

UCH-FC  
DOC - Microbiología  
R. 234  
C. 2

**PAPEL DEL QUORUM SENSING Y DE LA VÍA C-DI-GMP EN LA REGULACIÓN  
DEL DESARROLLO DE BIOPELÍCULA EN *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS***

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al Grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Lina María Ruiz Hincapié

Abril del 2010

Director de Tesis: Dr. Nicolas Simon Guiliani Guerin

Co-director: Dr. Carlos Antonio Jerez Guevara

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile



## INFORME DE APROBACIÓN

### TESIS DE DOCTORADO

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

**Lina María Ruiz Hincapié**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día martes 19 de Enero de 2010.

**Director de Tesis:**

**Dr. Nicolás Simon Guiliani Guerin**

**Co-Director de Tesis:**

**Dr. Carlos Antonio Jerez Guevara**

**Comisión Evaluadora de la Tesis**

**Dr. Víctor Hugo Cifuentes Guzmán  
(Presidente)**

**Dra. Margarita María Carú Marambio**

**Dr. Omar Orlando Orellana Orellana**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



*A William y Alejandro*



Nací el 10 de Septiembre de 1975 en Medellín – Colombia. Soy la hija mayor del matrimonio de mis padres: Carmen y Sergio. Carmen es una mujer con alma de artista, muy alegre, entusiasta y dedicada al hogar. Sergio es un hombre muy ingenioso, sincero, ecuánime, un luchador incansable por el bienestar de la familia. Tengo una hermana, Paula, la admiro mucho por su tenacidad, fortaleza, rectitud. Actualmente, Paula esta realizando el doctorado en Inglaterra. Mi Padre siempre inculco en nosotras la importancia de la educación y siempre velo para que pudiésemos acceder a estudios universitarios.

Mi interés por la investigación nació en 1992, cuando visite el Departamento de Biología de la Universidad de Antioquia. Gracias a la motivación de mi Padre, en 1993 decidí matricularme en el pregrado de Biología en la Universidad de Antioquia, termine en 1999. Del 2000 al 2004 me desempeñe como investigadora en la Corporación para Investigaciones Biológicas de Medellín. Del 2001 al 2003 realicé la Maestría en Biología en la Universidad de Antioquia.

Llegue a Santiago de Chile en Marzo de 2004 a cursar estudios doctorales en la Universidad de Chile, becada por el DAAD. El quinto año del doctorado fui becaria de CONICYT. La dedicación a mis estudios doctorales ha sido muy gratificante a nivel personal y profesional.

Mi estadía en Chile también ha servido para desarrollarme a nivel personal, hacer grandes amigos. Forme una hermosa familia junto a William, un gran hombre de nacionalidad peruana. También, vino a Chile becado por el DAAD a realizar sus estudios doctorales. Actualmente, es Profesor del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Andrés Bello. Tenemos un hermoso hijo de nacionalidad chilena. Alejandro, nació el 02 de marzo del 2009 en Santiago.

Siento mucha gratitud y cariño por este país que me ha brindado tanto.

Mis intenciones son continuar el compromiso con la ciencia.



## AGRADECIMIENTOS

A la beca doctoral del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) que me permitió venir a Chile y me financió durante los primeros 4 años del doctorado (2004-2008), así como el financiamiento de mi estadía en la “Universitat Duisburg – Essen” y a la beca doctoral de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), que me financió durante el quinto año del doctorado (2008-2009). A los proyectos FONDECYT 1040676 y 1080441, que financiaron las investigaciones.

Al Profesor Dr. Nicolas Guiliani, por permitirme estudiar en su laboratorio, por sus valiosas sugerencias y constante apoyo durante el doctorado.

Al Profesor Dr. Carlos Jerez por sus valiosos comentarios a lo largo del doctorado, por permitirme usar los equipos de su laboratorio.

A todos los Profesores del Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. En especial a los Profesores de la Comisión Evaluadora de la Tesis, por sus valiosas críticas y sugerencias.

Al Departamento de Biología y a la Escuela de Postgrado, en especial a Marisol Maira por su apoyo y consejo durante todos estos años.

A todos los miembros presentes y ausentes del Laboratorio de Comunicación Bacteriana y del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, por sus valiosos aportes a lo largo del doctorado. Alex González, por su compañerismo y discusiones científicas; Susana Valenzuela y Carolina Farah, por introducirme en el mundo de la biología molecular; Claudio Navarro, por sus valiosas sugerencias durante la etapa de clonación de genes; Mauricio Acosta, Simón Beard, y Alvaro Banderas, por introducirme en el arte de la bioinformática. Andrés Villa, por su alegría, por las remembranzas de la Patria y del Alma máter; Matías Castro, por irradiar energía, porque su trabajo de tesis ha fortalecido la importancia de la línea de investigación que se inició con esta tesis; Valentina Abarca, Sigde Mamani, Mauricio Díaz, Javiera por matizar el periodo de escritura de esta tesis. A Don Juan Araos y Oscar Arriagada por su ayuda técnica.

Al Profesor Dr. Wolfgang Sand por recibirme en su laboratorio en el “Biofilm Centre Aquatische Biotechnologie” en la “Universitat Duisburg – Essen”, Alemania. A todos los integrantes del centro en particular al Dr. Thore Rohwerder y Mariel Grooters, por su amistad y ayuda desinteresada.

A los Profesores Dr. Nicolas Amiot y Dr. Urs Jenal, Biozentrum, Universidad de Basel, Suiza, por su amable donación del c-di-GMP sintetizado químicamente y la cepa BL21(DE3) sobreexpresando la DGC PleD de *Caulobacter crescentus*, usados en la tesis.



Al Dr. Andrés Barriga del CEPEDQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, por introducirme en el análisis de moléculas mediante técnicas cromatográficas y espectrometría de masas.

A mis amigos y compañeros de cursos; Erika Harth, Julieta Orlando, Merly de Armas, Claudio Navarro, Carla Lozano, Jenny Alcaíno, Alvaro Orell, quienes armonizaron largas jornadas de trabajo y estudio.

A mi familia que en la distancia continuaron con su motivación y apoyo incondicional. A mi madre que trajo a Santiago el calor de hogar durante varias navidades, por acompañarme durante el nacimiento de mi hijo y momentos más críticos de su primer año de vida, por enseñarme a valorar las cosas más sencillas de la vida. A mi padre por sus consejos y palabras de aliento, por compartir con alegría mi nueva vida. A mi hermana por su inmensa generosidad, por su alegría que me ilumino durante los momentos de incertidumbre.

A mi amigo y compañero William Tiznado que día a día es una fuente de inspiración y motivación. Por su respaldo incondicional durante el doctorado, por sus consejos y apoyo en cada momento que los necesite. Por darme la fortaleza para llegar al final de este largo camino.

A mi hijo Alejandro, por la alegría que trajo a mi vida. Por darme la claridad para terminar esta etapa y ser la fuerza motora para emprender nuevamente el camino.



## ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de tablas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xvii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biopelículas.....	1
1.2 “Quorum sensing”.....	3
1.2.1 Generalidades.....	3
1.2.2 QS de tipo AI-1.....	4
1.3 Vía del c-di-GMP.....	6
1.3.1 Mecanismos de Transducción de señales.....	6
1.3.2 Sistemas de mensajeros secundarios bacterianos.....	7
1.3.3 Bioquímica del mensajero secundario c-di-GMP.....	8
1.3.4 Organización estructural y funcional de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación del c-di-GMP.....	10
1.3.5 Distribución y abundancia de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP.....	11
1.3.6 Significancia de los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en la fisiología celular bacteriana.....	13
1.3.7 Modos de acción del c-di-GMP.....	15
1.3.8 Interconexión del sistema de QS y la vía c-di-GMP.....	16
1.4 Biominería: <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y Biopelícula.....	17
1.4.1 Generalidades.....	17
1.4.2 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> modelo de estudio en la biominería.....	18
1.4.3 Formación de biopelícula por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	19



1.4.4	Sistema de QS en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	20
1.5	Planteamiento del Problema.....	22
	Hipótesis.....	24
	Objetivo General.....	24
	Objetivos Específicos.....	24
<b>2.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>25</b>
2.1	Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	25
2.2	Herramientas bioinformáticas.....	25
2.3	Extracción de RNA y RT-PCR.....	26
2.4	PCR en tiempo real.....	28
2.5	Evaluación de la actividad fosfodiesterasa a partir de extractos totales de <i>A. ferrooxidans</i> .....	28
2.6	Clonamiento molecular de las proteínas putativas de <i>A. ferrooxidans</i> implicadas en el metabolismo de c-di-GMP.....	29
2.7	Evaluación de la unión de Rojo de Congo a las diferentes cepas de <i>E. coli</i> BL21(DE3) y TOP10 que expresaban los genes que codifican para DGC/PDE.....	31
2.8	Purificación del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	32
2.9	Espectrometría de masas.....	33
2.9.1	Obtención de espectros.....	35
2.9.2	Análisis de espectros.....	36
2.10	Ensayo de unión de células de <i>A. ferrooxidans</i> a pirita.....	37
2.11	Análisis de la biopelícula de <i>A. ferrooxidans</i> sobre pirita.....	39
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>41</b>
3.1	Vía de señalización mediante el mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP) en la bacteria extremófila <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	41
3.1.1	Identificación y caracterización <i>in silico</i> de los componentes moleculares de la vía c-di-GMP.....	42
3.1.2	Análisis de la transcripción de los ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	48





3.1.3	Análisis del efecto de la carencia de fosfato sobre la transcripción de los <i>orfs</i> que codifican para probables DGC y PDE en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270....	50
3.1.4	Caracterización de la presencia del mensajero secundario c-di-GMP en la bacteria extremófila <i>A. ferrooxidans</i> .....	52
3.1.5	Caracterización de la presencia de una actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	56
3.1.6	Estudios funcionales de las proteínas con dominios GGDEF-EAL sobreexpresadas en <i>E. coli</i> .....	58
3.1.7	Análisis del posible papel de la vía c-di-GMP en la regulación de la formación de biopelícula en <i>A. ferrooxidans</i> .....	67
3.2	Análisis del efecto de AHL y análogos de AHL en la formación de biopelícula sobre pirita.....	69
4.	<b>Discusión</b> .....	76
	Vía c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	76
	Funcionalidad de la vía c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	81
	Posible papel del sistema de QS de tipo AI-1 en el desarrollo de biopelícula en <i>A. ferrooxidans</i> .....	91
	Interconexión del sistema de QS y la vía c-di-GMP.....	94
5.	<b>Conclusiones</b> .....	97
6.	<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	98
7	<b>ANEXOS</b> .....	107
	<b>ANEXO 1.</b> Publicación: AHL communication is a widespread phenomenon in <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> species and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. Ruiz, L.M., S. Valenzuela, M. Castro, A. González, M. Frezza, L. Soulère, T. Rohwerder, Y. Queneau, A. Doutheau, W. Sand, C. Jerez, and N. Guilianì. <i>Hydrometallurgy</i> . 2008. 94:133-137.....	107
	<b>ANEXO 2.</b> Manuscrito: The extremophile bacterium <i>Acidithiobacillus</i>	



	<i>ferrooxidans</i> possesses a c-diGMP signaling pathway that could play a significant role in bioleaching process. Ruiz, L.M., Castro M., Barriga, A., Jerez C.A. and Guiliani, N. En preparación para someter a la revista "Applied and Environmental Microbiology".....	112
<b>ANEXO 3.</b>	Probables proteínas efectoras de la vía c-di-GMP en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	148
<b>ANEXO 4.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de células de <i>A. ferrooxidans</i> crecidas en sulfato de hierro.....	149
<b>ANEXO 5.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-21b:: <i>AFE0053</i> inducida con IPTG sobreexpresando la proteína AFE0053 con dominios GGDEF y EAL de <i>A. ferrooxidans</i> .....	150
<b>ANEXO 6.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-21b:: <i>AFE1360</i> inducida con IPTG sobreexpresando la proteína AFE1360 con dominios GGDEF y EAL de <i>A. ferrooxidans</i> .....	151
<b>ANEXO 7.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET-21b:: <i>AFE1373</i> inducida con IPTG sobreexpresando la proteína AFE1373 con dominios GGDEF y EAL de <i>A. ferrooxidans</i> .....	152
<b>ANEXO 8.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la <i>E. coli</i> TOP10 pBADTOPO:: <i>AFE1379</i> inducida con arabinosa sobreexpresando la proteína AFE1379 con dominios GGDEF y EAL de <i>A. ferrooxidans</i> .....	153
<b>ANEXO 9.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en un control (acetonitrilo 80% v/v y acetato de amonio 20 mM).....	154
<b>ANEXO 10.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada con el pET-21.....	155
<b>ANEXO 11.</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en <i>E. coli</i> TOP 10 transformada con el pBADTOPO.....	156



# LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Abundancia de las proteínas con dominios proteicos involucrados en la vía de señalización del c-di-GMP.....	12
<b>Tabla 2</b>	Partidores utilizados para los experimentos de RT-PCR.....	27
<b>Tabla 3</b>	Partidores utilizados para los experimentos de PCR en tiempo real.....	29
<b>Tabla 4</b>	Partidores utilizados para el clonamiento de los diferentes genes involucrados en el metabolismo del c-di-GMP.....	30
<b>Tabla 5</b>	Clonamiento de los genes que codifican para las probables DGCs y/o PDEs de <i>A. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i> .....	31
<b>Tabla 6</b>	Gradiente de metanol para la separación HPLC del c-di-GMP.....	34
<b>Tabla 7</b>	Parámetros para la adquisición de los espectrogramas para el análisis del c-di-GMP.....	35
<b>Tabla 8</b>	Marcos de lectura abiertos predichos que codifican posibles proteínas implicadas en la vía del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	44
<b>Tabla 9</b>	Análisis mediante qPCR de la transcripción de genes que codifican para DGC/PDE (AFE0053, AFE1360, AFE1373, AFE1379) y PDE HD (AFE2122, AFE2309, AFE2473) en condiciones limitantes de Pi.....	51
<b>Tabla 10</b>	Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa <i>E. coli</i> sobreexpresando proteínas con dominios GGDEF y EAL de <i>A. ferrooxidans</i> .....	66
<b>Tabla 11</b>	Análisis de los niveles del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> crecido con diferentes fuentes energéticas mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas.....	68
<b>Tabla 12</b>	Estudio del efecto de algunos análogos de AHLs sobre la adherencia de <i>A. ferrooxidans</i> a la pirita.....	73
<b>Tabla 13</b>	Vía del c-di-GMP en bacterias asociadas a procesos biolixiviantes.....	77



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Vía de señalización mediante el mensajero secundario c-di-GMP.....	9
<b>Figura 2</b>	Arquitectura de proteínas implicadas en la vía c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> .....	45
<b>Figura 3</b>	Alineamiento múltiple de las secuencias de las probables proteínas DGCs y PDEs de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	46
<b>Figura 4</b>	Contextos genéticos de los genes involucrados en la vía c-di-GMP de <i>A. ferrooxidans</i> .....	47
<b>Figura 5</b>	Análisis transcripcional de los <i>orfs</i> que codifican para proteínas involucradas en la vía c-di-GMP de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	49
<b>Figura 6</b>	Análisis mediante espectrometría de masas del c-di-GMP sintetizado químicamente.....	53
<b>Figura 7</b>	Análisis de la presencia del mensajero secundario celular c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecidas en tiosulfato.....	54
<b>Figura 8</b>	Análisis de los niveles del c-di-GMP durante la curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en tiosulfato mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas.....	55
<b>Figura 9</b>	Determinación de la presencia de una actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP en extractos proteicos totales de células de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 cosechadas en fase exponencial (exp) o en fase estacionaria (est). ....	57
<b>Figura 10</b>	Inducción de la expresión de las probables DGCs y/o PDEs de <i>A. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	59
<b>Figura 11</b>	Inducción de la expresión de las probables DGCs y/o PDEs de <i>A. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i> TOP10.....	60
<b>Figura 12</b>	Caracterización fenotípica de la expresión de los genes que codifican para probables DGC/PDE en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) crecida sobre placas de LB con Rojo de Congo.....	62
<b>Figura 13</b>	Cuantificación de la incorporación de Rojo de Congo por las diferentes cepas BL21 (DE3) que expresan los genes que codifican para probables DGC/PDE.....	63
<b>Figura 14</b>	Caracterización de la incorporación de Rojo de Congo en la cepa de <i>E. coli</i> TOP10 por las probables DGC/PDE de <i>A. ferrooxidans</i> clonadas en el vector pBADTOPO y expresadas bajo el control de arabinosa.....	64
<b>Figura 15</b>	Análisis de los niveles del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en perlas de azufre mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas.....	68
<b>Figura 16</b>	Estructuras moleculares de las moléculas de AHLs (A - H) y análogos de AHLs (I -L) usados en este trabajo.....	70
<b>Figura 17</b>	Estudios del efecto de una mezcla de AHLs y de un análogo de AHL sobre la adherencia de <i>A. ferrooxidans</i> a la pirita.....	72
<b>Figura 18</b>	Análisis del desarrollo de biopelícula en <i>A. ferrooxidans</i> mediante	

	microscopía de fuerza atómica (AFM) (D-F) acoplada a microscopía de epifluorescencia EFM (A-C).....	74
<b>Figura 19</b>	Análisis del efecto de una mezcla de AHL en el desarrollo de biopelícula en <i>A. ferrooxidans</i> mediante microscopía de epifluorescencia.....	75
<b>Figura 20</b>	Síntesis de los principales resultados relativos al papel fisiológico de la vía del c-di-GMP en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	90



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aa</b>	aminoácidos
<b>ACP</b>	proteína portadora de la cadena acilo
<b>AFE</b>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
<b>AFM</b>	microscopia de fuerza atómica
<b>AI</b>	autoinductor
<b>AI-1</b>	autoinductor de tipo 1
<b>AI-2</b>	autoinductor de tipo 2
<b>AHLs</b>	acil homoserina lactonas
<b>AMD</b>	Drenaje ácido de minas
<b>bis-<i>p</i>NPP</b>	bis( <i>p</i> -nitrofenil) fosfato
<b>cAMP</b>	adenilato cíclico
<b>cDNA</b>	Ácido desoxiribonucleico copia
<b>c-di-AMP</b>	diadenilato cíclico
<b>c-di-GMP</b>	diguanilato monofosfato cíclico
<b>CRP</b>	la proteína receptora de cAMP
<b>C12-AHL</b>	N-dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C14-AHL</b>	N-tetradecanoil-L-homoserina lactona
<b>DGC</b>	diguanilato ciclasa
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DUF1</b>	Domain of unknown function 1
<b>DUF2</b>	Domain of unknown function 2
<b>EPS</b>	exopolisacáridos
<b>EAL</b>	Glu-Ala-Leu
<b>EFM</b>	microscopia de epifluorescencia
<b>EIC</b>	cromatogramas de ion extraído
<b>ESI-IT</b>	electrospray-trampa iónica
<b>FeS<sub>2</sub></b>	Pirita
<b>GMP</b>	Guanosina monofosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GpGp</b>	GMP dimérico lineal(1-di-GMP)
<b>GGDEF</b>	Gly-Gly-Asp-Glu-Phe
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tio-galactósido
<b>LB</b>	medio Luria Bertani
<b>LDF</b>	"Linear discriminant function"
<b>mM</b>	mili Molar
<b>m/z</b>	masa/carga
<b>NADH</b>	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido
<b>OH</b>	hidroxi
<b>OH-C8-AHL</b>	N-3-hidroxi octanoil-L-homoserina lactona
<b>OH-C10-AHL</b>	N-3-hidroxi decanoil-L-homoserina lactona

<b>OH-C12-AHL</b>	N-3-hidroxidodecanoil-L-homoserina lactona
<b>OH-C14-AHL</b>	N-3-hidroxitetradecanoil -L-homoserina lactona
<b>OH-C16-AHL</b>	N-3-hidroxihexadecanoil-L-homoserina lactona
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>oxo</b>	ceto
<b>oxo-C12-AHL</b>	N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>oxo-C14-AHL</b>	N-3-oxo-tetradecanoil -L-homoserina lactona
<b>PAS</b>	Per- period circadian protein, Arnt- Ah receptor nuclear translocator protein, Sim- single-minded protein
<b>ppGpp(p)</b>	guanosina pentafofato y tetrafofato
<b>Pdar</b>	“pink dry and rough”
<b>PDE</b>	fosfodiesterasa
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno
<b>pI</b>	punto isoeléctrico
<b>Pi</b>	fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>pNP</b>	<i>p</i> -nitrophenol
<b>QS</b>	“quorum sensing”
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativo
<b>Rdar</b>	“red dry and rough”
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SAM</b>	<i>S</i> -adenosilmetionina
<b>SPEs</b>	sustancias poliméricas extracelulares
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>Tm</b>	temperatura de desnaturación
<b>TIC</b>	corriente total de iones
<b>TMHMM</b>	Transmembrana Modelo Oculto de Markov
<b>Vía del c-di-</b>	Vía de transducción de señales mediante el mensajero secundario c-di-
<b>GMP</b>	GMP

## RESUMEN

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica Gram-negativa acidófila de gran importancia en la biominería. Para la obtención de energía *A. ferrooxidans* oxida hierro ferroso o compuestos reducidos del azufre. Este metabolismo energético es responsable de la solubilización del mineral. La unión y adherencia de estas bacterias a superficies minerales y la subsiguiente formación de biopelícula son importantes para la disolución del mineral, tanto en ambientes naturales como en la operación industrial de la biolixiviación. Dicha unión se lleva a cabo a través de sustancias poliméricas extracelulares. Esta tesis aporta conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de biopelículas en *A. ferrooxidans*.

