactosa. Adicionalmente se demostró que sus respectivos productos génicos son funcionales en *E. coli*, cumpliendo la actividad enzimática asignada. La presencia de la vía metabólica de la galactosa funcional en *A. ferrooxidans*, sugiere que esta bacteria eventualmente sería capaz de utilizar el azúcar para generar precursores de síntesis de polisacáridos y /ó como fuente de energía.

En *A. ferrooxidans* la producción de EPS es fundamental para que la bacteria interaccione con el sustrato sólido, ya que éste permite la unión y facilita la formación de biopelículas sobre el mismo (Sand *et al.*, 1999). Debido a que en los ensayos realizados *A. ferrooxidans* ATCC23270 no utilizó la galactosa como fuente de energía, la posible función de la vía de Leloir en esta bacteria en las condiciones ensayadas sería la de generar los precursores necesarios para la síntesis de EPS, tanto en presencia de la galactosa como en ausencia de ésta.

En *Streptococcus thermophilus* LY03 y *Bacillus subtilis* se ha demostrado que la presencia de los genes de la vía de Leloir no necesariamente implica que la bacteria sea capaz de crecer utilizando galactosa como fuente de energía. En estas bacterias las proteínas de la vía de Leloir tienen como función generar los UDP-azúcares necesarios para la síntesis de EPS. Esto es debido a la baja actividad que tienen las enzimas

involucradas en la vía de Leloir de estas bacterias (Krispin y Allmansberger, 1998, Vaughan *et al.*, 2001; Vaillancourt *et al.*, 2002).

Al analizar el operón galactosa identificado en el genoma de *A. ferrooxidans* (Figura 27), la organización de los genes es similar a la que se ha descrito para otras bacterias tales como *E. coli* K30, *K. pneumoniae* K2 y en bacterias ácido-lácticas como *L. casei* (Figura 24) (Peng *et al.*, 1992, Weickert y Adhya, 1993, Bettenbrock y Alpert, 1998, Vaillancourt *et al.*, 2002). Al igual a lo que ocurre en la mayoría de las bacterias, el gen *galU* de *A. ferrooxidans* no es parte del operón galactosa. El producto de este gen es importante en diferentes procesos metabólicos y por esta razón no es regulado por galactosa.

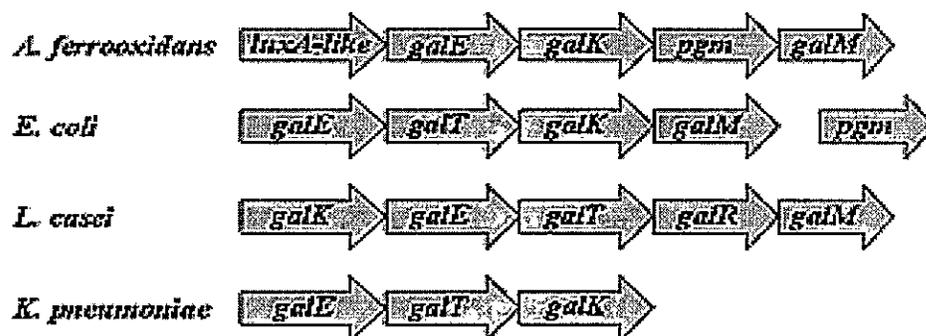


Figura 24. Organización del operón galactosa en *A. ferrooxidans*, *E. coli*, *Lactobacillus casei* y *Klebsiella pneumoniae*

Es interesante destacar la presencia del gen *luxA* en el operón galactosa de *A. ferrooxidans*, lo que no ha sido observado en ninguno de los operones galactosa descritos hasta el momento. Por análisis bioinformático se encontró que la proteína LuxA de *A. ferrooxidans* posee un motivo de unión para el cofactor F420. Este cofactor fue descrito inicialmente en arqueas metanogénicas, donde está involucrado en las

reacciones de biosíntesis de metano (Purwantini y Daniels, 1998). Recientemente este cofactor ha sido identificado en arqueas no metanogénicas como *sulfolobus* y en bacterias incluyendo diferentes especies de *Streptomyces*, *Nocardia aurantia* y varias especies de *Mycobacterium*. En bacterias, el F420 es un componente de las fotoliasas encargadas de reparar el DNA, actividad asignada a las luciferasas bacterianas (Purwantini y Daniels, 1998; Czyz *et al.*, 2000). En especies de *Mycobacterium* y *Nocardia* se ha identificado una glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de F420. La proteína LuxA de *A. ferrooxidans* tiene similitud con la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Rhizobium sp.*, que cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, producto que inicia la vía de las pentosas.

Es interesante resaltar que el gen que codifica para la proteína fosfoglucomutasa, presente en el operón galactosa de *A. ferrooxidans*, está ausente en el operón galactosa de otras bacterias. Esta proteína cataliza la interconversión de glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato, la que sería sustrato de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, actividad asociada a la proteína tipo LuxA descrita en el párrafo anterior, para iniciar el ciclo de las pentosas. Por lo tanto se podría especular acerca de la función de la proteína tipo LuxA en *A. ferrooxidans*, que sería conectar la vía de la glucosa 1-fosfato con la vía de las pentosas. Esta organización del operón galactosa de *A. ferrooxidans* le permitiría canalizar la producción de los precursores de EPS en diferentes condiciones metabólicas de la bacteria, teniendo en cuenta la posibilidad de que la proteína tipo LuxA catalice la reacción reversa, de 6-fosfogluconolactona a glucosa 6-fosfato, lo que le permitiría asegurar la producción de los precursores de EPS a partir de los productos de fijación del CO₂. Es interesante destacar el papel central que podría estar cumpliendo la galactosa 1-

P, intermediario de la vía de Leloir, ya que permitiría conectar varias rutas del metabolismo del carbono, como la gluconeogénesis, la síntesis del glicógeno, la síntesis de los intermediarios de EPS, la glicólisis, la vía de las pentosas y la fijación de CO₂, lo que le permitiría a la bacteria regular el metabolismo del carbono según las condiciones en las que se encuentre y sus necesidades energéticas.