En primera instancia se presentan resultados relativos a la caracterización de la vía del mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP) en *A. ferrooxidans*. Una búsqueda bioinformática a nivel de la secuencia del DNA genómico de este microorganismo reveló la presencia de 9 genes codificantes para proteínas involucradas en la vía del c-di-GMP, incluyendo diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas y proteínas efectoras de tipo PilZ. Ensayos de RT-PCR y qRT-PCR demostraron que varios de estos genes se transcriben. El análisis de extractos nucleotídicos permitió detectar la presencia del mensajero secundario c-di-GMP en *A. ferrooxidans*, sugiriendo que una o varias de las posibles diguanilato ciclasas/fosfodiesterasas (DGCs/PDEs) (AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379) es (son) responsable(s) de la síntesis de c-di-GMP. Los cuatro genes que codifican para posibles DGCs/PDEs fueron clonados y sobreexpresados en *Escherichia coli*. Sólo, en los



recombinantes sobreexpresando las proteínas AFE1360 y AFE1373 se observó una mayor incorporación de rojo de Congo, lo cual indica una producción de c-di-GMP y la consecuente activación alostérica de la producción de celulosa en *E. coli*. Sin embargo, se detectó la presencia del c-di-GMP en los extractos nucleotídicos de los cuatro recombinantes sobreexpresando las posibles DGCs/PDEs, indicando que en *E. coli* estas proteínas actúan como diguanilato ciclasas. Por otro lado, el uso del bis(*p*-nitrofenil) fosfato (bis-*p*NPP), un sustrato artificial similar al c-di-GMP, ha permitido revelar la presencia de una actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP en extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans*.

El análisis de los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* durante la curva de crecimiento en tiosulfato, revelan que a alta densidad celular, éstos son muy bajos. Por otro lado, se observó que los niveles del c-di-GMP son mayores cuando *A. ferrooxidans* es crecido en sustratos energéticos sólidos. Finalmente, se demostró que células de *A. ferrooxidans* conformando biopelículas sobre perlas de azufre presentaron niveles de c-di-GMP 10 veces mayores con respecto a las células planctónicas. Todos estos resultados sugieren que *A. ferrooxidans* posee una vía del c-di-GMP funcional y que ésta está involucrada en la regulación de la formación de biopelícula.

En esta tesis, también se analizó el efecto de varias acil homoserina lactonas (AHLs) y análogos de AHLs en la unión a pirita de *A. ferrooxidans*. Se observó que una mezcla de AHLs disminuyó la unión de *A. ferrooxidans* a la pirita y la densidad celular de las biopelículas sobre pirita (Ruiz y col., 2008). Estos resultados sugirieron por primera vez

que es posible modular la adherencia de *A. ferrooxidans* sobre sustrato energético sólido como la pirita mediante el uso de AHLs y análogos de AHLs sintéticos.

Tomando en cuenta que la vía del c-di-GMP y el sistema de “Quorum Sensing” basado en autoinductor de tipo AHL, tienen un papel en la regulación de la formación biopelícula en *A. ferrooxidans*, nuestro laboratorio está ahora muy interesado en discernir los posibles puntos donde estos sistemas de señalización convergen.

# ABSTRACT

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithotrophic, extremophilic, acidophilic, Gram-negative bacterium of great importance in biomining. This bacterium is able to oxidize ferrous iron or reduced sulfur compounds as a means of obtaining energy for growth. Such energetic metabolism is responsible for mineral solubilization. The attachment and adhesion of these bacteria to its energy source and the subsequent biofilm formation are prerequisites for mineral dissolution in the environment and in biolixiviation industrial operations. These processes are mediated by extracellular polymeric substances. This thesis provides knowledge about the molecular mechanisms that regulate the biofilm development by *A. ferrooxidans*.

Firstly, results regarding to the characterization of the cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP) pathway in *A. ferrooxidans* are shown. A bioinformatic search in the genomic DNA sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 revealed the presence of 9 genes encoding for proteins involved in the c-di-GMP pathway, including diguanylate cyclases, phosphodiesterases and effector proteins of PilZ. RT-PCR and qRT-PCR assays have shown that several of these genes are transcribed.

The analysis of bacterial nucleotide extracts obtained from cells grown in different energetic substrates, allow us to demonstrate that secondary messenger c-di-GMP is present in the extremophile bacterium *A. ferrooxidans*. This result suggest that one or several of these probable diguanylate ciclases/phosphodiesterases DGCs/PDEs (AFE0053, AFE1360,

AFE1373 and AFE1379) is/are responsible for c-di-GMP synthesis. The four genes encoding for probable DGCs/PDEs were cloned and over expressed in *Escherichia coli*. Only the recombinants over expressing the proteins AFE1360 and AFE1373 have shown a higher Congo red incorporation, which indicates the production of c-di-GMP and subsequent allosteric activation of cellulose synthesis in *E. coli*. However, the presence of c-di-GMP was detected in bacterial nucleotide extracts of the four recombinants over expressing the probable DGCs/PDEs, which indicates that *E. coli* in these proteins function as diguanylate cyclases. Furthermore, the use of the artificial substrate bis(*p*-nitrophenyl) phosphate which presents similar structure to c-di-GMP, allows to reveal a specific c-di-GMP phosphodiesterase activity in *A. ferrooxidans*.

The analysis of c-di-GMP levels in *A. ferrooxidans* cells in the growth curve for thiosulphate, shows that they are very low at high cellular density. On the other hand, *A. ferrooxidans* grown with different energy sources presented a variation of the c-di-GMP levels being highest under the presence of a solid energy substrate. Finally, the analysis of c-di-GMP levels in *A. ferrooxidans* biofilms on sulphur pearls show a concentration 10 times higher than that found in planktonic cells. As it occurs in other bacteria, the presence of higher levels of c-di-GMP in the *A. ferrooxidans* biofilm, suggests that the c-di-GMP pathway has a role in the assimilation of the environmental surroundings for the control of biofilm development.

Altogether these results, allow us to conclude that *A. ferrooxidans* ATCC 23270 possesses a functional c-di-GMP pathway which seems to be strongly mediator in biofilm formation.

In addition, during this thesis, the effect of several synthetic AHLs and analogues on the attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite has been also analyzed. The results revealed that a mixture of AHLs induced a decrease in the attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite and cellular density of biofilms over pyrite. This was the first evidence that it is possible to modulate the attachment levels of *A. ferrooxidans* over solid energy substrates like pyrite by using synthetic AHLs and AHLs analogues (Ruiz y col., 2008).

Taking into account that the c-di-GMP pathway and the QS type AI-1 system have a role in the regulation of biofilm formation in *A. ferrooxidans*, now it is a great deal for our research team to understand if some molecular connexion between both pathways exists.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Biopelículas**

Las biopelículas son consideradas el ecosistema más importante sobre la Tierra (Costerton y col., 1995). Estas son ubicuas en el ambiente y representan la forma más común del crecimiento bacteriano. Las biopelículas bacterianas están integradas por poblaciones de diferentes especies y la dinámica poblacional depende de la disponibilidad de nutrientes, el metabolismo de las diferentes especies y la migración de otras poblaciones (Moons y col., 2009). Las biopelículas de las bacterias extremófilas se encuentran en condiciones extremas de temperatura, presión y/o acidez donde ningún otro organismo puede vivir (Deppe y col., 2005; Thomas y Dieckmann, 2002).

Las bacterias dentro de las biopelículas pueden beneficiarse de los recursos compartidos a nivel de la comunidad y así logran obtener ventajas en su crecimiento con respecto a las bacterias planctónicas (Moller y col., 1998). La diversidad de los procariotes es tan grande que muchas especies microbianas son altamente especializadas y conducen su actividad metabólica en cooperación o competencia con otros microorganismos (Burmolle y col., 2006). Además, la presencia de múltiples aceptores y donadores de electrones estimula el asentamiento de diferentes especies microbianas especializadas para formar biopelículas mixtas. Así, muchas biopelículas en sus ambientes naturales son comunidades heterogéneas y consisten de un consorcio de especies que presentan actividades metabólicas cooperativas (Tyson y col., 2004).

Las bacterias inmersas dentro de las biopelículas son morfológica y fisiológicamente diferentes a las bacterias planctónicas (Watnick y Kolter, 2000). El estudio del desarrollo de biopelículas en diferentes bacterias ha permitido definir que su formación requiere de distintos procesos. Entre éstos, es importante destacar: i) el movimiento de las bacterias hacia el sustrato, al cual las bacterias pueden o no adherirse dependiendo de la fuerza de interacción. Durante esta colonización inespecífica inicial parecen ser importantes proteínas de superficie y autolisinas, ii) subsiguientemente se produce la colonización secundaria que está mediada por interacciones célula a célula a través de adhesinas, iii) a continuación el crecimiento celular conduce a la acumulación microbiana en la biopelícula, lo que conlleva a la formación de microcolonias y la maduración de la biopelícula, iv) posteriormente las bacterias se rodean de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs), que tienen un papel importante en la estructura y propiedades fisicoquímicas de estas comunidades. Las SPEs forman una estructura tridimensional con canales acuosos que permiten el importe de nutrientes y la exportación de sustancias de desecho. Las SPEs representan de un 50 a 90 % de la materia orgánica total de la biopelícula (Prigent-Combaret y col., 1999; Davey y O'Toole, 2000; Ghannoum y O'Toole, 2004).

El asentamiento de comunidades microbianas mixtas sobre las superficies, donde las células están conectadas físicamente entre si, favorece las interacciones sociales entre las bacterias. Estas interacciones incluyen la competencia y la cooperación entre los procariotes que conforman la biopelícula (Costerton y col., 1995).

En medio de la biopelícula, cada bacteria ocupa un microambiente específico y el establecimiento de gradientes químicos puede conducir a la diversidad fisiológica en medio de la comunidad. Efectivamente, la estructura de la biopelícula es fuertemente influenciada por la distribución del oxígeno y el transporte de masas en su interior (Costerton y col., 1995, Prigent-Combaret y col., 1999; Davey y O'Toole, 2000, Watnick y Kolter, 2000).

Todo lo anterior hace evidente que la formación de la biopelícula es un proceso complejo que puede ser regulado en diferentes niveles a través de diversos mecanismos moleculares. Esta regulación puede ser altamente específica dependiendo del nicho ecológico particular (Johnson y col., 2005). Hasta la fecha los mecanismos moleculares más estudiados que controlan el desarrollo de las biopelículas se destacan el “quorum sensing” (QS) y la vía de transducción de señales mediante el mensajero secundario diguanilato monofosfato cíclico (vía del c-di-GMP).

## **1.2 “Quorum sensing”**

### **1.2.1 Generalidades**

En general, la densidad celular en una biopelícula es mayor que en un cultivo líquido. Las biopelículas acumulan metabolitos secundarios y otros factores microbianos excretados, dentro los cuales son de particular interés las moléculas de comunicación intercelular o moléculas de QS (Parsek y Greenberg, 2005). Las biopelículas representan un contexto ambiental relevante para el QS. Para algunas especies es evidente que el QS es importante en la construcción y/o disolución de las comunidades en biopelícula (Parsek y Greenberg, 2005). El QS es un mecanismo de comunicación célula a célula mediante



señales autoinductoras que permite la regulación de procesos celulares en una manera dependiente de la densidad celular. Una vez alcanzada cierta concentración umbral, el autoinductor gatilla la expresión de diferentes genes blancos (Fuqua y col., 1994). Los sistemas QS comparten las siguientes características: i) producción de la molécula señal o molécula autoinductora (AI) por la célula bacteriana, ii) acumulación del AI en el ambiente celular, iii) cambios coordinados en la expresión génica después de que la molécula AI alcanza una concentración umbral (Valenzuela y col., 2007). Aunque se conocen varios sistemas de QS, los más ampliamente descritos son los sistemas basados en AI de tipo i) acil homoserina lactonas (AHLs o AI-1) presentes en bacterias Gram-negativas, ii) oligopéptidos en bacterias Gram-positivas y iii) el DPD (4,5-Dihidroxi-2,3-pentanodiona) o AI-2 presente tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Whitehead y col., 2001; Parsek y Greenberg, 2005).

### **1.2.2 QS de tipo AI-1**

Este sistema de QS del tipo AI-1 está compuesto de cinco elementos: i) la proteína sintasa de la molécula autoinductora (AI) que pertenece a la familia de proteínas LuxI; ii) la molécula AI de tipo AHL; iii) el regulador transcripcional que pertenece a la familia de proteínas LuxR; iv) secuencias palindrómicas en el DNA genómico para la unión del regulador transcripcional y v) los genes blancos de la regulación (Andersen y col., 2001; Whitehead y col., 2001, Hammer y Bassler, 2003).

La sintasa de AHLs tiene como sustratos la *S*-adenosilmetionina (SAM) y una proteína portadora de la cadena acilo (acil carrier protein - ACP) (Parsek y col., 1999; More

y col., 1996; Schaefer y col., 1996). Hasta la fecha se han descrito cadenas acilo cuyo largo es desde 4 a 18 carbonos, pudiendo ser par e impar (Lithgow y col., 2000; Kastbjerg y col., 2007). El carbono C3 de la cadena acilo puede estar saturado o insaturado, siendo los sustituyentes identificados hasta la fecha hidroxilo o ceto (Andersen y col., 2001). La familia de las proteínas LuxR se divide en al menos dos grupos de reguladores transcripcionales. Las proteínas R de tipo activador que inician su acción con su interacción con la AHL relacionada lo cual promueve un cambio conformacional que permite la dimerización de la proteína R. Luego, los dímeros de proteína R se unen a las secuencias promotoras relevantes en el DNA e inducen la transcripción. Por otro lado, se han descrito proteínas R que pueden unirse a la secuencia promotora de los genes blancos en ausencia de AHLs, actuando entonces como represores (Whitehead y col., 2001). Las secuencias palindrómicas en el DNA donde se unen los activadores R son conocidas como cajas *lux*. Las cajas *lux* son invertidos repetidos de 20 pb localizados alrededor de 40 pb río arriba de los genes regulados por las proteínas R (Whitehead y col., 2001). En cuanto a los genes blancos de la regulación por QS, éstos son primordiales para coordinar la expresión de fenotipos fundamentales para la interacción de la bacteria con otros microorganismos y con el ambiente. De hecho, se requiere un alto grado de interacción coordinada célula a célula que permita la organización estructural y distribución de las actividades metabólicas en una biopelícula.

Por ello, el QS es muy importante en la regulación de la formación de las biopelículas. El papel del sistema de QS del tipo AI-1 en la regulación de la formación de la biopelícula fue originalmente reportado para *Pseudomonas aeruginosa*, donde se sugiere la participación del sistema de QS en el desarrollo característico de la arquitectura de la biopelícula (Davies y col., 1998). En *Burkholderia cepacia* (Huber y col., 2001),

*Aeromonas hydrophila* (Lynch y col., 2002) y *Serratia liquefaciens* (Labbate y col., 2004), sistemas de QS del tipo AI-1 están involucrados en la formación y maduración de biopelículas. En *Vibrio cholerae* el QS del tipo AI-1 regula la formación de la biopelícula a través de la regulación de los genes requeridos para la producción de exopolisacáridos (EPS), necesarios para la formación de la biopelícula (Zhu y col., 2002; Hammer y Bassler, 2003). En *Pseudomonas putida* las señales de QS inducen la producción de lipopéptidos que controlan la formación de la biopelícula (Steidle y col., 2002; Dubern y col., 2006).

## 1.3 Vía del c-di-GMP

### 1.3.1 Mecanismos de transducción de señales en procariontes

La mayoría de los sistemas de transducción de señales procarióticos están compuestos por un dominio receptor que está fusionado directamente a un dominio regulador de salida (Ulrich y col., 2005). Estos sistemas de tipo un componente (1C) unen con frecuencia la transcripción de los genes de una vía metabólica a la disponibilidad de sustratos. El diseño simple de los sistemas de señalización de 1C puede ser extendido a dos proteínas diferentes con dominios de entrada y salida asociadas por un sistema de “fosforelay”, transformándose entonces en un sistema de dos componentes (2C). Es el caso por ejemplo de un receptor acoplado a una proteína histidina kinasa activa mediante fosforilación del dominio de salida de una proteína reguladora de respuesta (Stock y col., 2000). Usualmente, los receptores activados influyen en la concentración intracelular de moléculas difusibles que actúan como mensajeros secundarios. Este principio de señalización permite acoplar – integrar diferentes entradas con la síntesis y degradación del mensajero secundario (Stock y col., 2000; Ulrich y col., 2005).

### 1.3.2 Sistemas de mensajeros secundarios bacterianos

A pesar de la abundancia y diversidad de nucleótidos involucrados en la regulación de muchos procesos vitales en células de animales, de plantas y de procariotas, todos los sistemas de señalización mediante mensajeros secundarios basados en nucleótidos se fundamentan en la presencia de dos actividades enzimáticas diferentes que catalizan la síntesis y degradación del mensajero secundario que es capaz de unirse a una molécula efectora como un regulador alostérico. A continuación, el efector interactúa con un blanco molecular que es parte de la función de salida regulada por el mensajero secundario (Pesavento y Hengge, 2009).

En bacterias, pequeños nucleótidos purínicos son usados frecuentemente como mensajeros secundarios en los sistemas de señalización. Recientemente, se descubrió el diadenilato cíclico (c-di-AMP) involucrado en el monitoreo de la integridad del cromosoma en *Bacillus subtilis* indicando que la lista de mensajeros secundarios basados en nucleótidos continuará creciendo (Witte y col., 2008). El adenilato cíclico (cAMP), las guanosinas pentafofato y tetrafofato ((p)ppGpp) y el diguanilato monofosfato cíclico (c-di-GMP), son los mensajeros secundarios más ampliamente estudiados y comprendidos (Lucas y col., 2000; Schwartz, 2001; Jenal, 2004; Pesavento y Hengge, 2009). El cAMP es sintetizado por la acción de adenilato ciclasa en respuesta a la limitación de carbono, detectada a través de la ausencia del transporte de azúcar por el sistema fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenol piruvato -PTS- (“phosphoenol-pyruvate-dependent sugar phosphotransferase system”) y degradado por una fosfodiesterasa. El cAMP se une a CRP,

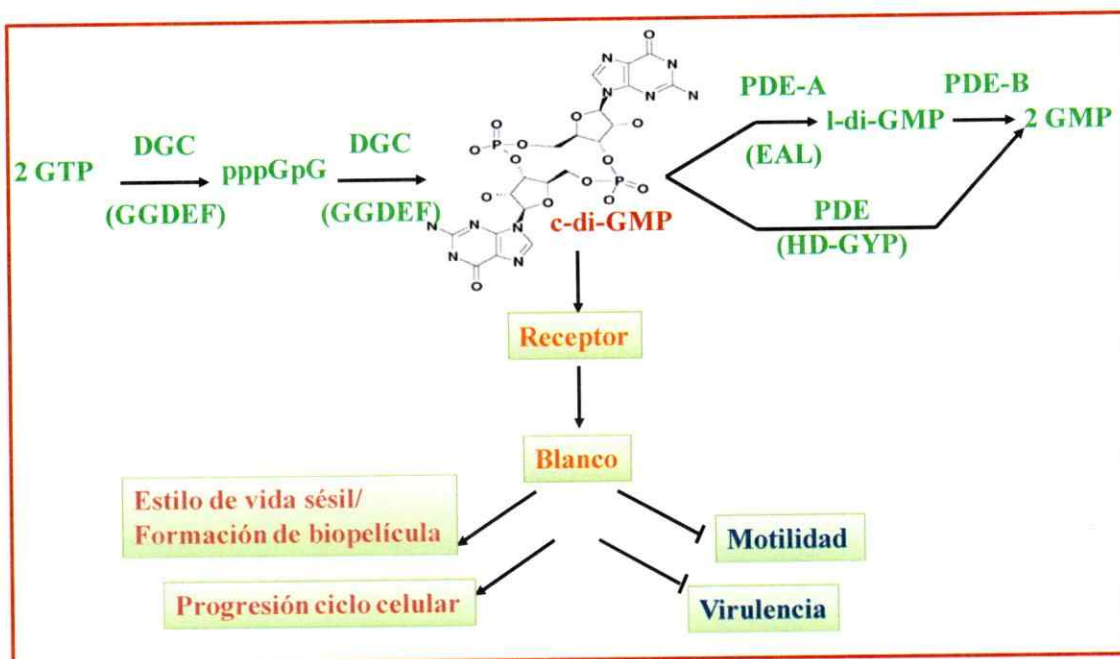
la proteína receptora de cAMP. cAMP-CRP funciona como un regulador transcripcional en la inducción de enzimas específicas para el catabolismo de fuentes alternativas de carbono (Harman, 2001). La alarmona ppGpp derivada del GTP es producida por una GTP pirofosfokinasa en respuesta a la privación de nutrientes y causa la represión de la transcripción del RNA ribosomal y del tRNA o activa la expresión de genes para la síntesis y transporte de aminoácidos (Reiness y col., 1975, Paul y col., 2005). Por su parte, el dinucleótido cíclico c-di-GMP ha sido recientemente reconocido como un mensajero secundario importante, ampliamente usado para orquestar el desarrollo de biopelícula a través del control de la producción de los exopolisacáridos (Jenal 2004; García y col., 2004; Simm y col., 2004; Tischler y Camilli, 2004; Bobrov y col., 2005; Brouillette y col., 2005; Hickman y col., 2005; Thormann y col., 2006). La señalización mediante c-di-GMP se caracteriza por la multiplicidad de proteínas involucradas en su metabolismo así como en la diversidad de las moléculas efectoras (Pesavento y Hengge, 2009).

### **1.3.3 Bioquímica del mensajero secundario c-di-GMP**

El c-di-GMP es sintetizado por la enzima diguanilato ciclasa (DGC), proteína que se caracteriza por la presencia del dominio GGDEF. En contraste, es degradado por enzimas fosfodiesterasas (PDE), que poseen el dominio EAL o el dominio HD-GYP (Jenal, 2004; Ryjenkov y col., 2005; Schmidt y col., 2005; Ryan y col., 2006). Las DGCs catalizan la síntesis de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP, a través de dos pasos en los cuales ocurre la liberación de pirofosfato y pppGpG, como intermediario (Figura 1). El c-di-GMP es hidrolizado por PDEs del tipo EAL, a través del corte del enlace fosfodiéster en el c-di-GMP produciendo GMP dimérico lineal GpGp (l-di-GMP) (Ross y col., 1986;

Ryjenkov y col., 2005; Christen y col., 2005; Schmidt y col., 2005; Tamayo y col., 2005).

Por su parte, las PDEs del tipo HD-GYP hidrolizan el c-di-GMP directamente a GMP (Ryan y col., 2006).



**Figura 1.** Vía de señalización mediante el mensajero secundario c-di-GMP. El c-di-GMP es sintetizado a partir de 2 GTPs por DGCs con dominios GGDEF. C-di-GMP es hidrolizado a pGpG lineal por el dominio EAL de PDE-A, posteriormente, el pGpG es llevado a 2 GMP por otras fosfodiesterasas. Por su parte, las PDEs con el dominio HD-GY hidrolizan el c-di-GMP, directamente a GMP. El c-di-GMP activa la producción de EPS y la formación de biopelícula, pero inhibe la motilidad y virulencia (Tamayo y col., 2007). El c-di-GMP es acoplado por múltiples moléculas efectoras, que incluyen varias familias de proteínas y “riboswitches” (Pesavento and Hengge, 2009; Hengge 2009).

Las actividades enzimáticas DGC y PDE, son reguladas por señales ambientales, tales como oxígeno (Jenal, 2004), vías de señalización intra- e intercelulares, tales como la transferencia de fosfato, la carencia de nutrientes detectada a través de GTP y espermidina (Christen y col., 2005; Paul y col., 2004; Ryjenkov y col., 2005; Karatan y col., 2005; Simm y col., 2007).

### **1.3.4 Organización estructural y funcional de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación del c-di-GMP**

Los dominios GGDEF y EAL de las enzimas DGCs y PDEs constan aproximadamente de 180 y 240 residuos y fueron definidos por la presencia de los motivos conservados Gly-Gly-Asp-Glu-Phe y Glu-Ala-Leu, respectivamente. Frecuentemente, los dominios GGDEF y EAL están situados en la misma proteína. Usualmente el dominio GGDEF está localizado en el N-terminal, mientras el dominio EAL está localizado en el C-terminal. A su vez los dominios GGDEF y EAL están acompañados por dominios sensores y/o dominios de transducción de señal ubicados aún mas en el N-terminal de la proteína bifuncional. Estos dominios compuestos de receptores especializados pueden detectar un amplio rango de señales tales como: iones, péptidos y proteínas, aminoácidos, moléculas gaseosas, carbohidratos, nucleótidos/nucleósidos, luz azul y fosforilación (Galperin, 2004; Römling y col., 2005).

El dominio GGDEF contiene la mitad del sitio catalítico donde se une sólo una molécula de GTP, sugiriendo que la forma activa de la DGC es un dímero de dos dominios GGDEF (Chan y col., 2004). Siendo suficientes el dominio GGDEF dimerizado para la actividad DGC y el dominio EAL para la actividad PDE, las proteínas que poseen ambos dominios, han sido inicialmente consideradas paradojas bioquímicas (Römling y col., 2005). El análisis de secuencias del dominio EAL en PDE activas ha indicado la presencia de motivos conservados ausentes en las PDE inactivas (Schmidt y col., 2005). Por otro lado, algunos dominios GGDEF que divergen de las secuencias consensos han sido postuladas como DGCs inactivas (Kulesakara y col., 2006). Estos dominios enzimáticamente inactivos podrían tener un rol regulador (Christen y col., 2005).

Recientemente, se estableció que proteínas con ambos dominios pueden tener tanto actividad DGC como actividad PDE, dependiendo de las condiciones ambientales (Kumar y Chatterji, 2008). Los casos que mejor ilustran el concepto de las proteínas bifuncionales son el bacteriofitocromo “BphG1” de *Rhodobacter sphaeroides*, la proteína “SrcC” de *Vibrio parahaemolyticus* y la proteína “MSDGC-1” de *Mycobacterium smegmatis*, que poseen los dominios GGDEF y EAL y presentan las dos actividades, DGC y PDE (Tarutina y col., 2006, Ferreira y col., 2008, Kumar y Chatterji, 2008).

### **1.3.5 Distribución y abundancia de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP**

Dependiendo de la especie bacteriana, el número de ORFs codificando para proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP presentan una gran variación en su abundancia (Römling y col., 2005). El agente causal de la enfermedad cólera, *V. cholera*, es un habitante de ecosistemas acuáticos dulces y salobres alrededor del mundo. Esta bacteria codifica para 12 proteínas con dominios EAL, 9 proteínas con dominios HD-GYP y 10 proteínas con dominios GGDEF-EAL (Galperin y col., 2001). Durante el cambio, desde ambientes acuáticos a su hospedero, la vía del c-di-GMP tiene un papel esencial en la regulación de cambios en la expresión genética de *V. cholera* (Tamayo y col., 2008). Lo anterior indica la importancia de la vía c-di-GMP en la fisiología de *V. cholerae* y para lograr una regulación tan fina muy probablemente requiere de la participación de la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP. En contraste, *M. smegmatis*, es una bacteria cuyo hábitat no presenta tanta diversidad como el de *V. cholerae*. Esta micobacteria posee una sola proteína involucrada en el metabolismo del



c-di-GMP y es primordial para la sobrevivencia durante largos periodos de carencia en nutrientes (Kumar y Chatterji, 2008). A pesar de la abundancia de proteínas implicadas en el metabolismo del c-di-GMP en la mayoría de genomas bacterianos secuenciados (Tabla 1), en algunas especies como *Helicobacter pylori* no se han identificado estas proteínas (Galperin, 2001).

**Tabla 1.** Abundancia de las proteínas con dominios proteicos involucrados en la vía de señalización del c-di-GMP que están identificadas en Bacteria.

Base de datos	Identificación	Nombre del dominio	No. de proteínas
Pfam	PF00990	GGDEF	16197
PROSITE profile	PS50887	GGDEF	16632
SMART	SM00267	DUF1	14602
InterPro	IPR000160	GGDEF	16953
Pfam	PF00563	EAL	9777
PROSITE profile	PS50883	EAL	9620
SMART	SM00052	DUF2	9287
InterPro	IPR001633	EAL	9833
PROSITE profile	PS50112	PAS	17786
SMART	SM00091	PAS	24569
TIGRFAMs	TIGR00229	Sensory box	17889
InterPro	IPR000014	PAS	26046
Pfam	PF01590	GAF	11074
SMART	SM00065	GAF	12097
InterPro	IPR003018	GAF	13478
SMART	SM00086	PAC	14335
InterPro:	IPR001610	PAC motif	14335
Pfam	PF07238	PilZ	2224
InterPro:	IPR009875	Type IV pilus assembly PilZ	2224
Pfam	PF06490	FleQ	139
InterPro:	IPR010518	Flagellar regulatory FleQ	139

### 1.3.6 Significancia de los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en la fisiología celular bacteriana

Los niveles intracelulares del c-di-GMP están en el rango micromolar o menor. La concentración del c-di-GMP puede fluctuar localmente. La medida y concentración real del c-di-GMP en el citoplasma pueden diferir (Römling y col., 2005).

La concentración celular del c-di-GMP en *Gluconacetobacter xylinum* fue estimada en 5 – 10  $\mu\text{M}$  (Tal y col., 1998). Este rango de concentración es similar al cAMP, pero 100 veces menor que la concentración estimada para el GTP en células bacterianas. No obstante, solo una pequeña cantidad de c-di-GMP parece difundir libremente dentro de la célula, la mayor parte del c-di-GMP no se encuentra libre, sino asociado con sus receptores. Esta forma unida podría modular la concentración intracelular del c-di-GMP libre, probablemente protegiendo el dinucleótido de la degradación por PDEs (Jenal, 2004).

En *G. xylinum* solo una fracción de la concentración celular del c-di-GMP es requerida para lograr una activación óptima de la biosíntesis de celulosa (Tal y col., 1998), sugiriendo que varios procesos biológicos pueden requerir diferentes umbrales de concentraciones del c-di-GMP (Römling y col., 2005).

Ha sido bien establecido que la concentración del c-di-GMP aumenta durante la formación de biopelícula, estilo de vida sésil y la expresión de componentes adhesivos de la matriz extracelular, mientras que su concentración disminuye durante la virulencia y estilos de vida móviles (Simm y col., 2004; Tischler y Camilli, 2004; Römling y col., 2005; Hickman y col., 2005; Camilli y Bassler, 2006; Römling y Amikam, 2006; Thorman y col., 2006; Simm y col., 2007).

Tischler y Camilli (2004) fueron los primeros en proponer que las DGCs y las PDEs contribuyen a regular la formación de biopelículas mediante el control de la concentración del c-di-GMP. Brevemente, ellos demostraron que la proteína VieA con el dominio EAL reduce la concentración intracelular del c-di-GMP y es responsable de la represión de la transcripción de genes implicados en la producción de EPS y la formación de biopelícula (Tischler y Camilli, 2004).

El concepto anterior fue reforzado por las investigaciones *in vivo* de Simm y col., (2004) en *S. Typhimurium*, *E. coli* y *P. aeruginosa* PAO donde establecieron que los dominios GGDEF elevan la concentración del c-di-GMP, mientras que los dominios EAL la disminuyen (Simm y col., 2004). Al inducir la expresión de la proteína AdrA con el dominio GGDEF, los niveles del c-di-GMP incrementaron, así como la producción de celulosa evidenciada por el morfotipo *pdar* “pink dry and rough” o el morfotipo *rdar* “red dry and rough”, la adherencia a superficies abióticas, la formación de biopelícula, la formación de película y “cumpling”. Por el contrario, la expresión de la PDE YhjH con el dominio EAL disminuyó la concentración del c-di-GMP así como la producción de celulosa y en consecuencia se aumentó la motilidad de tipo; “swarming”, “swimming” y “twitching”.

En *V. cholerae*, el 4.5% de los genes son expresados diferencialmente en respuesta al incremento en los niveles del c-di-GMP (Beyhan y col., 2006). Las principales respuestas fueron un incremento en la expresión de los genes requeridos para la biosíntesis del polisacárido, los genes involucrados en el sistema de secreción de proteínas extracelulares y los genes requeridos para la biogénesis del pili tipo IV hemaglutinina sensible manosa. También, se presentó una disminución en la expresión de los genes requeridos para la biosíntesis del flagelo. En conclusión, *V. cholerae* responde a cambios en el nivel de

c-di-GMP, mediante la modulación de la producción de los componentes de la superficie celular, lo cual conduce a cambios en la movilidad y la formación de biopelícula (Beyhan y col., 2006). El análisis de las respuestas tempranas y tardías a un nivel alto del c-di-GMP, indicó diferencias en los perfiles de transcripción, sugiriendo que hay respuestas iniciales y secundarias al incremento en el nivel del c-di-GMP (Beyhan y col., 2006).

Por eso, se ha propuesto que los niveles del c-di-GMP median la transición de un modo de crecimiento multicelular en biopelícula a un estatus celular planctónico y motil, así como la transición entre células sésiles y móviles (Simm y col., 2004).

### **1.3.7 Modos de acción del c-di-GMP**

El c-di-GMP tiene efectos tanto en la actividad enzimática y ensamble de proteínas así como sobre la expresión de genes para la síntesis de EPS, biogénesis del flagelo y virulencia en diversas bacterias (Hickman y col., 2005; Beyhan y col., 2006; Mendez-Ortiz y col., 2006; Lee y col., 2007; Ferreira y col., 2008). Inicialmente, se identificaron 3 familias de proteína efectoras que unen el c-di-GMP a nivel intracelular. PilZ y PelD tienen un efecto sobre complejos proteicos con proteínas involucradas en la síntesis de alginato, celulosa sintasa, flagelo y pili (Ryjenkov y col., 2006; Christen y col., 2007; Lee y col., 2007; Merighi y col., 2007; Prat y col., 2007). Por otro lado, FleQ tiene un efecto sobre la regulación transcripcional de genes involucrados en la síntesis de EPS (Hickman y Harwood, 2008). También, se identificó que el c-di-GMP es unido por un “riboswitch” que posee el dominio conservado GEMM en la región 5'-UTR de mRNAs de genes para el ambiente, membranas y motilidad (Weinberg y col., 2007; Sudarsan y col., 2008). Sin embargo, el número de proteínas efectoras que unen c-di-GMP sigue incrementando así

como la comprensión de las diversas funciones reguladas por esta molécula. Recientemente, se caracterizó que la proteína de membrana LapD une c-di-GMP a través de un dominio EAL degenerado y comunica al periplasma los niveles citoplasmáticos de c-di-GMP mediante su dominio de salida periplasmático HAMP (Newell y col., 2009). El último ejemplo conocido de los efectores de la vía c-di-GMP, es el regulador transcripcional Clp que modula positivamente la producción de un factor de virulencia. Clp posee un dominio de unión conservado para nucleótido monofosfato cíclico (cNMP), el cual une c-di-GMP específicamente y con gran afinidad. Esta interacción impide que Clp se una al promotor de su gen blanco, por lo cual el c-di-GMP actúa como inhibidor de la expresión del gen de virulencia dependiente de Clp (Tao y col., 2010).

### 1.3.8 Interconexión del sistema de QS y la vía c-di-GMP

El QS y la señalización mediante el mensajero secundario c-di-GMP regulan procesos fisiológicos similares como formación de biopelícula, multicelularidad y virulencia. Camilli y Bassler (2006) basándose en diversas observaciones indirectas postularon que las vías de señalización extracelular mediante QS e intracelular a través de c-di-GMP pueden interconectarse para controlar la formación de biopelícula, multicelularidad y virulencia.

La transducción de la señal de QS “DFS” (ácido *cis*-11-metildodecenoico) de *X. campestris* está asociada con la degradación del c-di-GMP, esto posiblemente a través de la activación que ejerce “DFS” en la proteína con actividad PDE (HD-GYP) RpfG (Ryan y col., 2006). Rahman y col. (2007), demostraron que en *Aeromonas veronii* se duplica la producción de C4-HSL al sobreexpresar una DGC. Por otro lado, HapR, el principal

regulador de QS en *V. cholerae*, reprime la formación de biopelícula mediante el control de la transcripción de varios genes involucrados en el metabolismo del c-di-GMP (Waters y col., 2008; Hammer y Bassler, 2009). Cuando *V. cholerae* enfrenta una densidad celular alta se presenta una reducción de 20 veces de los niveles del c-di-GMP y de la formación de biopelícula (Waters y col., 2008). Finalmente, en *P. aeruginosa* se observó una conexión entre el QS, la vía del c-di-GMP, la producción del polisacárido Pel y la formación de biopelícula, mediada por la proteína TpbA con actividad tirosina fosfatasa (Ueda y Wood, 2009).

## **1.4 Biominería: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y Biopelícula**

### **1.4.1 Generalidades**

La recuperación del cobre se realiza mediante un proceso conocido como biolixiviación o biominería. Este es un proceso en dos pasos: Primero, la oxidación biológica del Fe(II) para producir Fe(III); segundo, la oxidación química del Cu(I) a Cu(II) por Fe(III), el cual es reducido a Fe(II). *A. ferrooxidans* reoxidiza el Fe(II) a Fe(III), completando así el ciclo y permitiendo que la biolixiviación continúe. Además, *A. ferrooxidans* oxida aeróbicamente compuestos reducidos del azufre como la piritita ( $\text{FeS}_2$ ). La remoción inicial de electrones de la  $\text{FeS}_2$ , entre otros sustratos sólidos, toma lugar a nivel de la membrana celular externa o a través de las SPEs en el exterior de la célula (Rawlings, 2002; Rohwerder y col., 2003; Valdés y col., 2008).

Chile es el principal productor de cobre en el mundo, con una producción que alcanza actualmente cinco millones de toneladas, de los cuales un 10% se obtiene por

lixiviación bacteriana. En el norte de Chile se encuentra la mina La Escondida, donde se opera una de las mayores pilas de biolixiviación (Valdés y col., 2008). En este biorreactor se coloca el cobre pulverizado, el cual es asperjado con ácido sulfúrico y aireado para promover la oxidación microbiana del hierro y azufre (Valdés y col., 2008). En Chile las reservas de cobre con alta ley se han agotado, por lo anterior son muy importantes para el país, los diferentes estudios que se realizan con el propósito de comprender la bioquímica de los microorganismos involucrados en los procesos biomineros, siendo *A. ferrooxidans* uno de los mas relevantes.

#### **1.4.2 *A. ferrooxidans*: modelo de estudio en la biomería**

Esta bacteria Gram-negativa es quimiolitotrofa, anaeróbica facultativa. Crece óptimamente a 30 grados Celsius y a un pH de 2.0, sin embargo puede crecer a un pH de 1.0 y mas bajos (Rohwerder y col., 2003). Este acidófilo es abundante en áreas con alto contenido de sulfuros y ambientes naturales asociados con minerales piríticos, depósitos de carbón y en drenajes ácidos de minas (González-Toril y col., 2003; Davies y col., 2000).

*A. ferrooxidans* obtiene su energía mediante la oxidación de hierro ferroso en ambientes acidicos, usando el pH bajo de su ambiente natural para generar un flujo de electrones reverso desde el Fe(II) al NADH (Levicán y col., 2002; Yarzabal y col., 2004, Brasseur y col., 2004; Bruscella y col., 2007). También, puede obtener energía por la oxidación de compuestos reducidos del azufre, hidrógeno y formato (Drobner y col., 1990; Pronk y col., 1991). *A. ferrooxidans* fija CO<sub>2</sub> mediante el ciclo de Calvin usando energía y poder reducido derivados de la oxidación del hierro o el azufre (Heinhorst y col., 2002; Rowe y col., 2007). Sus requerimientos de nitrógeno son obtenidos tanto por su fijación como por

la asimilación de amonio (Makcintosh, 1978; Pretorius y col., 1986; Rowe y col., 2007). Por su habilidad en la oxidación y reducción de metales, esta bacteria extremófila contribuye significativamente a los ciclos biogeoquímicos de metales en el ambiente y tiene el potencial de ayudar en la biorremediación de sitios contaminados y en la recuperación de metales importantes tales como el oro, uranio y cobre de baja ley mediante el proceso de biolixiviación. Por esto, este acidófilo es usado en los consorcios bacterianos empleados por las compañías mineras para la extracción de metales (Duquesne y col., 2003). El proceso de biolixiviación se ve favorecido cuando *A. ferrooxidans* y los demás microorganismos se adhieren al sustrato sólido y forman biopelículas (Rohwerder y col., 2003).

#### **1.4.3 Formación de biopelícula por *Acidithiobacillus ferrooxidans***

La unión y adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a superficies minerales y la subsiguiente formación de biopelícula son importantes en la disolución del mineral, tanto en operaciones industriales como ambientes naturales. Dicha unión se lleva a cabo a través de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Gerhke y col., 2001). Las SPEs están compuestas de polisacáridos, proteínas y DNA, y median el contacto entre la bacteria y la fuente de energía, lo cual es de vital importancia en la formación de las biopelículas e interacciones bacteria-sustrato (Gerhke y col., 1998; Schippers y Sand, 1999; Sand y Gerhke, 2006). *A. ferrooxidans* adapta la composición de sus SPEs a la fuente de energía, por lo cual se ha propuesto que el modo de adhesión debe ser diferente para las células que oxidan compuestos reducidos de azufre o para aquellas que oxidan hierro (Gerhke y col., 2001; Harnett y col., 2005). La bacteria debe ser capaz de sentir la superficie para la unión



gatillando la expresión de genes diferentes (Gerhke y col., 2001). Las SPEs al parecer median la unión a la superficie del sulfuro metálico y concentran los iones  $\text{Fe}^{3+}$  mediante la formación de complejos a través de ácidos urónicos u otros residuos, permitiendo así un ataque oxidativo sobre el sulfuro (Sand y Gehrke, 2006). La disponibilidad de iones hierro disueltos durante el proceso de biolixiviación es un factor crucial para el desarrollo de ciertos tipos de SPE (Gerhke y col., 2001). En este sentido, adquiere relevancia que en *A. ferrooxidans* se haya caracterizado un sistema de quimiotaxis que responde a iones hierro (Acuña y col., 1986, 1992). Gerhke y col. (2001) sugirieron que la regulación de la síntesis de SPE en *A. ferrooxidans* puede ser controlado por este sistema sensor de hierro. Por otro lado, Barreto y col. (2005) describieron la presencia funcional de un operón *gal* en *A. ferrooxidans*. Este operón se expresa más en células que tienen como sustrato energético hierro en relación con aquellas que tienen azufre. Por eso, estos autores especularon que la expresión diferencial de los genes del operón *gal* refleja la necesidad de diferentes mecanismos de adhesión.

#### 1.4.4 Sistema de QS en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*A. ferrooxidans* posee un sistema funcional de QS del tipo AI-1 (Farah y col., 2005, Rivas y col., 2005). El locus genético *afeIR* del sistema de QS AI-1 está compuesto por tres marcos abiertos de lectura (ORFs): *afeI*, *orf3* y *afeR*. Los genes *afeI* y *afeR* son divergentes, y codifican para proteínas con altos niveles de similaridad a miembros de la familia LuxI de proteínas de sintasas de AHLs (I) y de la familia LuxR de reguladores transcripcionales (R), respectivamente. Por su parte el *orf3*, localizado en la región intergénica codifica para una proteína hipotética cuya función es desconocida.