El gen *galT* de *A. ferrooxidans*, contrariamente a lo que sucede en otras bacterias, no se encuentra ubicado dentro del operón galactosa. Se encontró un candidato para éste ubicado en un locus génico donde se encuentran otros genes relacionados con el metabolismo de los azúcares, tales como el gen *araR*, que codifica para una α -galactosidasa que genera glucosa y galactosa a partir de melibiosa. Por lo tanto, el gen *galT* de *A. ferrooxidans* estaría formando parte de un operón donde existen otros genes relacionados con el metabolismo de la galactosa, lo que podría estar confirmando su función. La proteína GalT en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 poseería 120 aa. El tamaño de esta proteína es menor que otras proteínas GalT identificadas en bacterias, las que usualmente poseen alrededor de 340 aa (Geeganage *et al.*, 2000). Adicionalmente la posible proteína GalT de *A. ferrooxidans* tendría una baja identidad con las proteínas GalT descritas. Sólo se encuentra un resultado con baja probabilidad correspondiente a la proteína GalT de *K. radiotolerans*.

La proteína GalT pertenece a la superfamilia HIT (histidine Triad). Los miembros de esta familia funcionan como hidrolasas de nucleótidos o transferasas que actúan sobre el fósforo α del nucleótido (Holden *et al.*, 2003). La posible proteína GalT de *A. ferrooxidans* no posee el dominio pfam 01230 que contiene el motivo HIT.

Existe la probabilidad que la actividad uridiltransferasa identificada en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, no sea debida a la presencia de una proteína GalT, si no a la presencia de otra proteína capaz de suplir esta actividad. Este podría ser el caso de proteínas pertenecientes a la familia de las glicosiltransferasas, de las cuales existen varias representantes en el genoma de *A. ferrooxidans*. Estas proteínas se encargan de la transferencia de diferentes azúcares y nucleótidos a diferentes tipos de sustratos. Aunque en general estas enzimas son muy específicas, con respecto al sustrato y al grupo que se transfiere, pueden también catalizar otro tipo de reacciones de transferencia, con menor eficiencia (Hennet, 2002).

En las bacterias ácido-lácticas, *E. coli* y *K. pneumoniae*, se ha descrito la importancia que tienen los galactósidos (UDP-glucosa y UDP-galactosa) en la síntesis de diferentes estructuras de la célula, por lo que los genes del operón galactosa tienen una expresión basal constitutiva (Bettenbrock y Alpert, 1998). Adicionalmente los genes del operón galactosa están sujetos a diferentes formas de regulación (transcripcional y postranscripcional) que depende de las condiciones en las que se encuentre la bacteria (Peng *et al.*, 1992, Grossiord *et al.*, 2003). En *A. ferrooxidans* el operón galactosa debería también tener un nivel de transcripción constitutiva. Esto permitiría asegurar la síntesis de los galactósidos, y la transcripción del gen *pgm*, que codifica para una proteína importante para el metabolismo general de la bacteria.

Con respecto a la regulación del operón galactosa de *A. ferrooxidans* se pueden plantear varias hipótesis teniendo en cuenta la función propuesta para este operón en la bacteria, que sería la de generar los precursores para la síntesis de los polisacáridos. Además hay que tener en cuenta la presencia en el operón galactosa de *A. ferrooxidans*

de genes como *luxA*. En las bacterias luminescentes y en otras bacterias donde el gen *luxA* ha sido identificado, se ha establecido que este gen y en general los genes involucrados en la producción de luz están regulados por “quorum sensing” (Czyz *et al.*, 2000). En *A. ferrooxidans*, *luxA* es el primer gen del operón galactosa. Se podría postular que al igual a lo que se ha descrito en otras bacterias, *luxA* y por tanto el operón galactosa de *A. ferrooxidans* esté siendo regulado por el sistema de quorum sensing. Esto está de acuerdo con la función propuesta para los genes del operón galactosa de *A. ferrooxidans*, que es la de generar los precursores necesarios para la síntesis de los polisacáridos, dentro de los cuales están los EPS, indispensables en la formación de biopelículas. En muchos casos descritos en otras bacterias, los genes involucrados en la formación de biopelículas son regulados por “quorum sensing”. (Pellock *et al.*, 2002, Hoang *et al.*, 2004). En el genoma de *A. ferrooxidans* se encuentran los genes que codifican para el regulador de respuesta de “quorum sensing” (LuxR) y la sintetasa encargada de producir el autoinductor (LuxI) (comunicación personal Mariella Rivas). Utilizando métodos bioinformáticos, se realizó la búsqueda de una posible caja lux (sitio de unión de LuxR), río arriba del operón galactosa, pero no fue posible identificar ninguna secuencia candidata. Esto no descarta su existencia, por lo que es necesario realizar una búsqueda de la caja lux utilizando una estrategia experimental.

En *E. coli* el operón galactosa no está regulado por “quorum sensing”. La regulación es llevada a cabo por GalR y GalS, los represores del operón. En ausencia de galactosa, GalR y GalS inhiben la transcripción del operón y en presencia de ésta se disocian del sitio operador permitiendo así la transcripción del operón (Weickert y Adhya, 1993). Por análisis bioinformático no fue posible identificar los genes ortólogos

de los represores del operón galactosa en el genoma de *A. ferrooxidans*, ni tampoco los sitios de unión para estos reguladores. Se sabe que CAP, la proteína de unión a AMPc, regula positiva y negativamente la transcripción del operón dependiendo de las condiciones metabólicas. En el genoma de *A. ferrooxidans* se identificó un gen ortólogo del gen que codifica para la proteína CAP. Sin embargo en la región río arriba del operón galactosa de la bacteria, no se identificaron los sitios de unión para esta proteína identificados en *E. coli* (TGTGA... N₆...TCACA) (Weickert y Adhya, 1993). La pregunta que surge es si la proteína CAP de *A. ferrooxidans* reconoce la secuencia consenso de *E. coli*, ya que se ha descrito que las secuencias consenso de las regiones promotoras definidas para *E. coli* no se conservan exactamente en *A. ferrooxidans* (Guilliani *et al.*, 1997, Levicán *et al.*, 2002). El estudio de la regulación del operón galactosa de *A. ferrooxidans* podría dar pistas acerca de los procesos en los que esta vía participa dentro del metabolismo de la bacteria.