La sobreexpresión de *AfeI* correlacionada con la producción de AHLs en *Escherichia coli*, permitió establecer que *AfeI* es una sintasa de AHLs (Farah y col., 2005). *A. ferrooxidans* produce AHLs con cadenas aciló cuyo largo oscila entre 8 y 16 carbonos y sustituciones del tipo oxo e hidroxilo en el C-3 (OH-C8-AHL, OH-C10-AHL, C12-AHL, oxo-C12-AHL, OH-C12-AHL, C14-AHL, oxo-C14-AHL, OH-C14-AHL, y OH-C16-AHL). La presencia de AHLs con sustitución tipo hidroxilo fue independiente del medio de cultivo mientras que aquellas que presentaron la sustitución tipo oxo sólo se encontraron en las células cultivadas en azufre y tiosulfato. Además, la transcripción del gen *afeI* es mayor en las células crecidas en azufre y tiosulfato que en las cultivadas en hierro. La carencia de fosfato induce un incremento en los niveles de transcripción de *afeI* lo cual está correlacionado con los niveles de AHLs (Farah y col., 2005). En *P. aeruginosa* y *Serratia sp.* ATCC 39006, el metabolismo de fosfatos se ha relacionado con las vías reguladoras del QS y el desarrollo de las biopelículas (Rashid y col., 2000; Ledgham y col., 2003; Slater y col., 2003). Todos estos antecedentes permitieron a nuestro laboratorio plantear la hipótesis que el sistema de QS de tipo AI-1 podría regular la formación de biopelículas en *A. ferrooxidans* (Farah y col., 2005). Posteriormente, Rivas y col., (2007) describieron una segunda sintasa de AHLs codificada por el gen *act* (Rivas y col., 2007), el cual presenta una mayor expresión cuando *A. ferrooxidans* es crecido en hierro en relación con el medio que contiene azufre. Por esto, Rivas y col., (2007) proponen que los dos sistemas de QS de *A. ferrooxidans* responden a señales ambientales diferentes y esto puede estar relacionado con su capacidad de unirse a minerales diferentes que contienen tanto azufre como hierro. Por otro lado, se postula que un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en el control y regulación de la formación de biopelícula podría ser de gran importancia para el control del proceso de biolixiviación en la industria biominera (Valenzuela y col., 2007).

## 1.5 Planteamiento del Problema

El conocimiento acumulado sobre la formación de biopelículas por *A. ferrooxidans*, aún no permite definir los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo de biopelículas en esta bacteria acidófila y de manera general en ninguna bacteria biominera. Varios trabajos han permitido establecer las bases bioquímicas de la síntesis de EPS en *A. ferrooxidans* (Barreto y col., 2005) y sugerir que está podría ser regulado por el sistema de QS de tipo AI-1 (Farah y col., 2005, Rivas y col., 2005). Por su parte, el análisis bioinformático del genoma de *A. ferrooxidans* ha permitido vislumbrar que contiene varios grupos de genes involucrados en la formación de un pili de tipo IV, además genes de adherencia fuerte responsables de la secreción y ensamble del pili “bundled” (Valdés y col., 2008). Estructuras celulares de la superficie, tales como el pili son fundamentales en la formación de biopelícula de bacterias involucradas en procesos biogeoquímicos (Reguera y col., 2007). Valdés y col., (2008) proponen que el pili podría permitir la unión y colonización de *A. ferrooxidans* a varias superficies de minerales como pirita, calcopirita y azufre, también sugieren que la redundancia de los genes reguladores asociados con la biosíntesis de pili y adhesión podría permitir a la bacteria responder apropiadamente a cambios ambientales.

En este contexto, nuestro laboratorio se ha enfocado en caracterizar los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados en la formación de biopelículas en bacterias biomineras, utilizando como modelo experimental la cepa ATCC23270 de *A. ferrooxidans*. En un principio, iniciamos con el estudio del sistema de QS en *A. ferrooxidans* y su

influencia en el desarrollo de biopelículas. Luego, nuestro interés se enfocó al sistema de señalización mediante el mensajero secundario c-di-GMP y se iniciaron las investigaciones sobre la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* en la presente tesis de doctorado. Análisis bioinformáticos preliminares permitieron identificar ORFs que codifican para proteínas de la vía c-di-GMP. Guiados por estos hallazgos y motivados por la cantidad de incógnitas en torno a la regulación del desarrollo de biopelícula en *A. ferrooxidans*, y también por lo significativo que será para la industria minera comprender los mecanismos involucrados en el control y regulación de la formación de biopelículas durante los procesos de biolixiviación, nos planteamos los siguientes interrogantes ¿Tiene el sistema de QS algún papel en el control del desarrollo de biopelículas en *A. ferrooxidans*?, ¿Tiene *A. ferrooxidans* un sistema de mensajeros secundarios de tipo c-di-GMP?, ¿Son funcionales en *A. ferrooxidans* los genes relacionados con el metabolismo de c-di-GMP?, si los genes relacionados con el metabolismo de c-di-GMP son funcionales ¿cuáles codifican para PDE y cuáles para DGC?, si hay una variación en los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ¿Cuál(es) sería(n) su(s) papel(es) en la regulación y el desarrollo de biopelículas en *A. ferrooxidans*? En base a estas preguntas, el análisis bioinformático de los componentes de la vía del c-di-GMP en el genoma de *A. ferrooxidans* y los antecedentes bibliográficos formulamos la hipótesis y los objetivos presentados a continuación.

## HIPÓTESIS

La formación de biopelículas en *Acidithiobacillus ferrooxidans* podría ser regulada por el sistema QS de tipo AI-1 y por la transducción de señales mediante el mensajero secundario c-di-GMP.

### **Objetivo General**

Estudiar el posible papel del sistema de QS de tipo AI-1 y la vía c-di-GMP en la regulación del desarrollo de la biopelícula en *A. ferrooxidans*.

### ***Primer Objetivo Específico***

Caracterizar mediante análisis bioinformáticos los componentes moleculares de la vía c-di-GMP.

### ***Segundo Objetivo Específico***

Evaluar la funcionalidad de algunas de las putativas diguanilato ciclasas (DGCs) y/o fosfodiesterasas (PDEs).

### ***Tercer Objetivo Específico***

Analizar los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en células conformando biopelículas sobre perlas de azufre versus células planctónicas.

### ***Cuarto Objetivo Específico***

Analizar el efecto de AHL y análogos de AHL en la formación de biopelícula sobre pirita.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 se cultivo en medio 9K conteniendo sulfato ferroso y 0,76 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,62 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,18 mM  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 120 mM  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  a un pH 1,5 (Amaro y col., 1993), en medio DSMZ71 conteniendo 20 mM de tiosulfato a pH 4,4 (Ramírez y col., 2004) o en medio 9K conteniendo perlas de azufre a pH 2,5 (Arredondo y col., 1994). Las células se cultivaron a 30°C, con agitación rotatoria (150 rpm).

### 2.2 Herramientas bioinformáticas

Las secuencias aminoacídicas derivadas de las proteínas identificadas como actores moleculares en el metabolismo del c-di-GMP fueron usados como secuencias de búsqueda para rastrear en el genoma completo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en la base de datos TIGR ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) mediante el uso de BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul y col., 1997). Cuando un ORF se identificaba como candidato prospectivo en TIGR, su secuencia aminoacídica predicha se usó para formular una búsqueda BlastP en las bases de datos no redundantes del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Solo fueron aceptados los mejores “hits” bi-direccionales con el “e-value” más bajo ( $>10^{-5}$ ) como evidencia de ortólogos putativos. Además, los genes candidatos y sus proteínas traducidas fueron caracterizados empleando las siguientes herramientas bioinformáticas disponibles en la

web: Análisis de la similitud de la estructura primaria (Higgins y col., 1994); Predicciones de estructura secundaria PSI-PRED (Jones, 1999) y SSpred (Pollastri y col., 2002), predicciones de proteínas transmembrana TMHMM (Krogh y col., 2001); Predicción de motivos Prosite (Hofmann y col., 1999), Pfam (Bateman y col., 2002) y Tigrfam (Haft y col., 2003), predicción de los sitios de localización Psort (Nakai y col., 1999).

### **2.3 Extracción de RNA y RT-PCR**

Las células cultivadas bajo las diferentes condiciones (sustratos energéticos, carencia de fosfato) fueron cosechadas en diferentes fases de crecimiento. Se lavaron dos veces con agua ácida (pH 2,0) y dos veces con citrato de sodio 10 mM. Después se realizó una lisis alcalina seguida de la extracción del RNA total con la técnica del fenol ácido caliente (Guiliani y col., 1997). En breve, se realizaron dos extracciones con fenol ácido, dos extracciones con fenol ácido/ cloroformo y dos extracciones con cloroformo. El RNA total extraído se precipitó con 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de etanol absoluto. Luego, el RNA total obtenido se lavó con etanol al 70 % y se digirió con DNasa I. Finalmente, se chequeo en geles de agarosa la calidad del RNA purificado mediante electroforesis y se cuantificó espectrofotométricamente.

Para la síntesis del cDNA, se hibridaron 5-20 pmoles de partidores específicos R2 (Tabla 2) a 1 µg de RNA total durante 5 min a 65 °C, seguido por una incubación en hielo durante 5 min. La transcripción reversa se realizó con la enzima SuperScript III (Invitrogen) durante 60 min a 55 °C. La transcriptasa se inactivó incubando a 70 °C durante

15 min. El cDNA obtenido se empleó como templado para un PCR convencional utilizando los partidores F y R2 (Tabla 2). Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % en una solución amortiguadora TAE 0.5 X (Farah y col., 2005).

**Tabla 2.** Partidores utilizados para los experimentos de RT-PCR.

Código partidor*	Secuencia 5'-3' partidor	Amplicon (pb)		T <sub>m</sub> °C
		R1	R2	
AFE1852-F	GTCGGCATGGAGATCATTTT	180	477	58
AFE1852-R1	CGGTTTCTCAATCCCATCAT			58
AFE1852-R2	TGCTCAGTCCACTCGATCAC			62
AFE1379-F	GTAGTACGCCAACGCCAAAT	156	326	60
AFE1379-R1	TGAAACGGTTGCATCATCTC			58
AFE1379-R2	GTTTGGAGGAGTTCGGCATA			60
AFE1373-F	CAGGGCTACAGCTCCAGAAG	216	597	64
AFE1373-R1	CGAGTAATCGTTTCGCTGACA			60
AFE1373-R2	CCCGTTGGAAATAACCCTTT			58
AFE1360-F	TCTGCAACTCCTACCCCAAC	157	523	62
AFE1360-R1	GAGTTCAGCGCTTGGTTTTTC			60
AFE1360-R2	TTCCCCTTGCAACCATAGTC			60
AFE0053-F	CCCGATAGTGATGGCATCTT	180	543	60
AFE0053-R1	TGTTGACTCGCTCGACAATC			60
AFE0053-R2	GAGGTTTCATGCGGACATTTT			58

\*F, forward; R, reverse; R1, proximal del COOH; R2, distal COOH. Cada franja coloreada (blanca o gris) corresponde a un amplicon.



## 2.4 PCR en tiempo real (qPCR)

Se empleó el termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett) y el kit Light Cycler Fast Star DNA Master SYBR Green I (Roche). El fluoróforo SYBR Green se une al dsDNA y emite fluorescencia cuando es excitado. La fluorescencia se monitorea en tiempo real y es proporcional a la cantidad de producto amplificado (Bustin, 2000). Se construyeron curvas de calibración con diluciones seriadas del DNA genómico de *A. ferrooxidans*. En base a su peso molecular ( $1.97 \times 10^9$  g/mol) y sabiendo que hay una copia de cada gen, se estimó el número de copias por dilución. Para normalizar los resultados, se usó el rRNA de 16S como control endógeno (Farah, 2006). Los primers para el qPCR fueron diseñados con el “software” de Roche (Tabla 3).

## 2.5 Evaluación de la actividad fosfodiesterasa a partir de extractos totales de *A. ferrooxidans*

La actividad fosfodiesterasa se evaluó con el sustrato artificial bis(*p*-nitrofenil) fosfato (bis-*p*NPP), un sustrato similar al c-di-GMP (Bobrov y col., 2005; Ryan y col., 2006). Para esto, a 1 mg de extracto proteico total se adicionó 5 mM de bis-*p*NPP en una solución amortiguadora 50 mM Tris-HCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 8,5. La reacción se llevo a cabo durante 1 h a 37°C. Finalmente, se cuantificó la liberación de *p*-nitrophenol (*p*NP) midiendo la absorbancia a 410 nm (Bobrov y col., 2005).

Tabla 3. Partidores utilizados para los experimentos de qPCR.

Código partidor*	Secuencia 5'-3' partidor	Amplicón (pb)	Tm
Fw0053-1	TGGAGGTTCTCAGCGAAG	205	61.8
Rv0053-1	GTGAGTGGGTCGGAAAG		59.1
Fw1360-1	ATGGCACAAAGGTTGCATA	176	61.5
Rv1360-1	GGGATCTCTTCGTCTCCTAGATA		61.4
Fw1373-2	GGCTGCAGGTGCAGTGA	151	61.2
Rv1373-2	TCGATTCCAGCGGCTCA		68.2
Fw1379-1	TACGCCAACGCCAAATC	154	63.3
Rv1379-1	GTTTGGAGGAGTTCGGCATA		63.8
FW2122	TTGTCGCCCTGCGATAC	162	63.6
Rv2122	GGTGAGGAGCAGCAGATAG		60.1
Fw2309	GCGGATGAGATCGCCTA	163	62.6
Rv2309	CGGTTTCGTGACGCAATA		63.3
Fw2473	GCCGTGAGAAACACGTCTA	153	61.5
Rv2473	GTCGATACAGACTGTGAACC		57
Fw1172	GTACTGGTAGAGACAGCGA	164	55.3
Rv1172	ACAAACTGGACACCGAT		56.0

Rv, Reverse; Fw, Forward. Cada franja coloreado (blanco o gris) corresponde a un amplicon. Tm: temperatura de "melting" denaturación.

## 2.6 Clonamiento molecular de las proteínas putativas de *A. ferrooxidans* implicadas en el metabolismo de c-di-GMP

El DNA genómico de *A. ferrooxidans* se purificó de las células bacterianas, mediante el kit Wizard DNA purification system (Promega). Los genes *AFE0053*,

*AFE1360*, *AFE1373* y *AFE1379* se amplificaron mediante PCR con partidores en los cuales se introdujeron sitios de restricción para el posterior clonamiento (Tabla 4). Los fragmentos amplificados se purificaron con el kit Wizard (Promega) y fueron clonados por separado en los plasmidios pGEM-T Easy (Promega) y pBADTOPO-TA (Invitrogen) (Tabla 5). Las construcciones resultantes fueron transformadas en células quimiocompetentes de la cepa JM109 de *E. coli*. Los genes *AFE0053*, *AFE1360* y *AFE1373* se subclonaron en el vector de expresión pET-21b(+) (Novagen) (Tabla 5), las construcciones se transformaron en células quimiocompetentes de la cepa de sobre-expresión BL21(DE3) de *E. coli*. Todos los constructos fueron secuenciados (MACROGEN, Corea).

Tabla 4. Partidores utilizados para el clonamiento de los diferentes genes involucrados en el metabolismo del c-di-GMP.

Código partidor	Secuencia 5'-3' partidor*
AFE0053NH2	<u>CATATG</u> CCTTCTTCCGGCGCCAATG
AFE0053COOHs	GGATCCCTAAACCGGGACGGAAGATAG
AFE0053COOH	GGATCCAACCGGGACGGAAGATAGACC
AFE1360NH2	<u>CATATG</u> TCCATCTTCGGCTACGGCTAC
AFE1360COOHs	GGATCCTCAATGAGTTGTGATGATGATG
AFE1360COOH	GGATCCATGAGTTGTGATGATGATGAGC
AFE1373NH2	<u>CATATG</u> GGAGAGACCTTAACCTTGGAG
AFE1373COOHs	GGATCCCTAGATATTATCCCGGCTTTC
AFE1373COOH	GGATCCGATATTATCCCGGCTTTCACC
AFE1379NH2	TCTAGATTCAAAGATCCCCCATGACAGCACCAGATA
AFE1379COOHs	GGATCCCTACAGCATCATCGAAACGTG
AFE1379COOH	GGATCCCAGCATCATCGAAACGTGC

\*Se indican la presencia de sitios de corte para enzimas de restricción (nucleótidos subrayados) y sitios de iniciación (nucleótidos en itálica y negrilla) y terminación de la traducción (nucleótidos en negrilla).

**Tabla 5.** Clonamiento de los genes que codifican para las probables DGCs y/o PDEs de *A. ferrooxidans* en *E. coli*.

Gen (pb)	Actividad enzimática probable	Construcciones
AFE_0053 (2526)	DGC/PDE con dominio sensor (841 aa)	pGEMT::AFE0053NdeI <sup>s</sup> pGEMT::AFE0053NheI pET-21b::AFE0053NheI <sup>s</sup> pBADTOPO::AFE0053NdeI <sup>s</sup>
AFE_1360 (2130)	DGC/PDE con dominio sensor (709 aa)	pGEMT::AFE1360NheI pGEMT::AFE1360NdeI pET21b::AFE1360 <sup>s</sup> pBADTOPO::AFE1360 <sup>s</sup>
AFE_1373 (1998)	DGC/PDE (665 aa)	pGEMT::AFE1373 pET21b::AFE1373 <sup>s</sup>
AFE_1379	DGC/PDE con dominio sensor (1057 aa)	pGEMT::AFE1379 <sup>s</sup> pBADTOPO::AFE1379 <sup>s</sup>

<sup>s</sup>Construcciones verificadas mediante secuenciación.

## 2.7 Evaluación de la unión de Rojo de Congo a las diferentes cepas de *E. coli* BL21(DE3) y TOP10 que expresaban los genes que codifican para DGC/PDE

La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* tiene la capacidad de producir celulosa. La síntesis de celulosa es activada por el c-di-GMP (Ross y col., 1986; Simm y col., 2004). Cuando se sobre-expresan proteínas con actividad DGC en *E. coli* BL21 y se crece en placas de agar con rojo de Congo, las colonias presentan un morfotipo característico de la producción de celulosa: se observan rosadas (Simm y col., 2004).

La producción de celulosa en *E. coli* BL21(DE3) y TOP10 crecidas sobre agar y expresando los genes que codifican para DGC/PDE de *A. ferrooxidans*, se determinó cuantitativamente y cualitativamente midiendo los niveles de rojo de Congo unido.

Cada uno de los transformantes se creció en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) durante la noche a 37°C con una agitación de 150 rpm. De estos cultivos se tomaron 3 µl los cuales fueron depositados como gota en placas de LB-agar con ampicilina en presencia o no de IPTG 1 mM. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Se colectaron las células desde la “gota crecida” y se resuspendieron en 1 ml de una solución de triptona 1% con rojo de Congo 50 µg/ml. Se incubaron estas suspensiones celulares por 90 min a 37°C a 150 rpm. Luego se centrifugo y se cuantifico espectrofotométricamente a 490 nm el rojo de Congo restante en el sobrenadante, comparando con soluciones estándares. Los resultados obtenidos se normalizaron con la cantidad de proteína total de cada “pellet” celular.

## 2.8 Purificación del c-di-GMP en *A. ferrooxidans*

Para purificar c-di-GMP desde células de *A. ferrooxidans*, se realizaron extracciones orgánicas en base a lo descrito en Hisert y col. (2005). Las bacterias se cosecharon desde cultivos con distintas fuentes energéticas durante la fase exponencial tardía. Estas fueron lavadas dos veces con 1 ml de agua ácida pH 1,5 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y dos veces con citrato de sodio (pH 7,0). Después, las bacterias fueron resuspendidas en 1 ml de 50 mM Tris, pH 8,5 y fueron sonicadas sobre hielo. A 1 volumen del extracto proteico total se le adicionó 1 volumen de cloroformo, 4 volúmenes de metanol y 3 volúmenes de agua nanopura. El conjunto se mezcló agitando con vortex y se centrifugó por 15 min a 13000 rpm.

Posteriormente, se recuperó la fase acuosa enriquecida en nucleótidos. Los extractos de nucleótidos fueron evaporados bajo vacío y almacenados a -80°C.

Para la preparación de extractos de nucleótidos desde células de *A. ferrooxidans* conformando biopelículas, sea sobre perlas de azufre elemental, granos de pirita o concentrado de cobre, se procedió a despegar las células de *A. ferrooxidans* desde el sustrato sólido de la siguiente manera. Primero, se vertió el medio líquido con las células planctónicas en un matraz limpio y se lavó por tres veces con medio M9K el sustrato sólido para descartar las células planctónicas remanentes. Luego, al sustrato sólido se colocó en un tubo de centrifuga y se le adicionó medio M9K con Triton X-100 al 0.05 % y se agitó con vortex durante 5 min, después se recuperó el sobrenadante y se centrifugaron las células liberadas. El "pellet" obtenido se resuspendió en 1 ml de 50 mM Tris, pH 8,5 y fueron sonicadas sobre hielo. Se cuantificó la concentración de proteínas en los extractos proteicos totales y después se procedió a preparar los extractos de nucleótidos como se indico previamente.

## 2.9 Espectrometría de masas

Estos experimentos se realizaron según lo descrito por Simm y col. (2004) y Christen y col. (2005). El estándar de c-di-GMP fue sintetizado químicamente y gentilmente donado por el Profesor Nicolas Amiot de la Universidad de Basel. Este estándar se preparó a una concentración de 0,175 mg/ml en acetonitrilo 80% y acetato de amonio 20 mM. Los extractos nucleotídicos de *A. ferrooxidans* y *E. coli* se diluyeron 1:10

en acetonitrilo 80% y acetato de amonio 20 mM. Se inyectaron en forma directa y por separado 100 µl de estándar y 100 µl de muestras utilizando una bomba de jeringa (Cole-Parmer, IL-USA) a un flujo de 3 µl/min.

Para la cuantificación de los niveles del c-di-GMP en los extractos nucleotídicos de *A. ferrooxidans*, se examinaron solamente 20 µl de las muestras por medio de separación HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies) acoplada a un espectrómetro de masas. Se utilizó una columna C18 de 150×1.0 mm, 4 µm y 90 Å (Jupiter-Proteo, Phenomenex Inc., CA-USA). Se conectó en forma directa el sistema HPLC con el espectrómetro (sin detección UV y sin split de flujo). El sistema HPLC se controló a través del programa ChemStation versión A.10.02 (Agilent 1100, Agilent Technologies).

La separación HPLC con la fase A [tributilamina 10 mM, ácido acético 15 mM y metanol 3% v/v (agua)] se realizó a un flujo de 0,1 ml/min, utilizando un gradiente de metanol (Tabla 6) (Waters y col., 2008).