A pesar de que aun no se conoce la verdadera regulación del operón galactosa de *A. ferrooxidans*, lo claro es que la organización de este operón le permitiría asegurar la síntesis de los precursores de polisacáridos en cualquier condición de crecimiento o en un nicho ecológico dado. Esta organización permite canalizar los productos de la fijación de CO₂ y de la vía metabólica de la galactosa hacia su síntesis, favoreciendo así su adaptación a diferentes tipos de sustratos.

4.2 Genes para la síntesis de EPS

Usando herramientas bioinformáticas se identificaron en el genoma de *A. ferrooxidans* los genes necesarios para la síntesis de EPS.

En *A. ferrooxidans* los genes de la vía de síntesis de los polisacáridos están formando operones, tal como se ha descrito en las bacterias ácido-lácticas, en las bacterias formadoras de nódulo y la mayoría de las bacterias productoras de EPS (Glucksmann *et al.*, 1993, Bugert y Geider, 1995, Laws *et al.*, 2001). En las bacterias ácido- lácticas y otras bacterias productoras de EPS los genes del “cluster” de biosíntesis de EPS tienen una organización definida, donde primero están los genes involucrados en la regulación, luego están los genes encargados de la determinación del largo de cadena del EPS, después hay un locus de genes que codifican para las glicosiltransferasas, luego los genes involucrados en la polimerización del EPS y por último otros genes involucrados en la exportación del EPS (Figura 9) (Stingele *et al.*, 1999; Laws *et al.*, 2001). En *A. ferrooxidans* se conserva esta organización, pero a diferencia de lo que ocurre en bacterias ácido-lácticas, se incluyen genes involucrados en la síntesis de los UDP-azúcares, tales como *galE* y *manC*. Este último codifica para una fosfomanosa isomerasa/GDP-manosa pirofosforilasa, que permite obtener GDP-manosa a partir de fructosa 6-fosfato. La presencia de estos genes también ha sido descrita en el locus de EPS de *Burkholderia cepacia* IST408 (Moreira *et al.*, 2003).

Otro gen que es encontrado en este locus genético de *A. ferrooxidans* es el que codifica para una UDP-glucosa deshidrogenasa, *gdhgA*, que usa UDP-glucosa para generar ácido glucurónico. Esto coincide con lo descrito por Gehrke *et al.* (1998) quienes encontraron que el EPS sintetizado por *A. ferrooxidans* cepa R1 está formado por ácido glucurónico.

Los otros genes involucrados en la síntesis de los galactósidos no forman parte del locus de síntesis de EPS, como es el gen del operón galactosa, *pgm*, y el gen *galU*,

que junto a *galE* (una copia en este locus) son esenciales para obtener UDP-glucosa y UDP-galactosa a partir de la glucosa. Tampoco están en este locus los genes que permiten generar dTDP-ramnosa. Esto podría explicarse con el hecho que estos genes estarían involucrados en otros procesos metabólicos como la síntesis de la pared celular y la síntesis de los lipopolisacáridos, no siendo específicos para la producción de EPS.

Adicionalmente se encontró que muchos de los genes involucrados en la síntesis del EPS están en varias copias en el genoma de *A. ferrooxidans*, como por ejemplo las glicosiltransferasas, que se ubican en diferentes contextos genéticos. Este hecho podría implicar que estas glicosiltransferasas estén involucradas en diferentes procesos metabólicos, tales como formación de pared celular, síntesis del LPS, síntesis del glicógeno y en la síntesis de diferentes tipos de EPS. Esta organización y el variable número de copias de los genes de EPS en el genoma de *A. ferrooxidans* podría permitirle a la bacteria no sólo controlar el metabolismo de los azúcares, si no que también el uso de los productos de estos genes para diferentes propósitos, como la producción del LPS, la síntesis del glicógeno, o la síntesis del EPS de distintos tipos, reprimiendo o activando los diferentes operones, de acuerdo con las señales ambientales o sus necesidades fisiológicas.

En bacterias donde se ha descrito la producción de diferentes tipos de EPS, tales como *Ralstonia solanacearum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, etc., los genes que codifican para las proteínas encargadas de su síntesis están organizados en operones distintos, y los mecanismos de regulación de la expresión de estos operones son diferentes (Garg *et al.*, 2000, Kaufusi *et al.*, 2004, Hoang *et al.*, 2004). Esto permitiría a estas bacterias adaptarse a diferentes nichos ecológicos (Lauriano *et al.*, 2004).

En forma análoga, se podría pensar que en *A. ferrooxidans*, la presencia de varias copias de los genes involucrados en la producción de EPS podría permitir regular diferencialmente la expresión de los mismos dependiendo de la naturaleza del sustrato presente. Esto explicaría lo descrito por Gehrke *et al.* (1998) quienes encontraron que la composición del EPS producido por *A. ferrooxidans* cepa R1 cambia dependiendo del sustrato energético usado por la bacteria para su crecimiento

Otro aspecto que vale la pena destacar con respecto a la organización del posible operón involucrado en la síntesis de EPS de *A. ferrooxidans*, es la presencia de genes de función desconocida en el mismo, ya que por su contexto genético se podría predecir una posible función en la síntesis de EPS. Adicionalmente, debido a que no existen ortólogos de estos genes en otras bacterias, se podría especular que la función de éstos es específica de *A. ferrooxidans*. El estudio del papel que cumplen estos genes en la síntesis de EPS en *A. ferrooxidans* podría ayudar a entender mejor cómo ocurre la interacción de la bacteria con el sustrato.

En el genoma de *A. ferrooxidans* no se encontró un ortólogo para el gen *wzy*, el cual codifica para la enzima encargada de la polimerización del EPS en otros organismos. Una de las proteínas de función desconocida localizada en el "cluster" de los genes de producción de EPS posee una baja similitud con las Wzy descritas. Dado su contexto genético, podría ser un buen candidato para cumplir esta función, predicción que debe ser validada experimentalmente.