**Tabla 6.** Gradiente de metanol para la separación HPLC del c-di-GMP

T (min)	Metanol (%)	Fase A (%)
5	0	100
10	20	80
15	20	80
30	65	35
33	95	5
37	95	5
38	0	100
45	0	100

### 2.9.1 Obtención de espectrogramas

Los espectrogramas se obtuvieron en un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica Esquire 4000 ESI-IT (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). El espectrómetro de masas se controló a través del programa esquireControl 5.2 (Bruker Daltonik GMBH, Alemania).

Los parámetros utilizados en la adquisición de los cromatogramas y espectrogramas se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Parámetros para la adquisición de los espectrogramas para el análisis del c-di-GMP.

Parámetros de ionización		
Temperatura de nebulización	300	°C
Presión de nebulización	25	psi
Flujo de gas nebulizador	6	L/min
Parámetros de operación de espectrómetro de masas		
Polaridad de adquisición	negativa	
Voltaje de ionización	4500	V
Offset de placa terminal (end plate offset)	-500	V
Skimmer 1	-35.3	V
Skimmer 2	-6.0	V
Offset de salida de capilar (capillary exit offset)	-73.4	V
Salida de capilar (capillary exit)	-108.7	V
Diferencia de octupolos (octopole delta)	-2.4	V
Trap drive	56.5	
Voltaje de lente 1	5.0	V
Voltaje de lente 2	60.0	V



Parámetros de optimización de espectrómetro de masas		
Ajuste automático de respuesta (Smart parameter setting)	activo	
Masa objetivo	689	m/z
Estabilidad de compuesto	50	%
Trap drive level	100	%
Optimización	normal	
Parámetros de operación de trampa de iones		
Control de carga de iones (ICC target)	7000	
Tiempo máximo de acumulación	400	ms
Promedios MS	5	espectros
Barrido de señales, partida	20	m/z
Barrido de señales, término	1000	m/z
Parámetros de fragmentación		
Umbral AutoMS(2)	50	u.a.
Número de iones precursores AutoMS(2)	5	
Amplitud de fragmentación	1.0	V
Promedios MS(n)	5	espectros
Ancho de aislamiento MS(n)	4	m/z
SmartFrag	30-200	%
Barrido de señales, partida	687	m/z
Barrido de señales, término	691	m/z

## 2.9.2 Análisis de cromatogramas

Para el análisis de los cromatogramas se utilizó el programa DataAnalysis versión 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la generación de los cromatogramas del ión extraído (EIC) correspondiente a la razón masa/carga  $m/z$  689 se utilizó una precisión de extracción de  $\pm 0.5$   $m/z$ , filtro de selección "all ms" y para la remoción de ruido de fondo se

utilizó modo “spectral”. Para la generación de los cromatogramas EIC para las transiciones  $m/z$  689  $\rightarrow$  344 y  $m/z$  689  $\rightarrow$  538 se utilizó una precisión de extracción de  $\pm 0.5$   $m/z$  y filtro de selección “MSn”. Las integraciones de los picos cromatográficos se realizó en forma manual y la línea base se trazó entre los valles de cada pico.

Para las diferentes muestras examinadas se obtuvieron los cromatogramas de corriente total de iones TIC (cromatograma proporcionado por el espectrómetro de masas), a partir de los cuales se generaron los cromatogramas específicos para la señal  $m/z$  689 (cromatograma EIC 689, destacado en azul). Adicionalmente, en función de los fragmentos característicos observados para el estándar de c-di-GMP, se generaron los cromatogramas específicos para la transición  $m/z$  689  $\rightarrow$  344 (cromatograma EIC 344-MS2 689, indicado en rojo) y para  $m/z$  689  $\rightarrow$  538 (cromatograma EIC 538-MS2 689, indicado en verde) con el fin de discriminar entre las diferentes señales  $m/z$  689. Se evaluaron los picos cromatográficos que cumplían con la presencia de ambas fragmentaciones.

La normalización de la concentración del c-di-GMP en los extractos de nucleótidos de *A. ferrooxidans* se realizó teniendo en cuenta la concentración de proteínas en el extracto total a partir del cual se preparó dicho extracto de nucleótidos.

## 2.10 Ensayo de unión de células de *A. ferrooxidans* a pirita

Este ensayo indirecto está basado en la medición de la reducción del número inicial de células planctónicas en la solución debido a la unión de la bacteria a la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) (Gehrke y col., 1998; Harneit y col., 2005). La pirita (Suor mina en Baia Mare, Rumania)

triturada fue separada a un grano de 50-100  $\mu\text{m}$  (Test sieves, Retsch, Alemania). Para remover el hierro férrico, la  $\text{FeS}_2$  fue hervida con agitación durante 1 h en una solución de HCl 6 N. Después, el HCl fue removido con lavados extensivos con agua destilada. Seguidamente, los compuestos azufrados fueron extraídos de la  $\text{FeS}_2$  mediante dos lavados con acetona. Finalmente, alícuotas de  $\text{FeS}_2$  fueron colocadas bajo vacío y gasificadas con nitrógeno y esterilizadas a  $115^\circ\text{C}$  por 48 h (Schippers y Sand, 1999). Para el ensayo de unión  $5 \times 10^9$  células fueron incubadas en 50 ml de una solución mineral salina con 20%  $\text{FeS}_2$  (w/v) en matraces de 100 ml. Las células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en medio  $\text{FeSO}_4$  fueron cosechadas en la fase de crecimiento exponencial tardía. La cosecha se realizó mediante filtración (Hemoflow F60S, Fresenius, Alemania) o centrifugación por 20 min a  $6000 \times g$ , a  $10^\circ\text{C}$  y las células obtenidas fueron resuspendidas en solución mineral salina. Las bacterias cosechadas por centrifugación fueron suplementadas con 0,2 g/l hierro férrico y dejadas durante la noche a  $17^\circ\text{C}$  para fomentar la síntesis de sus SPEs. Luego, se incubaron con AHLs o análogos de AHLs durante una hora a  $30^\circ\text{C}$ , a 180 rpm. A continuación, 10 g de  $\text{FeS}_2$  fueron adicionados a cada matraz los cuales se agitaron a 120 rpm y a temperatura ambiente durante 8 h. Muestras de sobrenadante de los cultivos fueron tomadas a intervalos de tiempo específicos y el conteo celular fue realizado usando una cámara de conteo "Thoma chamber" (profundidad 0,02 mm, área del cuadrado mas pequeño  $0,0025 \text{ mm}^2$ ). La visualización fue realizada con un microscopio de luz (Carl Zeiss, West Germany) en el modo contraste de fase con una magnificación de 400 veces.

Con el propósito de validar la unión de la bacteria a los granos de pirita durante el ensayo de unión, las células unidas a la pirita después del ensayo fueron teñidas con DAPI y visualizadas con un microscopio de fluorescencia. Al final de cada ensayo de unión

varios granos de pirita fueron transferidos a un tubo de microcentrifuga donde se realizó la tinción. La suspensión celular se removió y la pirita fue lavada con agua ácida (pH 1 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Después, la pirita se lavo tres veces con PBS. Luego, se realizó la tinción con 1 ml de solución DAPI. Esta solución se removió mediante lavados con PBS. En seguida, la pirita fue transferida a un filtro (Nucleopore, Track-Etch Membrane, 25 mm, 2 µm, Whatman), el cual se colocó en un portaobjeto y se le adicionó "Fluoroprep" (BioMerieux, France) y finalmente un cubreobjeto encima. Se dejó secar el Fluoroprep a 4°C por 24 h, posteriormente el filtro se almaceno a -20°C, hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia (Laborlux S, Leitz).

## 2.11 Análisis de la biopelícula de *A. ferrooxidans* sobre pirita

Como sustrato se emplearon láminas de pirita (Navajo, España) perfiladas grado museo y con dimensiones de 10 mm x 10 mm x 1 mm. Las láminas se lavaron con HCl 6 M a ebullición durante 30 min para remover los iones ferrosos. Seguidamente fueron lavadas con acetona para remover compuestos azufrados (Harneit y col., 2006). A continuación las láminas fueron sumergidas a 30°C, a 150 rpm, en una suspensión bacteriana con 10<sup>7</sup> células/ml en una solución mineral salina (volumen final de 50 ml). Las láminas fueron retiradas en diferentes tiempos para analizar la formación de la biopelícula. Posterior a la extracción, las láminas fueron teñidas por 10 min con 0,01% (p/v) DAPI. Para el subsecuente análisis, las láminas fueron pegadas al portaobjeto. La observación de las láminas se realizó mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) y microscopia de epifluorescencia (EFM). El microscopio de fuerza atómica NanoWizardII (JPK

Instruments, Alemania) y el microscopio de epifluorescencia (Axio-Imager Alm, Zeiss, Alemania) con un objetivo de 100X sumergible en agua (Achromplan) sin usar cubreobjetos fueron combinados usando la estación de trabajo BioMaterial (JPK Instruments) (Mangold y col., 2008). Gracias a la plataforma de intercambio rápido para microscopio “shuttle stage” de la estación de trabajo BioMaterial, la muestra fijada a un portaobjeto de vidrio puede ser transferido entre el AFM y el EFM, permitiendo así tener el mismo campo de visualización en ambos microscopios con una desviación entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ . La observación en el AFM se efectuó en el modo de contacto utilizando un cantiléver de silicona CSC37 ULTRASHARP, 21-41 kHz, (0.30-0.65 N/m), un radio de la curvatura de la punta inferior a 10.0 nm, y una altura de la punta de 12-15  $\mu\text{m}$  (Mikromasch, Estonia).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización de una vía de señalización mediante el mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP) en la bacteria extremófila *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Nuestro laboratorio está dedicado a dilucidar los mecanismos involucrados en el control y la regulación de la formación de biopelículas durante los procesos de biolixiviación.

Se ha destacado la importancia del c-di-GMP en la regulación de la transición del estilo de vida planctónico al estilo de vida en biopelículas bacterianas, a través del control de la producción de exopolisacáridos y la inhibición de la motilidad mediada por pili y flagelo (García y col., 2004; Simm y col., 2004; Tischler y Camilli, 2004; Bobrov y col., 2005; Hickman y col., 2005; Thormann y col., 2006).

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 no tiene flagelo, pero sí posee fimbria y pili, permitiéndole el movimiento de tipo “twitching” de importancia en la colonización del mineral (Valenzuela y col., 2007; Valdés y col., 2008). Este fue el primer antecedente que nos llevó a indagar si existía la vía de señalización del c-di-GMP en *A. ferrooxidans*.

### 3.1.1 Identificación y caracterización *in silico* de los componentes moleculares de la vía C-di-GMP

Iniciamos este estudio con la búsqueda bioinformática de los principales componentes de la vía de señalización c-di-GMP en *A. ferrooxidans*. El análisis de la secuencia genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 nos permitió identificar 5 marcos de lectura abierta (ORFs) que codifican para proteínas probables del metabolismo del c-di-GMP, sean diguanilato ciclasas (DGCs) o fosfodiesterasas (PDEs) (Tabla 8). Cuatro de ellas codifican para proteínas con dominios GGDEF y EAL (AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379), una para una proteína con un dominio EAL (AFE1852). Además, se identificaron tres proteínas con dominios HD (AFE2122, AFE2309, AFE2473). También, se identificaron 2 ORFs que codifican para proteínas de ensamble de pili tipo IV con el dominio PilZ (AFE1172 y AFE1374). Estas últimas proteínas podrían ser efectoras de la vía c-di-GMP y regular la motilidad tipo “twitching” en *A. ferrooxidans* (Tabla 8). Utilizando como entrada de búsqueda en las bases de datos la secuencia proteica de la proteína FleQ de *P. aeruginosa*, se identificaron 13 ORFs que codificarían para reguladores transcripcionales con dominio AAA $\sigma$ <sup>54</sup>. Estos aunque no poseen el dominio FleQ podrían ser efectores de la vía c-di-GMP” específicos de *A. ferrooxidans* (ANEXO 3).

Aparte de los dominios GGDEF y EAL, las probables DGCs y PDEs también poseen dominios involucrados en la transducción de señales incluyendo a PAS (AFE1360 y AFE1379) y GAF (AFE0053 y AFE1379) (Figura 2). Estos rasgos estructurales sugieren

que todas estas probables proteínas posiblemente están involucradas en la transducción de señales y participan en la síntesis e hidrólisis de c-di-GMP después de la recepción de señales que estimulan la actividad enzimática.

Un alineamiento múltiple de las secuencias de las probables proteínas DGCs y PDEs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, permitió identificar la presencia de los motivos conservados GGDEF y EAL en las cuatro proteínas con dominios GGDEF/EAL. Se identificaron también, sitios I implicados en el control alostérico de los niveles del c-di-GMP en estas cuatro proteínas (Figura 3). Es importante destacar, que en la proteína AFE1852 que posee solamente el dominio EAL, el motivo EAL es degenerado, siendo la alanina reemplazada por una leucina (Figura 3).

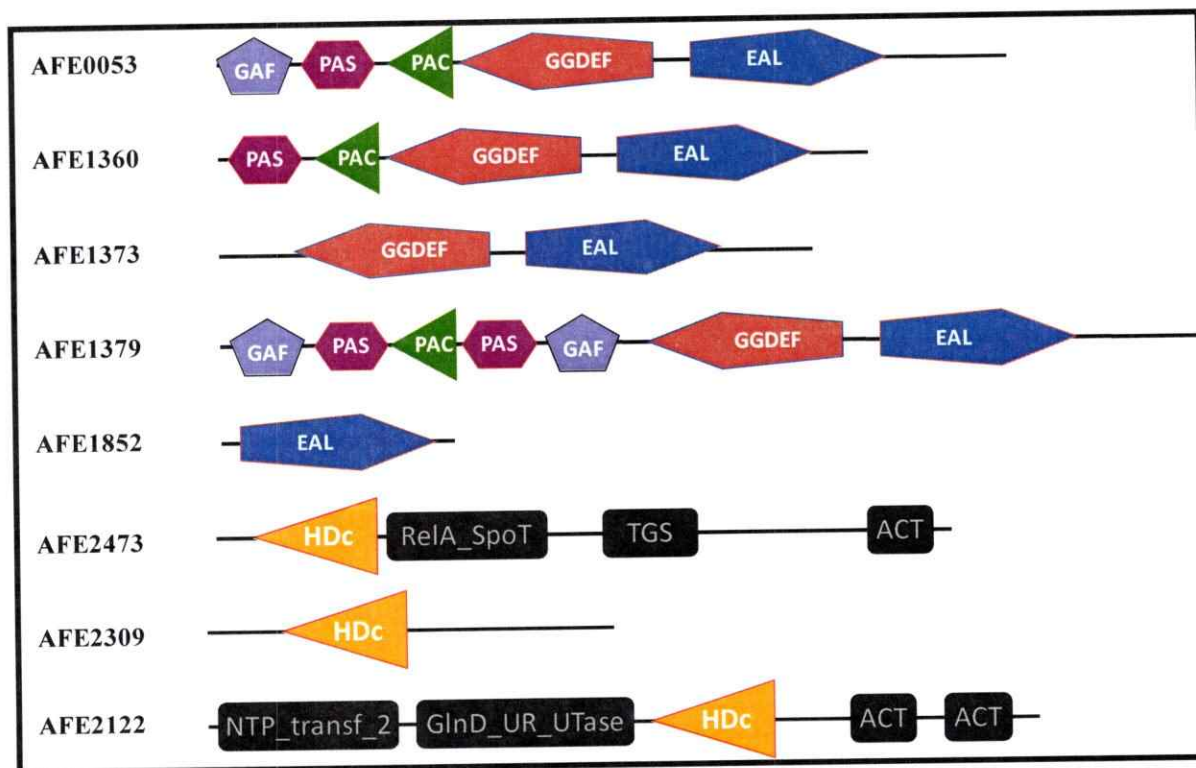
Por otro lado, el análisis de los contextos génicos de los distintos ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* reveló una gran diversidad de contextos génicos, por lo cual no se puede inferir posibles mecanismos regulatorios de expresión o funciones biológicas reguladas por estas proteínas implicadas en el metabolismo del c-di-GMP (Figura 4).



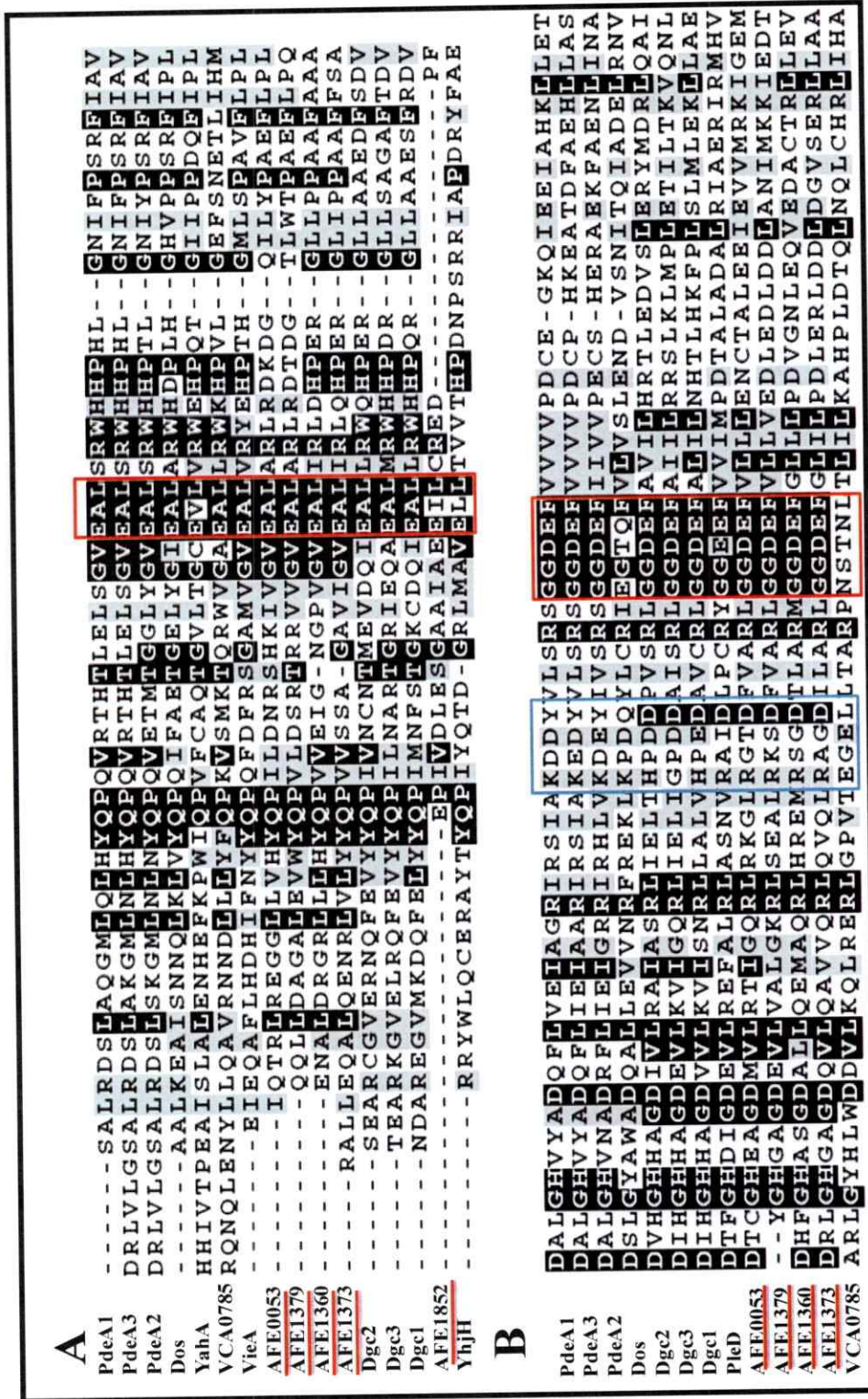
Tabla 8. Marcos de lectura abiertos predichos que codifican posibles proteínas implicadas en la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

	Probable actividad enzimática	Mejor hit de Blast	% Identidad	Dominios (e-value)
AFE0053	Diguanylato ciclasa /fosfodiesterasa con dominio sensor	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	30 %	GGDEF (4.4e <sup>-45</sup> ), EAL (7.5e <sup>-52</sup> ), GAF (0.0012), PAS (0.0001)
AFE1360	Diguanylato ciclasa /fosfodiesterasa con dominio sensor	<i>Thiomonas intermedia</i> K12	50 %	GGDEF (3.5e <sup>-45</sup> ), EAL (1.9e <sup>-59</sup> ), PAS (5.2e <sup>-19</sup> )
AFE1373	Diguanylato ciclasa /fosfodiesterasa	<i>Thiomonas intermedia</i> K12	44 %	GGDEF (5.4e <sup>-46</sup> ), EAL (1.2e <sup>-64</sup> )
AFE1379	Diguanylato ciclasa /fosfodiesterasa con dominio sensor	<i>Thiomonas intermedia</i> K12	42 %	GGDEF (6.8e <sup>-46</sup> ), EAL (3.2e <sup>-45</sup> ), PAS (1.2e <sup>-11</sup> ), PAS-4 (7.1e <sup>-7</sup> )
AFE1852	Fosfodiesterasa	<i>Frankia</i> sp. Ccl3	32 %	EAL (3.4e <sup>-26</sup> )
AFE1172	Ensamble del pili tipo IV	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> MAFF 311018	43 %	PilZ (1.2e <sup>-10</sup> )
AFE1374	Ensamble del pili tipo IV	<i>Bordetella parapertussis</i> 12822	27 %	PilZ (4.6e <sup>-06</sup> )
AFE2122	Fosfohidrolasa dependiente de metal	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. HL-EbGR7	41 %	HD (8.1e <sup>-13</sup> )
AFE2309	Fosfohidrolasa	<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3	62 %	HD (4.3e <sup>-16</sup> )
AFE2473	Fosfohidrolasa dependiente de metal	<i>Methylovorus</i> sp. SIP3-4	54 %	HD (4.9e <sup>-16</sup> )