El hecho que exista una organización similar de los genes encargados de la síntesis de EPS con lo descrito en otras bacterias, podría significar que exista una regulación similar a la descrita para organismos productores de EPS, aunque se sabe que

no hay un mecanismo universal. En las bacterias patógenas como *V. cholerae* la regulación de los genes involucrados en la síntesis de EPS ocurre a través de múltiples cascadas de señalización en las que están involucradas moléculas dependientes del sistema de “quorum sensing”, donde son varios los factores que tienen efecto en la producción del EPS (Lauriano *et al.*, 2004). Lo mismo ocurre en el caso de *Ralstonia solanacearum*, donde la regulación de los genes de producción de EPS está controlada por al menos siete proteínas reguladoras pertenecientes a tres cascadas de transducción de señales convergentes, que responden a condiciones ambientales (Garg *et al.*, 2000). En estos sistemas la regulación de la síntesis de EPS es compleja y el mecanismo aún no está claro. Mientras que en otras bacterias como *S. meliloti* el mecanismo de regulación para la producción de EPS está definido: la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de EPS depende de la presencia del regulador ExpR, un homólogo a LuxR (Hoang *et al.*, 2004).

Como se dijo anteriormente, *A. ferrooxidans* posee los genes necesarios para generar las proteínas y las moléculas involucradas en el mecanismo de “quorum sensing”. Sería interesante determinar si los genes de producción de EPS y de sus precursores están regulados por este sistema y qué otros factores afectan la expresión de los mismos. Adicionalmente sería importante determinar si los diferentes operones identificados en el genoma de *A. ferrooxidans* que podrían estar involucrados en la vía de síntesis de EPS, están regulados de la misma manera o usan diferentes sistemas de regulación.

4.3 Expresión diferencial de los genes involucrados en la síntesis de los precursores de EPS en diferentes condiciones de crecimiento

En el trabajo realizado por Sand y Gehrke (1999), se evaluó el efecto de la fuente de energía usada para el crecimiento de *A. ferrooxidans* con respecto a la cantidad de EPS producido. Se encontró que las células que crecen en un sustrato disuelto como FeSO_4 , producen una menor cantidad de EPS con respecto a las células que crecen en sustrato sólido, como piritita y azufre elemental. Si la función de la vía de Leloir en *A. ferrooxidans* es generar los intermediarios para la síntesis de EPS, cuando la bacteria crece en azufre, se esperaría un mayor nivel de transcripción de sus genes debido a su mayor producción de EPS. Sin embargo, los genes del operón galactosa y del operón involucrado en la síntesis del anclador lipídico, se transcriben en un mayor nivel cuando se usa como fuente de energía FeSO_4 comparado con lo observado en azufre. Estos resultados se pueden explicar si tenemos en cuenta que la UDP-glucosa y UDP galactosa, intermediarios de síntesis de la vía de Leloir, no son moléculas específicas para la síntesis de EPS, si no que también se utilizan para la biosíntesis de otras estructuras como membrana plasmática, LPS, etc. Lo mismo ocurre con el anclador lipídico, que es necesario para la síntesis de todos los polisacáridos celulares, por lo cual los genes que codifican para las proteínas encargadas de su síntesis tampoco son específicos de la síntesis de EPS, explicando así su mayor expresión cuando la bacteria crece en FeSO_4 .

Adicionalmente la presencia inusual en el operón galactosa de *A. ferrooxidans* de genes que permiten la conexión de las vías biosintéticas con la glicólisis y la fijación

de CO₂, como son *pgm* y *luxA*, podría también explicar la mayor expresión de este operón cuando la bacteria crece en un sustrato como FeSO₄.

Es consistente con este resultado el hecho que el gen de la galactosa permeasa, *galP*, también se transcribe en un mayor nivel en FeSO₄ comparado con el nivel de transcripción de este gen en azufre, lo que daría cuenta de una mayor actividad de la vía de Leloir en FeSO₄.

Es interesante analizar el caso del gen *galE*, que presenta dos copias en el genoma de *A. ferrooxidans*, *galE-1* (operón galactosa) presenta mayor transcripción en cultivos de la bacteria en FeSO₄ y *galE-2* (locus EPS) con mayor transcripción en cultivos de la bacteria en azufre. El gen *galE-2* está ubicado en el locus genético donde se encuentran todos los genes específicos de la vía de síntesis de EPS, por tanto, teniendo en cuenta que en un sustrato sólido como el azufre elemental hay mayor producción de EPS, es esperable que todos los genes de la vía estén inducidos en esta condición. Es importante destacar que esta segunda copia del gen *galE-2* le permitiría a la bacteria asegurar la disponibilidad de los precursores UDP-glucosa y UDP-galactosa en una condición donde los genes de la vía de Leloir, que es la vía encargada de generar estas moléculas, están expresándose a más bajos niveles comparado con los niveles en FeSO₄. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de que los diferentes operones involucrados en la síntesis de EPS poseen sistemas de regulación distintos.

La otra explicación tiene que ver con los cambios de composición del EPS con respecto al sustrato usado por la bacteria. Se vió que la composición del EPS producido en FeSO₄ es prácticamente igual al EPS producido cuando la bacteria crece en pirita. Sin embargo, cuando la bacteria crece usando azufre elemental como fuente de energía, la

composición del EPS cambia considerablemente (Gehrke *et al.*, 1998, Sand y Gehrke, 1999). Se podría especular, teniendo en cuenta el hecho que en *A. ferrooxidans* existen varios operones o locus involucrados en la producción de EPS, que unos se expresen en mayor nivel cuando la bacteria crece en pirita o FeSO_4 y otros cuando la bacteria crece en azufre, como sería el caso del locus donde está el gen *galE-2*.

Los niveles de expresión de los otros genes de *A. ferrooxidans* ATCC23270 que pertenecen al locus involucrado en la síntesis del EPS, como los genes que codifican para las glicosiltransferasas y las proteínas encargadas del transporte y la polimerización del EPS, se determinó a través de microarreglos (datos no mostrados). Se observó que este grupo de genes presentaba una mayor expresión cuando la bacteria era crecida en azufre elemental comparado con la expresión observada cuando la bacteria crece en FeSO_4 . Este resultado es consistente con los niveles expresión observados para el gen *galE-2*, también perteneciente a este locus.