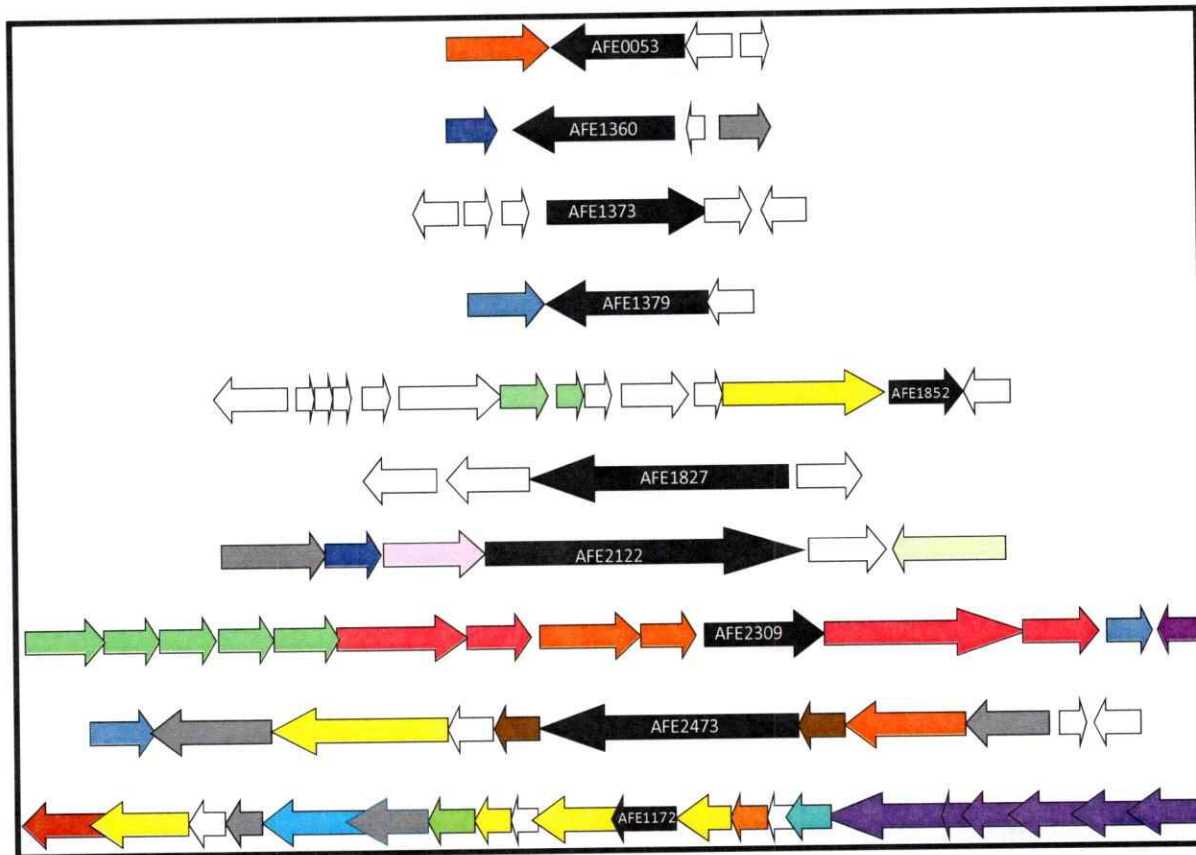
ORFs codificando para proteínas con dominios: GGDEF/EAL (filas sombreadas ■), EAL (fila sombreada □), PilZ (filas blancas □), HD (filas sombreadas ■).



**Figura 2.** Arquitectura de las probables proteínas implicadas en el metabolismo del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Rosado, dominio característico de DGC; Azul y Amarillo, dominios característicos de PDE; Lila, Violeta y Verde, diferentes dominios sensores; Negro, otros dominios funcionales independientes del metabolismo del c-di-GMP.



**Figura 3.** Alineamiento múltiple de las secuencias de las probables proteínas DGCs y PDEs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los dominios EAL y GGDEF de *A. ferrooxidans* (AFE) fueron alineados con dominios EAL (A) y GGDEF (B) de otras bacterias. Los motivos conservados EAL y GGDEF están señalados por un rectángulo rojo (A y B). El sitio I de inhibición por control alostérico de la actividad DGC por unión del c-di-GMP al motivo RXXD está señalado por un rectángulo azul (B). Sombra ■, identidad; Sombra ▨, similitud. Las probables proteínas DGCs y PDEs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 están subrayadas con rojo. PdeA1, PdeA2, PdeA3, Dgc1, Dgc2 y Dgc3 de *Acetobacter xylinus*. YahA y Dos de *E. coli*. VieA y VCA0785 de *V. cholerae*. YjhH, *S. typhimurium*. PleD, *C. crescentus*.



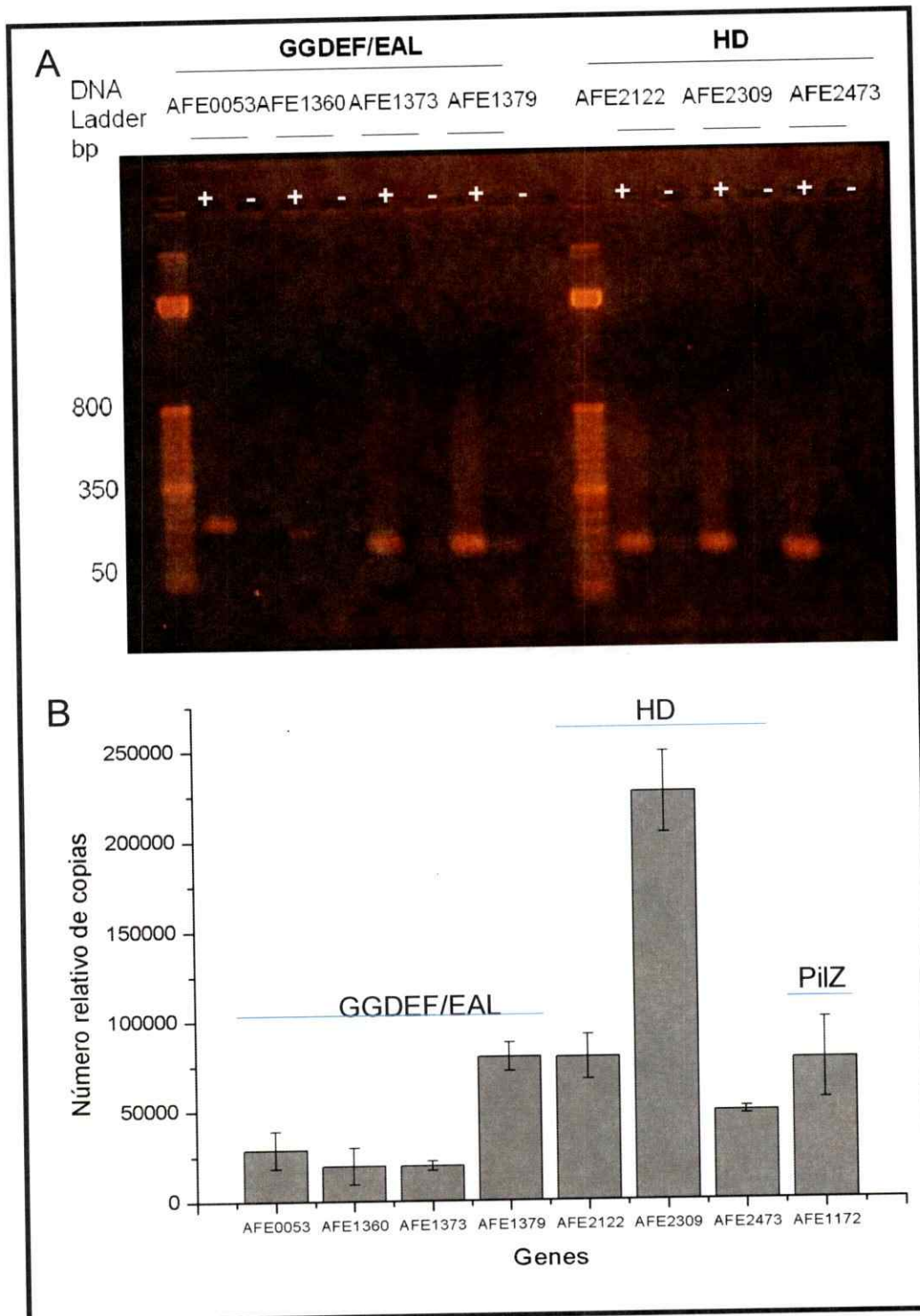
**Figura 4.** Contextos genéticos de los genes involucrados en la vía c-di-GMP de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. ◀, genes de la vía c-di-GMP. ◀, genes involucrados en procesos de conjugación y transferencia de genes, miembros de la familia TraG/TraD. ◀, genes involucrados en la biosíntesis de amino ácidos. ◀, genes involucrados en el tráfico y secreción de proteínas y péptidos. ◀, genes involucrados en la replicación, recombinación y reparación del DNA. ◀, genes que codifican para proteínas hipotéticas conservadas. ◀, genes involucrados en la biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores. ◀, elementos móviles y extracromosomales, funciones de transposón. ◀, genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos. ◀, genes involucrados en cubierta celular, estructuras de superficie p. ejemplo fimbria. ◀, genes involucrados en el metabolismo de deoxiribonucleótidos. ◀, genes involucrados en funciones generales.

Finalmente, con el objeto de predecir la localización subcelular de las proteínas se empleo el algoritmo SubCell 1.0 Server (Technical University of Denmark). La mayoría de las proteínas involucradas en la vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans* parecen ser citoplasmáticas. Ninguna de las proteínas presenta péptido señal. Lo anterior sugiere que los procesos relacionados con la vía de señalización mediante el c-di-GMP en *A. ferrooxidans* se presentan en el citoplasma. En otras bacterias, las proteínas involucradas

en el metabolismo del c-di-GMP son tanto citoplasmáticas así como asociadas a la membrana (Galperin y col., 2001; Romling y col., 2005)

### 3.1.2 Análisis de la transcripción de los *ORFs* involucrados en la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans*

Para este análisis el RNA fue extraído a partir de células crecidas en tiosulfato durante la fase exponencial tardía del crecimiento. Los análisis mediante RT-PCR indicaron que cuatro de los probables genes codificantes para proteínas con dominios GGDEF y EAL se expresan en tiosulfato (Figura 5A). El quinto (AFE1852) no fue posible amplificarlo tanto desde el DNA genómico como desde cDNA, aunque se probaron 6 pares de partidores diferentes. Además, se demostró la expresión génica de tres PDEs con el dominio HD y del gen que codifica para la proteína con el dominio PilZ (Figura 5A). Por otro lado, ensayos de qPCR permitieron determinar el número relativo de copias de mRNA de cada uno de estos genes (Figura 5B). De los genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF y EAL, el gen *AFE1379* presentó el mayor número de copias de mRNA ( $79.600 \pm 8.061$ ), mientras que *AFE1360* y *AFE1373* presentaron el menor número de copias de mRNA ( $19.500 \pm 10.040$  y  $19.700 \pm 2.545$ , respectivamente). De los genes que codifican para proteínas con el dominio HD, se evidenció que *AFE2309* presenta un mayor número de copias de mRNA ( $226.000 \pm 22.627,4$ ) mientras que *AFE2473* presentó el menor número de copias de mRNA ( $48.850 \pm 2.050$ ). Las diferencias en los niveles de mRNA de cada uno de los ORFs codificando para proteínas con dominios GGDEF/EAL sugieren actividades biológicas diferentes en el momento de la curva de crecimiento en que



**Figura 5.** Análisis transcripcional de los *ORFs* que codifican para proteínas con dominios involucrados en la vía c-di-GMP de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El RNA empleado para este análisis fue extraído de células crecidas en tiosulfato durante la fase exponencial tardía del crecimiento. **A.** RT-PCR; (+) mas transcriptasa reversa, (-) sin transcriptasa reversa. **B.** qRT-PCR. Se realizaron 3 replicas biológicas, cada gen se evaluó por duplicado en cada replica, para un total de 6 valores que representan el número de copias de mRNA. La barra representa la desviación estándar.

se midió. Sin embargo, la variación en el número de moléculas de mRNA que codifican para las DGCs y PDEs de *A. ferrooxidans*, podría estar asociado con su naturaleza monocistrónica o policistrónica y/o algunos mecanismos regulatorios en su transcripción. Por otro lado, la traducción a proteína podría ser regulada por proteínas represoras que inhiban la unión del ribosoma al codón de iniciación así como la accesibilidad al codón de iniciación en un mRNA policistrónico (Lewin, 2004). Por eso, estos resultados tendrán que ser correlacionados por medición de los niveles de proteínas para concluir de manera más segura.

### **3.1.3 Análisis del efecto de la carencia de fosfato sobre la transcripción de los *ORFs* involucrados en la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans***

La carencia de fosfato ha sido asociada con el desarrollo de biopelícula. Con el fin de analizar si la carencia de fosfato pudiese tener un efecto en la transcripción de los ORFs que codifican para probables DGCs y PDEs en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y así correlacionar la función de estos ORFs con el desarrollo de biopelícula, se evaluarón dos concentraciones de fosfato en el medio de cultivo, 0.22 mM y 22 mM. Se analizó mediante PCR en tiempo real la expresión de los ORFs y no se observó ninguna variación en los niveles de expresión en la condición de 0.22 mM de fosfato (Tabla 9).

**Tabla 9.** Análisis mediante qPCR de la transcripción de genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF/EAL (AFE0053, AFE1360, AFE1373, AFE1379) y HD (AFE2122, AFE2309, AFE2473) en condiciones limitantes de Pi.

Gen	Condición control [22 mM Pi]		Condición limitante [0,22 mM Pi]		Proporción de inducción 0,22 mM/22 mM Pi
	CT	Número relativo de copias	CT	Número relativo de copias	
AFE0053	15,88 ± 1,53	2,88 x10 <sup>4</sup> ± 9,26 x10 <sup>3</sup>	15,37 ± 0,7	2,87 x10 <sup>4</sup> ± 1,03 x10 <sup>4</sup>	1,3
AFE1360	23,10 ± 1,55	2,13 x10 <sup>4</sup> ± 1,14 x10 <sup>4</sup>	23,33 ± 1,0	1,95 x10 <sup>4</sup> ± 1,00 x10 <sup>4</sup>	0,8
AFE1373	22,55 ± 1,65	1,01 x10 <sup>4</sup> ± 1,46 x10 <sup>2</sup>	23,22 ± 1,1	1,97 x10 <sup>4</sup> ± 2,55 x10 <sup>3</sup>	0,5
AFE1379	18,34 ± 0,49	7,44 x10 <sup>4</sup> ± 4,81 x10 <sup>3</sup>	18,69 ± 0,9	7,96 x10 <sup>4</sup> ± 8,06 x10 <sup>3</sup>	0,9
AFE2122	22,35 ± 2,58	8,51 x10 <sup>4</sup> ± 5,73 x10 <sup>3</sup>	21,32 ± 1,0	7,93 x10 <sup>4</sup> ± 1,25 x10 <sup>4</sup>	1,1
AFE2309	20,28 ± 1,08	2,76 x10 <sup>5</sup> ± 9,90 x10 <sup>3</sup>	19,76 ± 0,7	2,26 x10 <sup>5</sup> ± 2,26 x10 <sup>4</sup>	1,3
AFE2473	21,49 ± 2,62	5,06 x10 <sup>4</sup> ± 2,55 x10 <sup>3</sup>	20,79 ± 1,5	4,89 x10 <sup>4</sup> ± 2,05 x10 <sup>3</sup>	1,0
16S rRNA	6,27 ± 1,32	4,14 x10 <sup>8</sup> ± 1,57 x10 <sup>8</sup>	6,35 ± 0,9	9,95 x10 <sup>8</sup> ± 4,60 x10 <sup>8</sup>	1,0

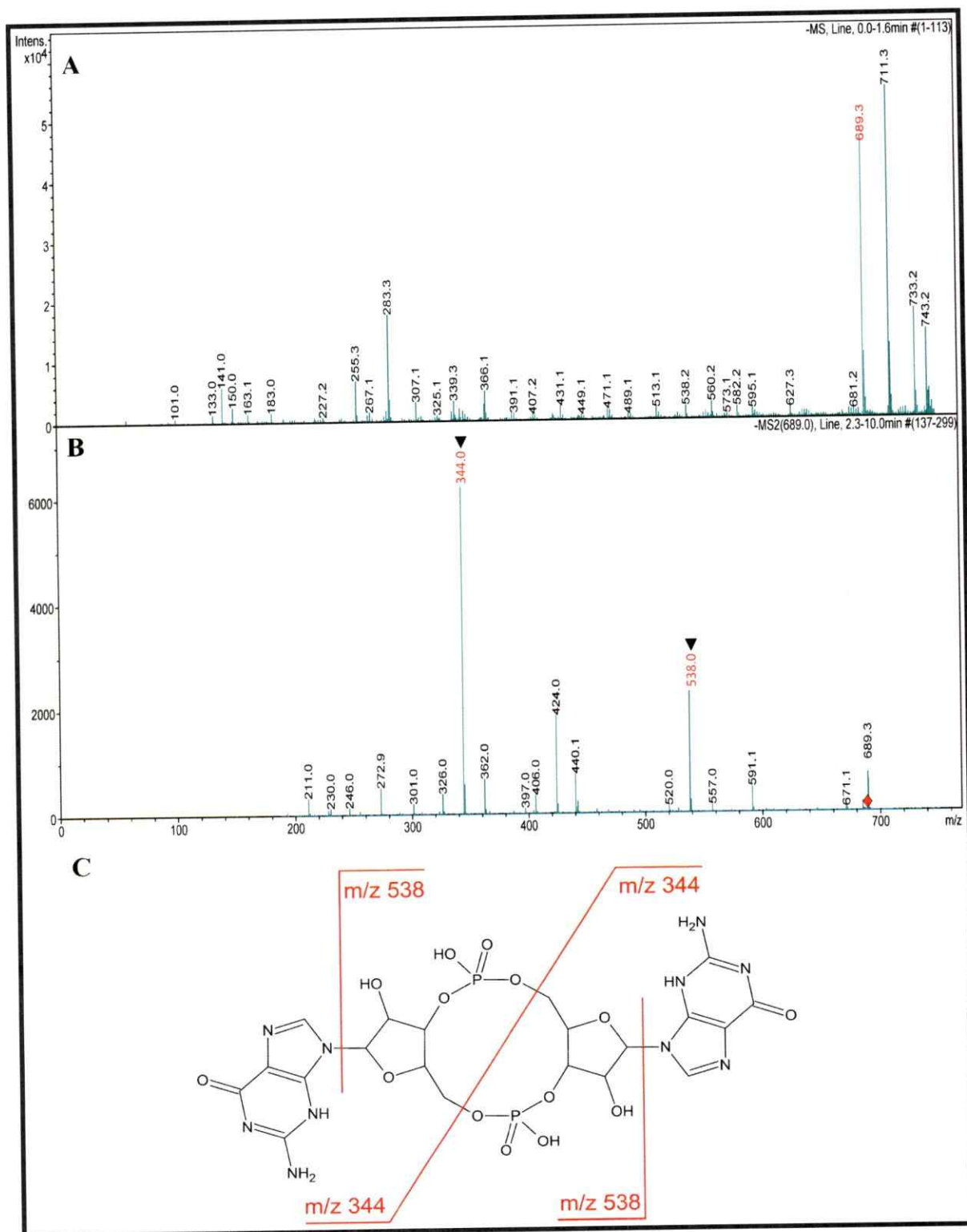
Las extracciones de RNA se realizaron durante la fase exponencial tardía desde células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas con 22 mM Pi o 0,22 mM. Este experimento corresponde a 3 replicas biológicas. La proporción de inducción fue determinada por comparación de los niveles relativos de los transcritos de cDNA de *A. ferrooxidans* crecido con un menor concentración de Pi (0,22 mM) versus lo obtenido en las células control crecidas con 22 mM de Pi y normalizada por la expresión del 16S rRNA en cada caso. CT: ciclo del PCR en el cual la fluorescencia primero aumento sobre el nivel basal de fluorescencia.