4.4 Efecto de la galactosa en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los precursores de EPS en *A. ferrooxidans*

La expresión de los genes involucrados en la producción de precursores de EPS se vió afectada por la presencia de galactosa en el medio. Los genes del operón galactosa y el gen *galP* aumentan los niveles de transcripción en presencia de galactosa, al igual que el operón involucrado en la síntesis de undecaprenil fosfato. La mayor transcripción de los genes del operón galactosa favorecería la generación de UDP-gal y UDP-glu, estando éstos más disponibles para ser utilizados en las diferentes rutas biosintéticas, como la producción de LPS, EPS y polisacáridos estructurales. Este efecto estaría

correlacionado con el aumento en la transcripción del operón de síntesis de undecaprenil fosfato, donde el efecto de la galactosa podría ser indirecto.

Se observó que el gen *galU*, que hace parte de la vía de Leloir, disminuye la expresión en presencia de galactosa. Una explicación probable puede ser que al disminuir la expresión de este gen se favorece el flujo de la vía metabólica hacia la producción de UDP-glucosa y la UDP-galactosa, evitando así que se genere la glucosa 1-fosfato, compuesto que comunica la vía de Leloir con otras rutas metabólicas.

El gen *galE-2*, también disminuye su expresión en presencia de galactosa. Es coincidente el hecho de que los genes que se expresan preferencialmente en FeSO_4 , son los genes que aumentan su expresión en presencia de galactosa. Mientras que los genes que se expresan principalmente en azufre disminuyen su expresión en presencia de galactosa. Esto concuerda con la teoría de que la síntesis de EPS en *A. ferrooxidans* está regulada por el sustrato presente en el medio de cultivo. Debido a que en el genoma de *A. ferrooxidans* existen varias copias de los genes involucrados en la síntesis de EPS organizados en diferentes operones, la expresión diferencial de los mismos depende del sustrato en el que se crece la bacteria.

4.5 Efecto de la galactosa en la producción y composición del EPS sintetizado por *A. ferrooxidans*

Al purificar el EPS producido por la bacteria en diferentes condiciones de crecimiento, podemos observar que la cantidad de EPS producido en medio líquido es 5 veces menor que la producida en medio sólido, lo que coincide con lo descrito por

Gehrke *et al.* (1998). Esto podría deberse a la necesidad que tiene la bacteria de adherirse al sustrato, proceso donde el EPS es indispensable.

Se puede observar que cuando la bacteria crece adherida a pirita, la cantidad de EPS producido es mayor que el producido por células planctónicas. Además, cuando la bacteria está en presencia de galactosa, la cantidad de EPS aumenta considerablemente tanto en células adheridas como en células planctónicas. Esto concuerda con el aumento observado en los niveles de transcripción de los genes involucrados en la producción de EPS, en presencia de galactosa y crecidas en FeSO_4 .

Con respecto a la influencia de la galactosa en la composición del EPS, se puede observar que en general la naturaleza de los azúcares que componen los EPS no se ve influenciada por la presencia de galactosa en el medio, exceptuando el caso de la xilosa, que desaparece del EPS producido en presencia de galactosa. Adicionalmente, en esta misma condición se observa un leve aumento en la proporción de glucosa. Coincidentemente los genes de la vía de Leloir se expresan en mayor nivel en presencia de galactosa, por lo que se estaría favoreciendo la síntesis de intermediarios de esta vía, como la UDP-Glucosa, disminuyendo el flujo hacia otros intermediarios de síntesis de EPS como podría ser el caso de la xilosa. Según lo descrito por Sand y Gehrke (1999) y Rohwerder *et al.* (2003), *A. ferrooxidans* se adapta al sustrato cambiando la composición de su EPS de acuerdo a la hidrofobicidad del sustrato y al mecanismo de degradación de éste. La presencia de la galactosa en el medio no tiene efecto sobre las propiedades químicas del sustrato que está usando la bacteria como fuente de energía, por lo tanto no se espera que la composición del EPS cambie, ya que debe mantener sus propiedades fisicoquímicas para interactuar con el sustrato.

El aumento observado en la producción de EPS en presencia de galactosa está relacionado con el aumento en los niveles de transcripción de genes involucrados en la síntesis de galactósidos y del anclador lipídico en esta misma condición. Los mayores niveles de transcripción de estos genes aumentan la disponibilidad de los precursores para la síntesis del EPS, lo que estaría determinando el aumento de su producción.

El efecto del aumento de la disponibilidad de precursores de EPS en la cantidad de EPS producido es un fenómeno ampliamente investigado en bacterias ácido-lácticas. En *Lactococcus lactis* se observó que al crecer la bacteria usando fructosa como fuente de carbono, se producía menor cantidad de EPS que cuando se usaba glucosa. En esta bacteria se comprobó que el azúcar no tenía un efecto directo sobre la regulación del promotor de los genes específicos para la síntesis de EPS, si no que su efecto era en la síntesis de los precursores de EPS. Los niveles de los precursores sintetizados eran menores cuando la bacteria crecía en fructosa con respecto al cultivo con glucosa (Looijesteijn *et al.*, 1999). En trabajos realizados con *Streptococcus thermophilus* LY03 se ha comprobado que la sobreexpresión de genes como *galE*, *galU* y *pgm* provoca un aumento en la síntesis de galactósidos, lo que provoca un aumento en la cantidad de EPS sintetizado. (Degeest y Vuyst, 2000, Levander *et al.*, 2002).

4.6 Unión y formación de biopelículas sobre el sustrato

Se observó que cuando *A. ferrooxidans* ha sido precultivado en presencia de galactosa, la velocidad de unión de la bacteria a la pirita aumenta 6 veces. Este resultado nos sugiere que habría una adaptación de la bacteria a las condiciones del medio, y por

tanto un cambio en las propiedades de unión de la bacteria al sustrato por efecto de la galactosa.

Como vimos en los resultados anteriores este efecto se ve reflejado en el aumento de la producción del EPS. Ha sido bien caracterizado el hecho que dentro de los factores que afectan la velocidad y la extensión de la unión de una bacteria a una superficie, están la hidrofobicidad de la superficie celular y la producción de EPS. Si hay mayor producción de EPS se está favoreciendo la velocidad de unión de la bacteria a la superficie, y se espera una mayor cobertura de la misma en menor tiempo (Donlan, 2002).

En *A. ferrooxidans* vimos que la presencia de galactosa en el medio de cultivo aumenta la producción de EPS y la velocidad de unión de la bacteria al sustrato sólido. Podría por tanto esperarse que la velocidad de formación de biopelículas también se vea afectada. Esto fue comprobado al observar las biopelículas obtenidas a las 24 y 48 h de cultivo en pirita, donde se observa que en presencia de galactosa hay una mayor colonización de la superficie de la pirita y alta producción de EPS. La producción de EPS también es esencial en el proceso de maduración de la biopelícula, ya que favorece la generación de las microcolonias, que es como se organizan las células dentro de la biopelícula, y cuya estructura está dada por la presencia de gran cantidad de EPS (Donlan, 2002; Parsek y Fuqua, 2004).

Aunque se observó que la galactosa no inhibió el crecimiento de *A. ferrooxidans*, es sorprendente el hecho que este azúcar tenga efecto en la producción de EPS, en la unión de la bacteria al sustrato y en la formación de biopelículas de la bacteria sobre el mismo. Sabemos que *A. ferrooxidans* en presencia de un sustrato sólido forma

biopelículas sobre éste, con el fin de poderlo atacar. En una biopelícula la bacteria está en contacto con diferentes sustancias orgánicas producto de la muerte celular que se produce al interior de las microcolonias, de la secreción de sustancias por células que hacen parte de la biopelícula y por la degradación de polisacáridos liberados. Teniendo en cuenta estos antecedentes, *A. ferrooxidans* estaría en contacto con galactosa dentro de una biopelícula, y es allí donde se produciría el efecto de la galactosa sobre el metabolismo de la bacteria, lo que estaría favoreciendo la colonización del sustrato, por la presencia del azúcar. La pregunta es si este efecto observado en el laboratorio pudiese llegar a ser importante en la formación de biopelículas en un ambiente natural. Además es interesante saber si estas propiedades observadas pueden ser explotadas en el ámbito industrial; para ello es necesario estudiar si la mayor formación de biopelículas tiene un efecto directo en la actividad biolixiviante de la bacteria.

Es posible que la galactosa también tenga un efecto en la actividad de oxidación de la pirita por *A. ferrooxidans*, como consecuencia del aumento que produce en la producción del EPS y en la capacidad de colonización de la pirita por la bacteria. Esto porque como fue descrito por Rohwerder *et al.* (2003), la presencia de EPS permite a la bacteria mantener en contacto el agente oxidante (iones ferrico), con el sustrato. Esto podría llegar a tener importantes aplicaciones en la industria biominera.

4.7 Modelo para la síntesis del EPS en *A. ferrooxidans*

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten plantear no sólo las vías metabólicas que estaría usando *A. ferrooxidans* para la producción de los UDP-azúcares

y de los EPS, si no que también la regulación de la expresión de los genes involucrados en ellas, en los diferentes sustratos usados para el crecimiento de la bacteria (Figura 25).

Es necesario destacar la importancia que tiene el efecto observado en la expresión de los genes de producción de galactósidos y de undecaprenil fosfato durante el crecimiento de la bacteria en presencia de galactosa. Según los resultados obtenidos, este efecto tendría como resultado un aumento de la disponibilidad de los precursores de EPS, que al igual a lo que ocurre en bacteria ácido-lácticas y *E. coli*, tiene como resultado el aumento de la cantidad de EPS sintetizado. Este aumento afecta la velocidad de unión de la bacteria al sustrato, y por tanto favorece la formación de biopelícula.

El conocer los mecanismos por los cuales se regula la expresión de los operones de producción del EPS y de la vía de Leloir permitiría en el futuro controlar la producción de EPS por *A. ferrooxidans* y así regular indirectamente su actividad biolixivante.

5. CONCLUSIONES

1. Mediante análisis bioinformático se determinó que *A. ferrooxidans* ATCC 23270 posee todos los genes necesarios para la síntesis de EPS.
2. Los genes *luxA*, *galE*, *galK*, *pgm* y *galM* están formando parte del operón galactosa en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.
3. Las enzimas de la vía de Leloir, galactosa 1-fosfato- uridil transferasa (GalT), UDP galactosa 4 epimerasa (GalE), UDP glucosa pirofosforilasa (GalU) y fosfoglucomutasa (PGM) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 son funcionales en *E. coli*.
4. Se identificaron dos operones contiguos involucrados en la síntesis de polisacáridos. El primer operón incluye los genes *cdsA*, *uppS*, *pirH* y *dxr*, involucrados en la síntesis del anclador lipídico. Los genes del segundo operón, *lpxD*, *fabA*, *lpxA*, *gnaA*, *gnaB* y *lpxB*, están involucrados en la síntesis del lípido A, componente estructural de los LPS.
5. Los genes pertenecientes al operón galactosa, al operón de síntesis del anclador lipídico y el gen *galE-2*, perteneciente al locus de EPS, se expresan diferencialmente en las dos condiciones de cultivo ensayadas (FeSO_4 ó azufre elemental como fuente de energía). Los operones involucrados en la síntesis de los precursores se expresan preferencialmente cuando la bacteria crece en FeSO_4 . En cambio el gen *galE-2*,

perteneciente al locus de genes de síntesis de EPS, se expresa preferencialmente cuando la bacteria crece usando azufre elemental como fuente de energía.

6. La presencia de galactosa en el medio de cultivo aumenta la producción de EPS en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, como consecuencia del aumento de la expresión de los genes de la vía de Leloir y de la síntesis de precursores como el undecaprenil fosfato.