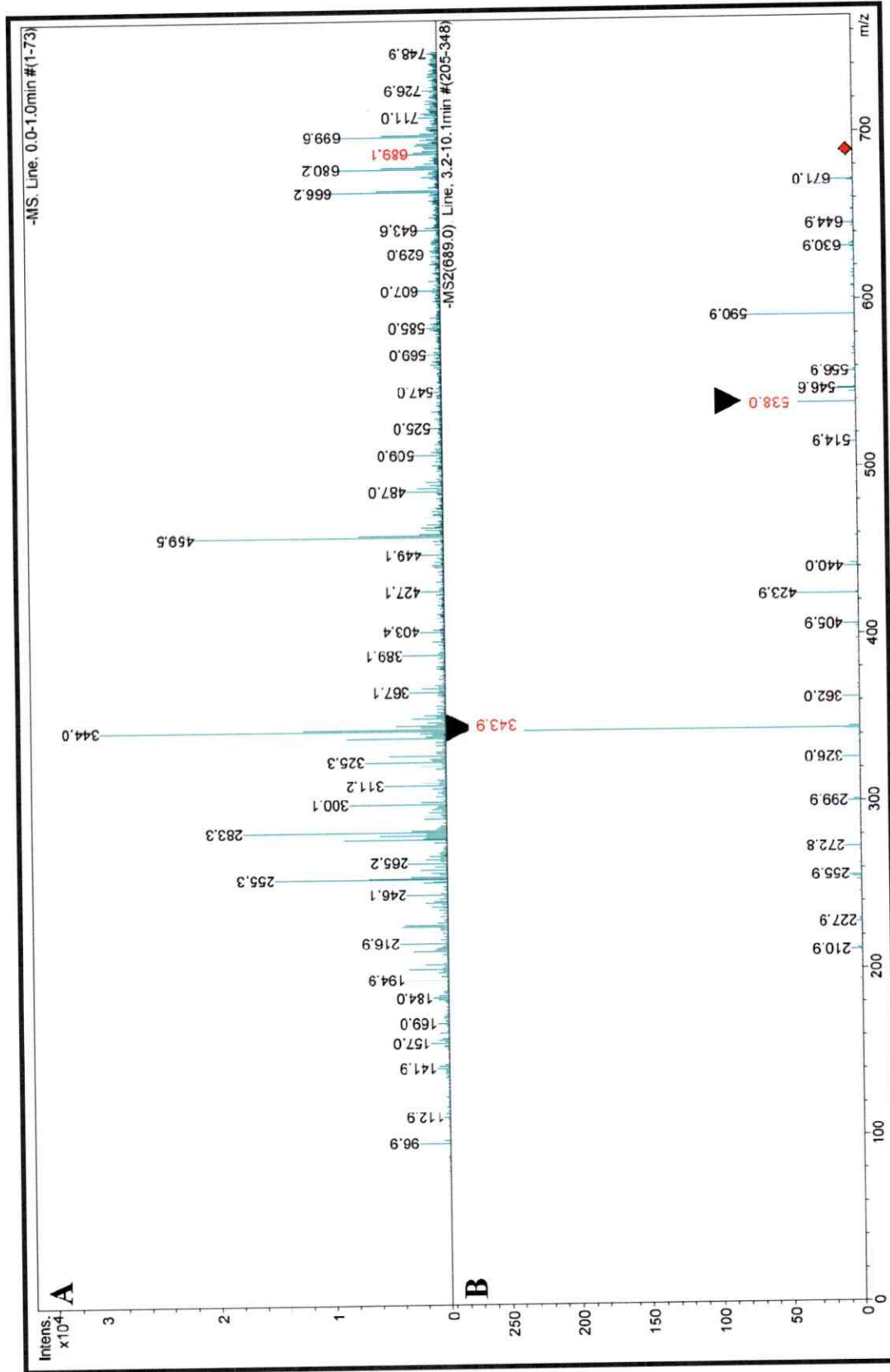
### 3.1.4 Caracterización de la presencia del mensajero secundario c-di-GMP en la bacteria extremófila *A. ferrooxidans*

Se evaluó la presencia del c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* crecidas con diferentes fuentes energéticas. Esta determinación se realizó mediante espectrometría de masas (Simm *et al.*, 2004; Christen *et al.*, 2005). Para esto se prepararon extractos de nucleótidos a partir de células crecidas en diferentes fuentes energéticas: hierro, tiosulfato y azufre. Estos extractos nucleotídicos se inyectaron directamente en un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica y se buscó la señal  $m/z$  689, característica del c-di-GMP. Como estándar se empleó c-di-GMP sintetizado químicamente. En los espectrogramas tanto del estándar como de los extractos, se examinó la fragmentación de la señal  $m/z$  689 y buscando se obtuvieron señales específicas  $m/z$  344 y  $m/z$  538 (Figura 6B, 8C). La fragmentación de  $m/z$  689 presente en el extracto nucleotídico de *A. ferrooxidans* obtenido a partir de células crecidas en tiosulfato (Figura 7B), resultó prácticamente idéntica a la fragmentación del estándar (Figura 6B). El resultado fue similar para el extracto nucleotídico de *A. ferrooxidans* crecidos en hierro, aunque fue más difícil obtener la señal  $m/z$  689 aislada y que los picos MS/MS de las señales  $m/z$  344 y  $m/z$  538 eran mucho menos intensos (ANEXO 4).

Todos estos resultados revelan que *A. ferrooxidans* sintetiza c-di-GMP. Y sugieren que una o varias de las posibles DGCs (AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379) debería(n) ser responsable(s) de la síntesis de c-di-GMP en *A. ferrooxidans*.

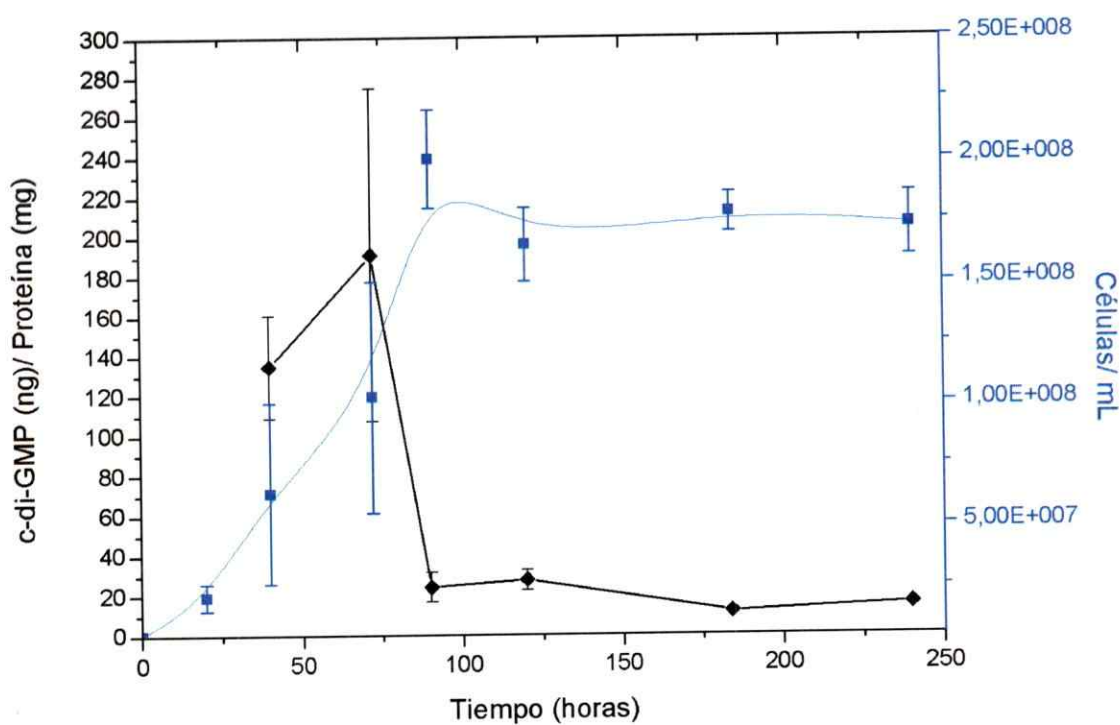


**Figura 6.** Análisis mediante espectrometría de masas del c-di-GMP sintetizado químicamente. **A.** Espectrograma MS. La señal intensa  $m/z$  689 (rojo) corresponde a una masa nominal de 690 g/mol ( $[M-H]^-$ ), mientras que la señal intensa  $m/z$  711 corresponde a la forma sódica del compuesto ( $[M-2H+Na]^-$ ). **B.** Espectrograma MS/MS. La fragmentación de la señal  $m/z$  689 generan las señales más intensas  $m/z$  344 y  $m/z$  538. **C.** Transiciones MS/MS del c-di-GMP obtenidos en polaridad negativa.



**Figura 7.** Análisis de la presencia del mensajero secundario celular c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en tiosulfato. Se presentan los espectrogramas MS del extracto nucleico (**A**) y MS/MS del fragmento m/z 689 (**B**) obtenidos en polaridad negativa.

Como una primera aproximación sobre el papel del mensajero secundario c-di-GMP en la fisiología de *A. ferrooxidans*, mediante espectrometría de masas acoplada a HPLC se analizaron los niveles del c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* durante la curva de crecimiento en tiosulfato revelando que a una alta densidad celular, los niveles del c-di-GMP son muy bajos (Figura 8).



**Figura 8.** Análisis de los niveles del c-di-GMP durante la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. Este experimento cuenta con dos replicas biológicas. Además, cada punto de la curva se evaluó por duplicado.

### 3.1.5 Caracterización de la presencia de una actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP en *A. ferrooxidans*

Se analizó la capacidad de hidrólisis del sustrato sintético bis-*p*NPP por extractos proteicos totales obtenidos desde células de *A. ferrooxidans* crecidas en diferentes fuentes energéticas y cosechadas en fases exponencial y estacionaria. El aumento en la absorbancia a 410 nm es directamente proporcional con la liberación de *p*-nitrofenol (*p*NP) a partir de la hidrólisis del bis-*p*NPP (Figura 9A).

El análisis reveló la presencia de una actividad PDE que es capaz de hidrolizar el sustrato artificial bis-*p*NPP (Figura 9). No se observó diferencia en la actividad PDE entre la fase exponencial con respecto a la fase estacionaria de los extractos obtenidos a partir de células crecidas en hierro (Figura 9B). Los extractos obtenidos a partir de células crecidas en tiosulfato presentaron una mayor actividad PDE, siendo mayor esta actividad en fase estacionaria con respecto a la fase exponencial (Figura 9B). Además, durante la fase estacionaria la actividad PDE es 3.8 veces mayor en extractos obtenidos a partir de células crecidas en tiosulfato comparando con los extractos obtenidos a partir de células crecidas en hierro. También, se evaluó la actividad PDE en extractos preparados a partir de células crecidas en azufre elemental durante la fase estacionaria. Ésta reveló ser 6 veces menor que la actividad PDE del extracto obtenido a partir de células crecidas en tiosulfato durante la fase estacionaria (resultado no mostrado). Siendo el bis-*p*NPP un sustrato similar al c-di-GMP, estos resultados permiten afirmar que *A. ferrooxidans* posee una actividad PDE específica para c-di-GMP. Esta actividad podría deberse tanto a las proteínas con dominios GDEF/EAL como las posibles PDEs con dominios EAL y HD.

**A**

**B**

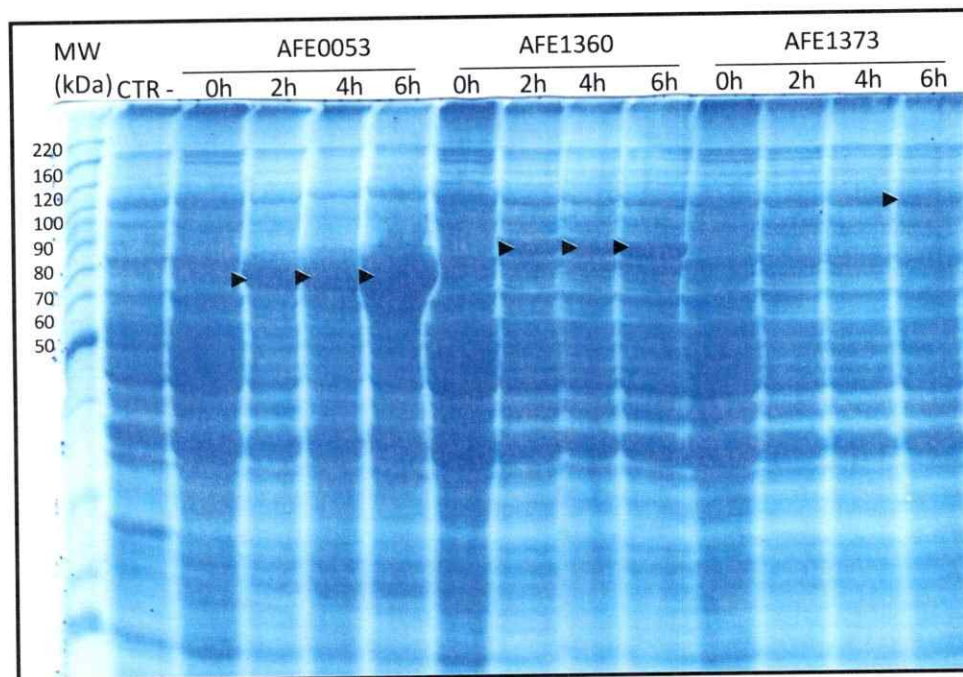
Extractos proteicos totales (1 mg)	Liberación de pNP Absorbancia (410 nm)
Fe exp	0.214 ± 0.016
Fe est	0.201 ± 0.016
Tio exp	0.449 ± 0.032
Tio est	0.765 ± 0.013

**Figura 9.** Determinación de una actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP en 1 mg de extractos proteicos totales de células de *A. ferrooxidans* ATCC23270 cosechadas en fase exponencial (exp) o en fase estacionaria (est). A. Sustrato artificial bis(*p*-nitrofenil) fosfato (bis-*p*NPP). B. Medición de los niveles de absorbancia que muestran la liberación de *p*-nitrofenil un indicador de la actividad fosfodiesterasa específica para el c-di-GMP. Como control negativo se usó el tampón de reacción más el bis-*p*NPP en ausencia de extracto proteico, el *p*-nitrofenil liberado se sustrajo del resto de las reacciones. Medios de cultivo; Tio: tiosulfato, Fe: hierro. Se realizaron 3 replicas biológicas.

### 3.1.6 Estudios funcionales de las proteínas con dominios GGDEF/EAL sobreexpresadas en *E. coli*

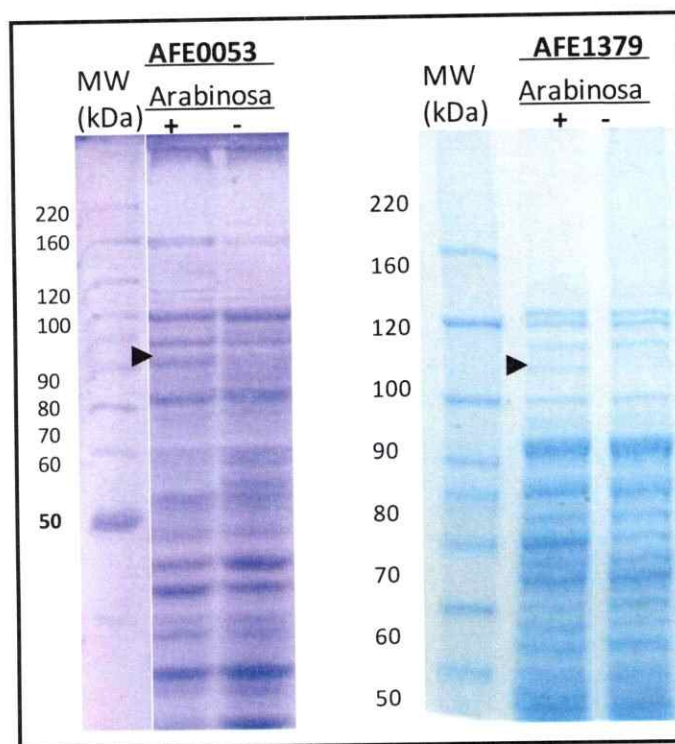
La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* tiene la capacidad de producir celulosa. Sin embargo, su limitada o casi nula capacidad de sintetizar c-di-GMP, el regulador alostérico de la celulosa sintasa, impide la síntesis de celulosa naturalmente (Ross y col., 1986; Simm y col., 2004). Por lo tanto, cuando se sobre-expresan proteínas con actividad DGC en *E. coli* BL21 (DE3) y se crece en placas de agar con rojo de Congo, las colonias presentan el morfotipo característico de la producción de celulosa “rdar”, es decir se observan de color rosado, lo cual permite concluir sobre la actividad DGC de las proteínas sobreexpresadas (Simm y col., 2004; Christen y col., 2007).

Para realizar estos estudios funcionales, se comprobó mediante SDS-PAGE que las proteínas con dominios GGDEF/ EAL de *A. ferrooxidans* se expresaban en *E. coli* (Figura 10 y 11). La existencia del morfotipo “rdar” se analizó en las cepas de *E. coli* BL21 sobre-expresando las probables DGCs de *A. ferrooxidans*. Además, y debido que estas proteínas poseen ambos dominios GGDEF y EAL, se evaluó la actividad PDE de los extractos celulares producidos a partir de estas cepas recombinantes. Finalmente, mediante espectrometría de masas se midió la presencia del c-di-GMP en los extractos nucleotídicos obtenidos a partir de estas mismas cepas recombinantes.



**Figura 10.** SDS-PAGE de los extractos totales de proteínas de la cepa *E. coli* BL21(DE3) que sobreexpresan las probables DGCs y/o PDEs de *A. ferrooxidans* clonadas en el pET-21b. MW, estándar de peso molecular (kDa). CTR-, extracto total de proteínas de *E. coli* que contiene el plasmidio pET-21b sin inserto como control negativo. Clones crecidos en medio LB hasta una DO de 0.6 e inducidos con 1 mM IPTG por 0, 2, 4 y 6 horas. Las flechas (►) indican las proteínas sobreexpresadas.

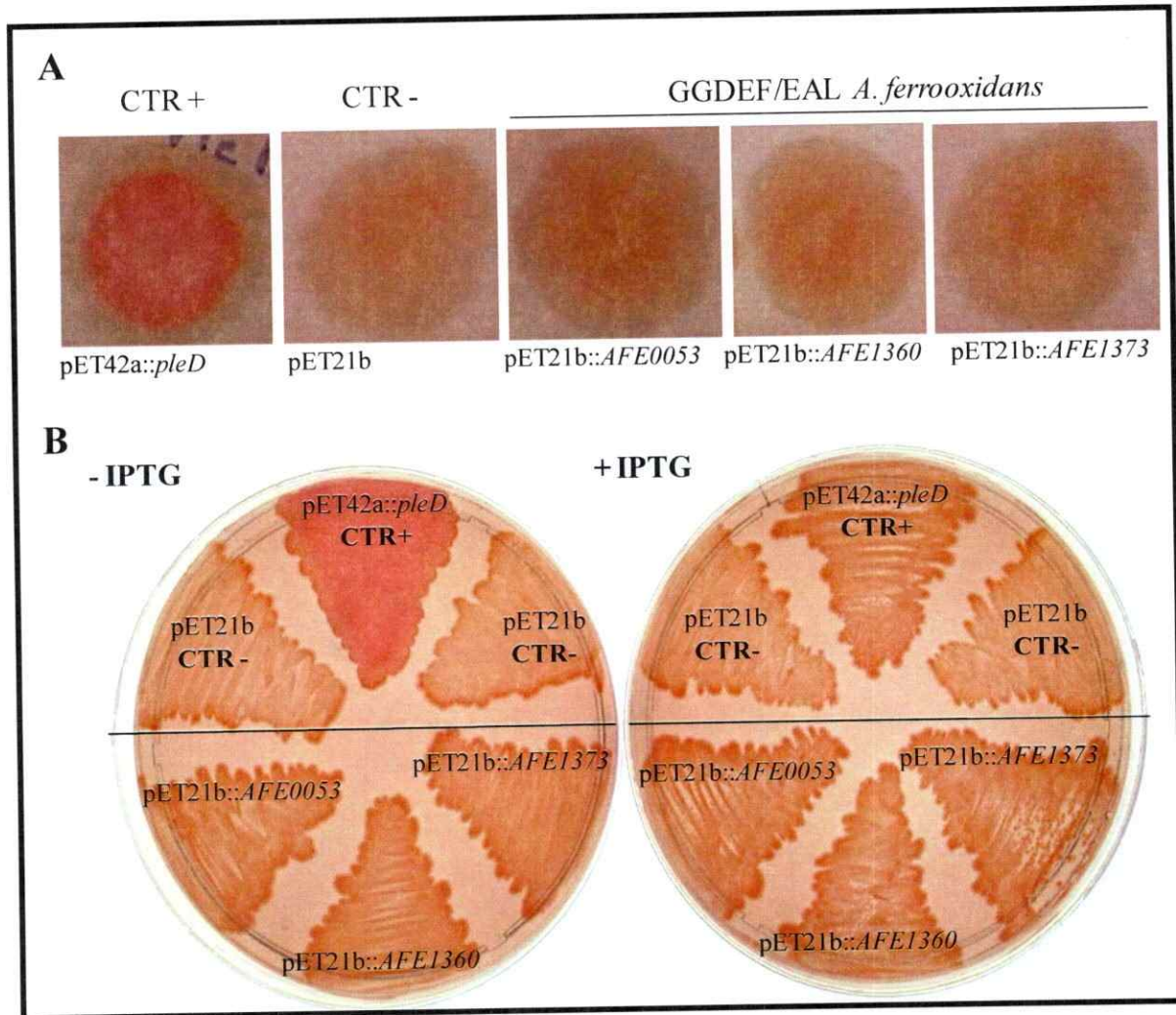




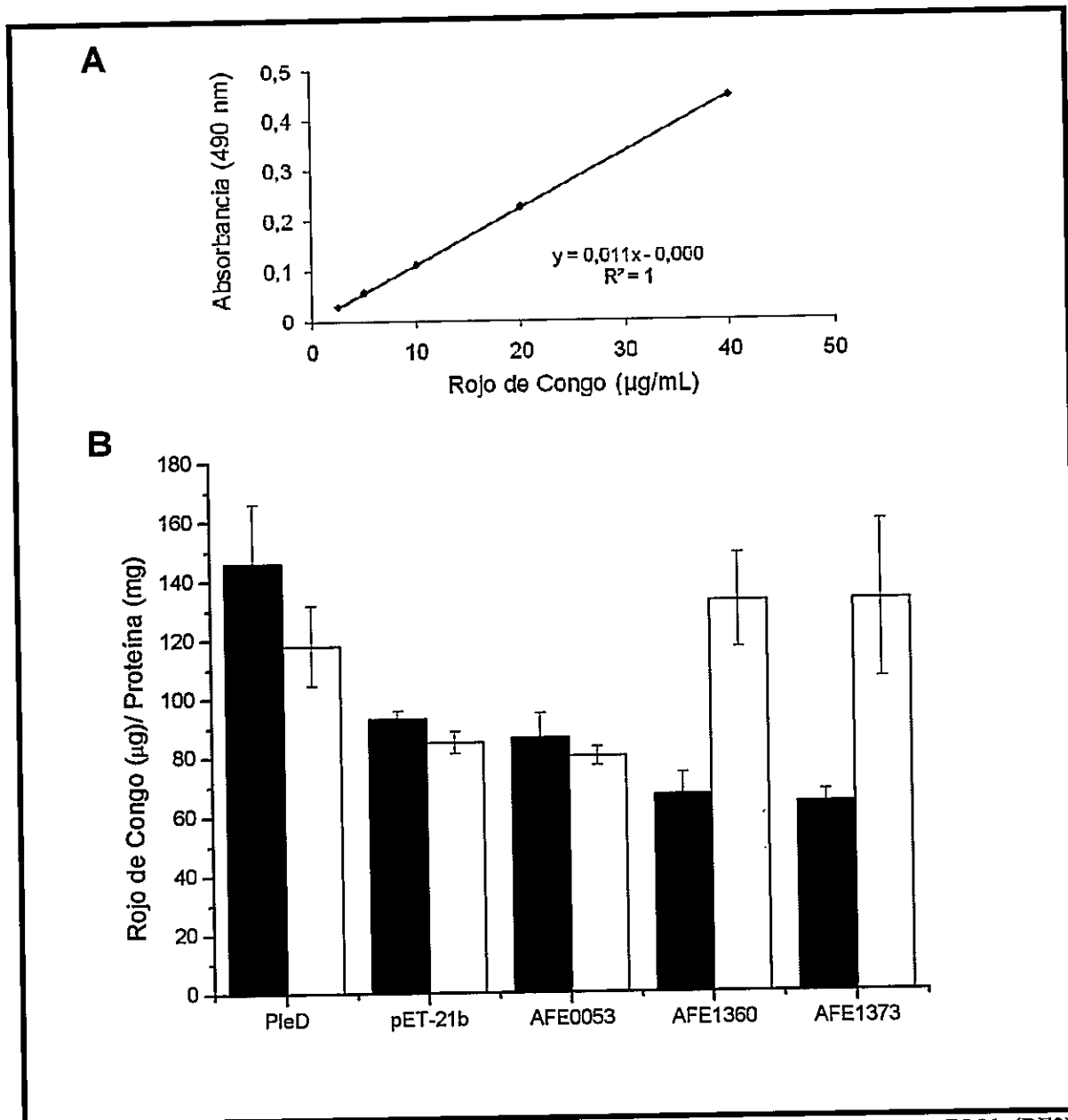
**Figura 11.** SDS-PAGE de los extractos totales de proteínas de la cepa *E. coli* TOP10 que sobreexpresan las probables DGCs y/o PDEs de *A. ferrooxidans* clonadas en el pBADTOPO. MW, estándar de peso molecular (kDa). Clones crecidos en medio LB hasta una DO de 0.6 e inducidos con Arabinosa. Las flechas (▶) indican las proteínas sobreexpresadas.

Los análisis cualitativos de la unión del rojo de Congo no permitieron sacar conclusiones certeras sobre la actividad enzimática de las proteínas probables, aunque con la técnica de gota la cepa que expresa el AFE0053 pareció tener actividad DGC. Para estos análisis se empleó como control negativo la cepa transformada con el plasmidio pET-21b sin inserto y como control positivo la cepa BL21(DE3) sobreexpresando la DGC PleD de *Caulobacter crescentus*. Para interpretar el resultado se empleó un criterio cualitativo, las cepas recombinantes con los genes de *A. ferrooxidans* presentaron un morfotipo intermedio entre el control negativo y el positivo (Figura 12). Por lo anterior, se optó por realizar

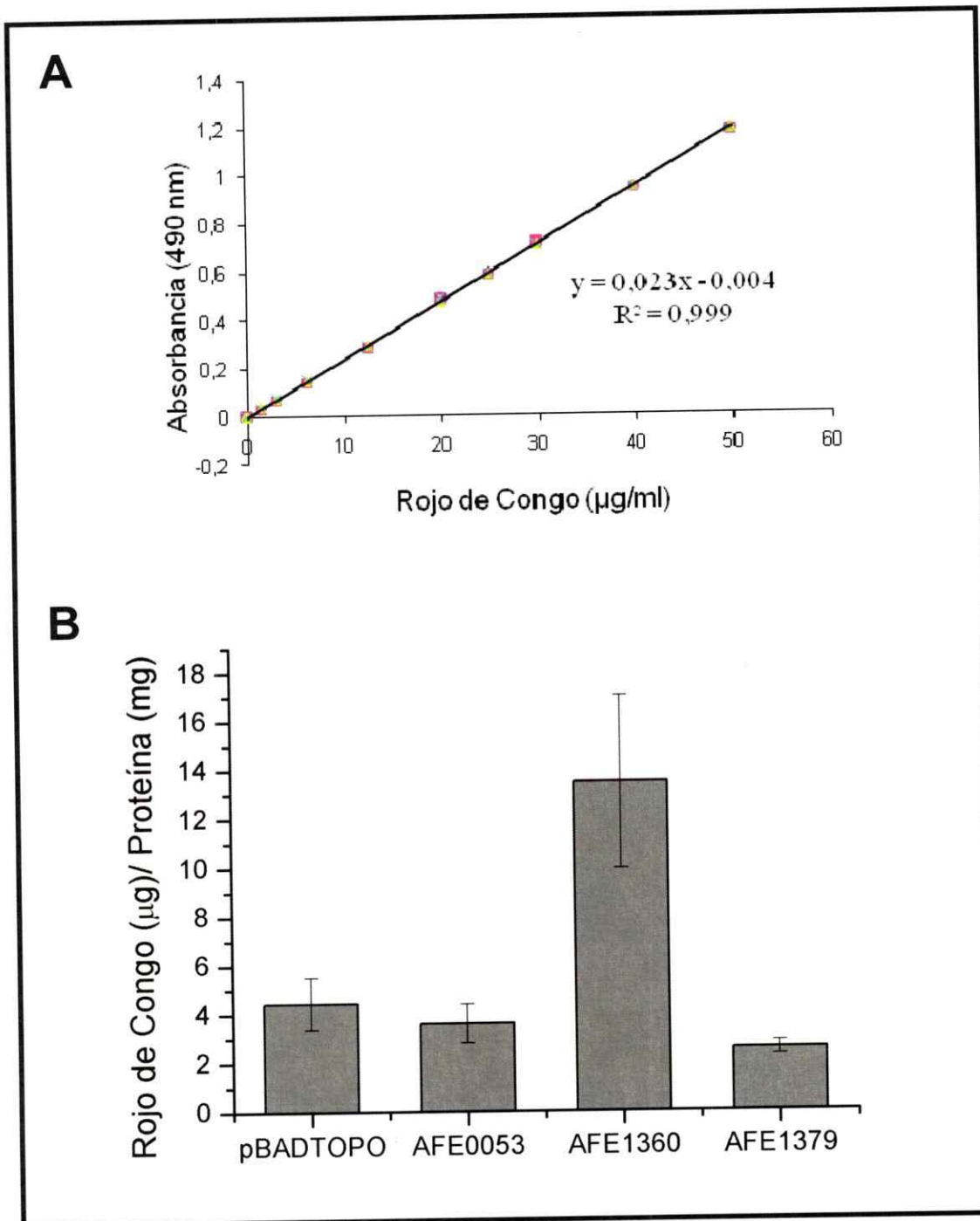
además un ensayo cuantitativo de la unión del rojo de Congo (Figura 13). Las cepas que sobreexpresaban el gen *AFE1360* y el *AFE1373*, aumentaron significativamente los niveles de incorporación de rojo de Congo al ser inducidas con IPTG. Por su parte, los niveles de incorporación en el *AFE0053* no cambiaron. Como ha sido reportado previamente (Christen y col., 2006; 2007) los niveles de incorporación de rojo de Congo disminuyeron al ser inducido por IPTG en el recombinante que sobreexpresaba la DGC PleD de *Caulobacter crescentus* empleado como control positivo (Figura 13). Lo anterior, es debido a un control alostérico de la producción del c-di-GMP. No fue posible subclonar el gen *AFE1379* en el pET-21b(+), para evaluar la sobreexpresión del gen *AFE1379* solo se contó con la construcción en el pBADTOPO::*AFE1379*. Con el propósito de tener un mejor control de la inducción, los demás genes fueron clonados también en el vector pBADTOPO (Invitrogen), el cual es inducible por la adición de arabinosa. Mediante esta última aproximación, se logro observar una incorporación de rojo de Congo significativa por la cepa TOP10 de *E. coli* sobreexpresando el gen *AFE1360* (Figura 14). Además, para asegurar que era un efecto cepa independiente el constructo pBADTOPO::*AFE1360* fue transformado en la cepa BL21(DE3), la cual evidenció también un claro morfotipo de incorporación de rojo de Congo (No Mostrado). Estos resultados permiten concluir que la proteína putativa *AFE1360* es una diguanilato ciclasa (Figura 13 y 14).



**Figura 12.** Caracterización fenotípica de la expresión de los genes de *A. ferrooxidans* que codifican para probables DGC/PDE en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) crecida sobre placas de LB con rojo de Congo (50 µg/ml) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) con o sin IPTG, incubadas a 37°C durante 24 h y a temperatura ambiente durante 48 h. Se inocularon las diferentes cepas mediante la técnica de gota (A) y sembrado (B). CTR +, control positivo; CTR -, control negativo.



**Figura 13.** Cuantificación de la incorporación de rojo de Congo por las diferentes cepas BL21 (DE3) recombinantes que expresan los genes que codifican para probables DGC/PDE de *A. ferrooxidans*. Las células desde la "gota crecida" se resuspendieron en 1 ml de triptona 1% con rojo de Congo 50  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron por 90 min a 37°C a 150 rpm. Luego se centrifugo y en el sobrenadante se cuantifico espectrofotométricamente a 490 nm el rojo de Congo no incorporado y se comparó con soluciones estándares. El rojo de Congo incorporado se cálculo sustrayendo lo no incorporado de la cantidad inicial de rojo de Congo. Los resultados obtenidos se normalizaron con la cantidad de proteína total de cada "pellet" celular. **A.** Curva de calibración con estándares del rojo de Congo. **B.** Cuantificación de la incorporación de rojo de Congo en células inducidas con IPTG (Barras blancas) o sin inducir (barras negras). PleD (control positivo); pET-21b (control negativo).



**Figura 14.** Caracterización de la incorporación de rojo de Congo en la cepa de *E. coli* TOP10 por las probables DGC/PDE de *A. ferrooxidans* clonadas en el vector pBADTOPO y expresadas bajo el control de arabinosa. **A.** Curva de calibración con estándares del rojo de Congo. **B.** Cuantificación de la incorporación de rojo de Congo en células de *E. coli* TOP10 que sobreexpresan genes DGC/PDE de *A. ferrooxidans*. pBADTOPO (control negativo).

Finalmente, se analizaron mediante espectrometría de masas extractos nucleotídicos obtenidos a partir de las cepas BL21 (DE3) transformadas con los plasmidios pET-21a(+):*AFE0053*, pET-21a(+):*AFE1360* ó pET-21a(+):*AFE1373* y de la cepa TOP10 transformada con el plasmidio pBADTOPO:*AFE1379*. Los resultados revelaron la presencia de una señal m/z 689 en cada uno de los extractos. Comparando con los controles (blanco y vectores pET-21b y pBADTOPO sin inserto), el análisis MS/MS de estas señales evidencio la presencia de los picos m/z 344 y m/z 538 característicos del c-di-GMP (ANEXOS 5-11). En la Tabla 10 se resumen los valores de las intensidades relativas del análisis en polaridad negativa de cada una de las señales m/z de fragmentación que se utilizaron para confirmar la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa *E. coli* sobreexpresando proteínas con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*. Los valores de las intensidades relativas del análisis en polaridad positiva se presentan en el ANEXO 12.

Lo anterior permite concluir que en nuestras condiciones experimentales las proteínas probables *AFE0053*, *AFE1360*, *AFE1373* y *AFE1379* tienen actividad diguanilato ciclasas.

**Tabla 10.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa *E. coli* sobreexpresando proteínas con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*.

	Presencia del c-di-GMP
BLANCO	n.d.
PleD::pET-42b/ BL21 + I	+*
pET21b / BL21 + I	n.d.
<i>AFE0053</i> ::pET21b / BL21 + I	+
<i>AFE1360</i> ::pET21b / BL21 + I	+
<i>AFE1373</i> ::pET21b / BL21 + I	+
pBADTOPO / TOP10 + A	n.d.
<i>AFE1379</i> ::pBADTOPO/ TOP10 + A	+

Para la determinación de la presencia de c-di-GMP en las muestras se utilizó la detección en polaridad negativa de la señal m/z 689 correspondiente a la especie [M-H]<sup>-</sup> y la observación de su fragmentación en las señales m/z 344 y m/z 538. La presencia del c-di-GMP se indica con el símbolo +. Cuando las señales no se detectaron (n.d.). El blanco se preparó en forma similar a las muestras y estándares excepto que se adicionó agua y se examinó en el espectrómetro en las mismas condiciones. Como control positivo se usó el extracto nucleotídico de *E. coli* sobreexpresando la DGC PleD de *C. crescentus*. \*Las intensidades relativas de PleD::pET-42b fueron 10 veces mayores que lo observado para los extractos nucleotídicos de *E. coli* sobreexpresando las proteínas de *A. ferrooxidans*. BL21: *E. coli* BL21 (DE3), TOP10: *E. coli* TOP10. Inducido con IPTG: + I. Inducido con arabinosa: + A.

### 3.1.7 Análisis del posible papel de la vía c-di-GMP en la regulación de la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans*

Al comparar los niveles de c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* adheridas a un sustrato energético sólido con aquellas células de *A. ferrooxidans* planctónicas crecidas con un sustrato soluble se evidencian diferencias (Tabla 11). Los niveles del c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* varían dependiendo de la fuente energética, siendo mayores en las células adheridas a sustratos energéticos sólidos (Tabla 11).

Además, el análisis de los niveles del mensajero secundario c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* conformando biopelículas sobre perlas de azufre versus células planctónicas provenientes del mismo cultivo, indicó un nivel de c-di-GMP 10 veces mayor en las células conformando biopelícula ( $568.8 \pm 199.3$  ng c-di-GMP/mg proteína), con respecto a las células planctónicas ( $56.4 \pm 20.1$  ng c-di-GMP/mg proteína) (Figura 15).

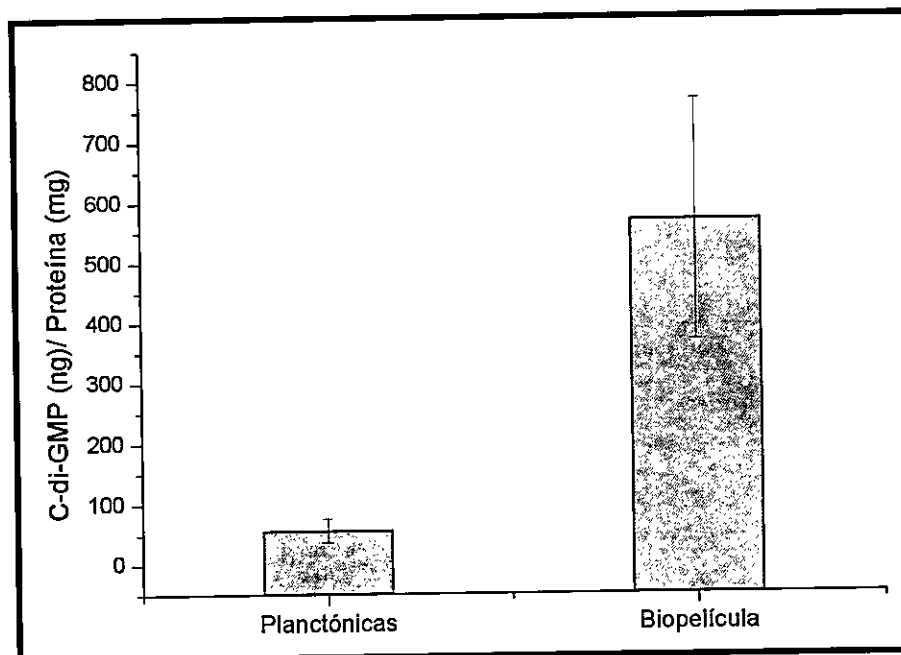
La presencia de mayores niveles de c-di-GMP en células crecidas con sustratos sólidos y en las células provenientes de la biopelícula desarrollada sobre azufre, sugieren un papel del c-di-GMP en la integración de las condiciones ambientales para regular la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans*, tal como ocurre en otras bacterias.



**Tabla 11.** Análisis mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas de los niveles del c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* crecidas con diferentes fuentes energéticas.

Fuente Energética	ng c-di-GMP/ mg proteína
Azufre <sup>a</sup>	382.9
Concentrado de Cobre <sup>a</sup>	168.6
Pirita <sup>a</sup>	49.9
Tiosulfato <sup>b</sup>	24.0
Sulfato de hierro <sup>b</sup>	2.2

<sup>a</sup> Células adheridas a sustratos sólidos, <sup>b</sup> Células planctónicas en sustratos solubles



**Figura 15.** Análisis mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas de los niveles del c-di-GMP en células de *A. ferrooxidans* crecidas en perlas de azufre.

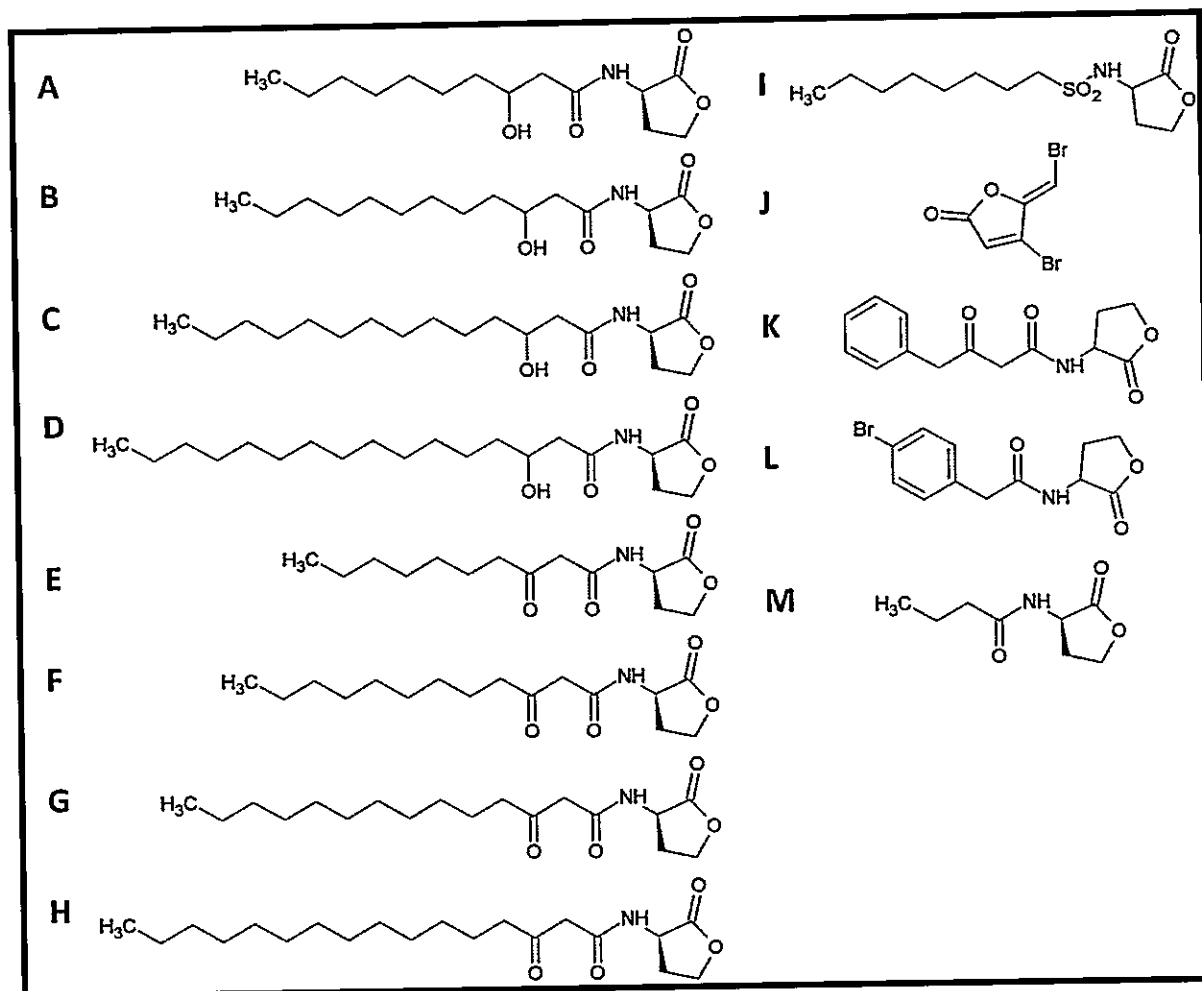
### **3.2 Análisis del efecto de AHLs y análogos de AHLs en la formación de biopelícula por *A. ferrooxidans* ATCC 23270 sobre pirita**

En esta parte de mi trabajo doctoral, se trato de comprobar si el sistema de QS de tipo AI-1 identificado en *A. ferrooxidans* en nuestro laboratorio (Farah y col., 2005) podría estar involucrado en la formación de biopelículas en esta bacteria.

Por eso, y debido a que la transferencia genética con una frecuencia muy baja y no se usa de rutina, es un paso limitante en la construcción de mutante en el sistema de QS de *A. ferrooxidans*, decidimos usar diferentes tipos de AHLs y análogos de AHLs sintéticos que han sido evaluados como inhibidores y/o activadores potenciales del QS en otros microorganismos (Castang y col., 2004; Geske y col., 2005; Frezza y col., 2006) para simular estados QS- y QS+, respectivamente. De esta manera se esperaba comprobar si existía alguna relación entre las moléculas señal de QS y los niveles de adherencia de *A. ferrooxidans* sobre sustrato energético como la pirita.

Las AHLs y los análogos AHLs sintéticos se presentan en la Figura 16. Las células fueron cosechadas por centrifugación, lo cual genera una pérdida parcial de las SPEs. Por tal, se permite una regeneración de las SPEs mediante una incubación durante la noche en una solución salina suplementada con hierro férrico (Harneit y col., 2006). De esta forma,