7. La velocidad de unión de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a la pirita es mayor en presencia de galactosa, efecto que se refleja en el aumento de la velocidad de formación de biopelículas de *A. ferrooxidans*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C., J. Fornwald, F. Schimdt, M. Rosenberg, and M. Brawner. 1988. Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans gal* operon. *J. Bacteriol.* **170**: 203-212.
- Bacelar-Nicolau P., and B. Jhonson. 1999. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:585-590.
- Barreto, M., E. Jedleki, and D.S. Holmes. 2005. Organization, Expression and Activity of a Gene Cluster for the Formation of EPS Precursors in the Chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 2902-2909.
- Barreto, M., R. Quatrini, S. Bueno, C. Arriagada, J. Valdés, S. Silver, E. Jedlicki, and D. S. Holmes. 2003. Aspects of the Predicted Physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Deduced from an Analysis of its Partial Genome Sequence. *Hydrometallurgy.* **71**: 97-105.
- Bettenbrock, K., and C. Alpert. 1998. The *gal* genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2013-2019.
- Boels, I., M. Kleerebezem, and W. De Vos. 2003. Engineering of carbon distribution between glycolysis and sugar nucleotide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1129-1135.
- Boels, I., A. Ramos, M. Kleerebezem, and W. De Vos. 2001. Functional analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3033-3040
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Broadbent, J. R., D. McMahon, D. L. Welker, C. J. Ober, and S. Moineau. 2003. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Dairy Sci.* **86**:407-423.
- Caroff, M., and D. Karibian. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* **338**:2431-2447.
- Chatterje, S., Y.N. Zhou, S. Roy, and S. Adhya. 1997. Interaction of Gal repressor with inducer and operator: induction of Gal transcription from repressor-bound DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:2957-2962.
- Coutinho, P., E. Deleury, G. Davies, and B. Henrissat. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**: 307-317.
- Coto, O., Y. Gómez, P. Varela, J. Falcon, J. Reyes, and C. A. Jerez. 1999. The use of immunoelectron microscopy to analyze surface components of *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. pg. 59-67. *In* R. Amils and A. Ballester

- (ed.), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century. Madrid, Spain.
- Czyz, A., B. Wróbel, and G. Wegrzyn.** 2000. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. *Microbiol.* **146**:283-288.
- Degeest, B., and L. Vuyst.** 2000. Correlation of activities of the enzymes α -Phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3519-3527.
- Donlan, R.** 2002. Biofilms : Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.
- Elbehti, A., G. Brasseur, and Lemesle-Meunier.** 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the *bc₁* and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **182**: 3602-3606.
- Friedman, L. and R. Kolter.** 2004. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**: 4457-4465.
- Garg, R., J. Huang, W. Yindeeyoungyeon, T. P. Denny, and M. Schell.** 2000. Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* **182**:6659-6666.
- Gehrke, T., J. Telegdi, D. Thierry, and W. Sand.** 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2743-2747.
- Germond, J.E., M. Delley, N. D'Amico, and S. Vincent.** 2001. Heterologous expression and characterization of the exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *Eur. J. Biochem.* **268**:5149-5156.
- Glucksmann, A., L. Reuber, and G. Walker.** 1993. Genes needed for the modification, polymerization, export, and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: a model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**:7045-7055.
- Goodrich, J.A., and W. McClure.** 1992. Regulation of open complex formation at the *Escherichia coli* galactose operon promoters. *J. Mol. Biol.* **224**:15-29
- Guiliani, N., A. Bengrine, F. Borne, M. Chippaux, and V. Bonnefoy.** 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **143**:2179-2187.
- Guacucano, M., G. Levican, D. S. Holmes, and E. Jedlicki.** 2000. An RT-PCR artifact in the characterization of bacterial operons. *Elec. J. Biotech.* **3**:213-216.
- Hagen, F., and E. Young.** 1978. Effect of RNase III on efficiency of translation of bacteriophage T7 lysozyme mRNA. *J. Virol.* **29**:793-804.
- Hanson, R. and J.A. Phillips.** 1981. Chemical composition. pg. 328-364. *In* P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W.A. Wood, N. R. Krieg, and G. B. Phillips (ed.), *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for microbiology. Washington, D.C.
- Hennet, T.** 2002. The galactosyltransferase family. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:1081-1095.

- Hoang, H., A. Becker and J. González.** 2004. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* **186**:5460-5472.
- Holden, H., I. Rayment, and J. Thoden.** 2003. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 43885-43888.
- Holmes, D. S.** 1999. Biotechnology: Miners in miniature. *Chemistry and Industry*, **1**: 20-24.
- Horne, P. and P. Henderson.** 1983. The association of proton movement with galactose transport into subcellular membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **210**: 699-705.
- Irazabal, N., I. Marín, and R. Amils.** 1997. Genomic organization of the acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 21834. *J. Bacteriol.* **179**: 1946-1950.
- Kaufusi, P., S. Forsberg, P. Tittabutr, and D. Borthakur.** 2004. Regulation of exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium sp.* Strain TAL1145 involves an alternative sigma factor gene, *rpoH2*. *Microbiol.* **150**:3473-3482.
- Kranenburg, R., I. Swam, J. Marugg, M. Kleerebezem, and W. Vos.** 1999. Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: Functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J. Bacteriol.* **181**: 338-340.
- Krispin, O., and R. Allamansberger.** 1998. The *Bacillus subtilis galE* gene is essential in the presence of the glucose and galactose. *J. Bacteriol.* **180**: 2265-2270.
- Lauriano, C., C. Ghosh, N. Correa, and K. Klose.** 2004. The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **186**:4864-4874.
- Laws, A., Y. Gu, and V. Marshall.** 2001. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **18**:597-625.
- Levander, F. and P. Radström.** 2001. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose- and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2734-2738.
- Levander, F., M. Svensson, and P. Rådström.** 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:784-790.
- Levicán, G., P. Bruscella, M. Guacunano, C. Inostroza, V. Bonnefoy, D. S. Holmes, and E. Jedlicki.** 2002. Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **184**:1498-1501.
- Liu, H. L., B. Y. Chen, Y. W. Lan, and Y. C. Cheng.** 2003. SEM and AFM images of pyrite surfaces after bioleaching by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 414-420.
- Liu, Z., N. Guiliani, C. Apia-Ayme, F. Borne, J. Ratouchniak, and V. Bonnefoy.** 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 2269-2276
- Looijesteijn, P., I. Boels, M. Kleerebezem, and M. Hugenholtz.** 1999. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis subs. cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5003-5008.

- Marchand, E. and J. Silverstein.** 2002. Influence of heterotrophic microbial growth on biological oxidation of pyrite. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5483-5490
- Marchler-Bauer A., J. B. Anderson, C. De Weese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, and C.J. Lanczycki,** 2003. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* **31**:383-387.
- Martín, G., K. Seamon, F. Brown, M. Shanahan, P. Roberts, and P. Henderson.** 1994. Forskolin specifically inhibits the bacterial galactose transport protein, GalP. *J. Biol. Chem.* **269**: 24870-24877.
- McDonald, T., and J.F. Henderson.** 2001. Cysteine residues in the D-galactose-H⁺ symport protein of *Escherichia coli*: effects of mutagenesis on transport, reaction with N-ethylmaleimide. *Biochem. J.* **353**: 709-717.
- McDonald, T., A. Walmsley, and P. Henderson.** 1997. Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H⁺ symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* **272**: 15189-15199.
- Miller, J. H.** 1978. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Moller, T., T. Franch, C. Udesen, K. Gerdes, and P. Valentin-Hansen.** 2002. Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the *E. coli* galactose operon. *Genes and Dev.* **16**:1696-1706.
- Mollet, B., and N. Pilloud.** 1991. Galactose utilization in *Lactobacillus helveticus*: Isolation and characterization of the galactokinase (*galK*) and galactose-1-phosphate uridyl transferase (*galT*) genes. *J. Bacteriol.* **173**:4464-4473.
- Mollerach, M., R. Lopez, and E. Garcia.** 1998. Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J. Exp. Med.* **188**:2047-2056.
- Moreira, L., P. Videira, S. Sousa, J. Leitao, M. Cunha, and I. Sá-Correia.** 2003. Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**:323-333.
- Nesper, J., C. Lauriano, K. Klose, D. Kapfhammer, A. Kraib.** 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 E1 TOR *galU* and *galE* mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**: 435-445.
- Parsek, M. and C. Fuqua.** 2004. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* **186**: 4427-4440.
- Pellock, B., M. Teplitski, R. Boinay, D. Bauer, and G. Walker.** 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**:5067-5076.
- Peng, H-L., T-F. Fu, S-F. Liu, and H-Y. Chang.** 1992. Cloning and expression of the *Klebsiella pneumoniae* galactose operon. *J. Biochem.* **112**:604-608.
- Purwantini, E., and L. Daniels.** 1998. Molecular analysis of the gene encoding F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **180**:2212-2219.

- Purwantini, E., T. Gillis, and L. Daniels.** 1997. Presence of F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Mycobacterium* and *Nocardia* species, but absence from *Streptomyces* and *Corynebacterium* species and methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**:129-134.
- Ramirez, P., N. Guillian, L. Valenzuela, S. Beard and C. Jerez.** 2004. Differential protein expression during growth of *A. ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4491-4498.
- Ramos, A., I. Boels, W. de Vos, and H. Santos.** 2001. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:33-41.
- Rawlings, D., and T. Kusano.** 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**: 39-55.
- Rohwerder, T., T. Gehrke, K. Kinzler and W. Sand.** 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239-248.
- Saier, M.** 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* **35**: 699-710.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sand, W., T. Gehrke, P.-G. Jozsa, and A. Schippers.** 1999. Direct versus indirect bioleaching. pg.27-47. In R. Amils and A. Ballester (ed.), Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century. Madrid, Spain.
- Sand, W., T. Gehrke.** 1999. Analysis and function of the EPS from the strong acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. pg. 127-141. J. Wingender, T. R. Neu and H.-C. Fleming (ed.), Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function. Springer. Berlin, Germany.
- Schippers, A., and W. Sand.** 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds two indirect mechanism via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 319-321.
- Schrader, J., and D. Holmes.** 1988. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **170**:3915-3923.
- Schrenk, M.O., K.J. Edwards, R.M. Goodman, R.J. Hamers, and J.F. Banfield.** 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. *Science.* **279**:1519-1522.
- Sauer, K.** 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Gen. Biol.* **4**:219-233.
- Saxena, I., M. Brown, M. Fevre, R. Geremia, and B. Henrissat.** 1995. Multidomain architecture of β -glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J. Bacteriol.* **177**:1419-1424.
- Streit W.R., R. A. Schmitz, X. Perret, C. Staehelin, W. J. Deakin, C. Raasch, H. Liesegang, and W. J. Broughton.** 2004. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium sp.* strain NGR234. *J Bacteriol.* **186**:535-542.
- Sugio, T., S. Kudo, T. Tano, and K. Imai.** 1982. Glucose transport system in a facultative iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **150**:1109-

1114.

Szpilewska, H., A Czyz, and G. Wegrzyn. 2003. Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Curr. Microbiol.* **47**:379-382.

Tuttle, J., and P. Dugan. 1976. Inhibition of growth, iron, and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. *Can. J. Microbiol.* **22**:719-730.

Villancourt, K., S. Moineau, M. Frenette, C. Lessard, and C. Vadeboncoeur. 2002. Galactose and lactose genes from the galactose-positive bacterium *Streptococcus salivarius* and the phylogenetically related galactose-negative bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization, sequence, transcription, and activity of the gal gene products. *J. Bacteriol.* **184**:785-793.

Webb, J., L. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov, and S. Kjelleberg 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **185**: 4585-4592.

Weickert, M., and S. Adhya. 1993. The galactose regulon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**: 245-251.

Whitfield, C., and A. Paiment. 2003. Biosynthesis and assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr. Res.* **338**:2491-2502.

Yates, J. R., and D. S. Holmes. 1986. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **169**: 1861-1870.

Yeh, T., J. Godshalk, G. Olson, and R. Kelly. 1986. Use of epifluorescence microscopy for characterizing the activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:138-146.

Yoshida, T., Y. Ayabe, M. Yasunaga, Y. Usami, H. Habe, H. Nojiri, and T. Omori. 2003. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylotroph *Methylobacillus sp.* strain 12S. *Microbiol.* **149**:431-444.

A. ferrooxidans
 B. cepacia
 P. aeruginosa
 S. flexneri

ESGEGKNLAERGLHLLVAVMTPTITGIALLPFLTYWISPAFSTRHGSMVGMILLAGFWV 353
 GRDHADTLARQSLERFLNGVFTPGVIVAFALAPFLTLLWVGPDAAHSAPVGRVLLVISVWL 349
 SFAEALCEFNKWLRLVLLIMGGMLCLAFLLPFILKLWVGDIIGDDSI SVGRILCLGVFF 351
 DFKAFKRNVNKSLLLMFLICLPVIIIGLLYSGLVVKIWFGENYQINSFNILNVLIGFFF 343
 .: : . * *.. . : :* .: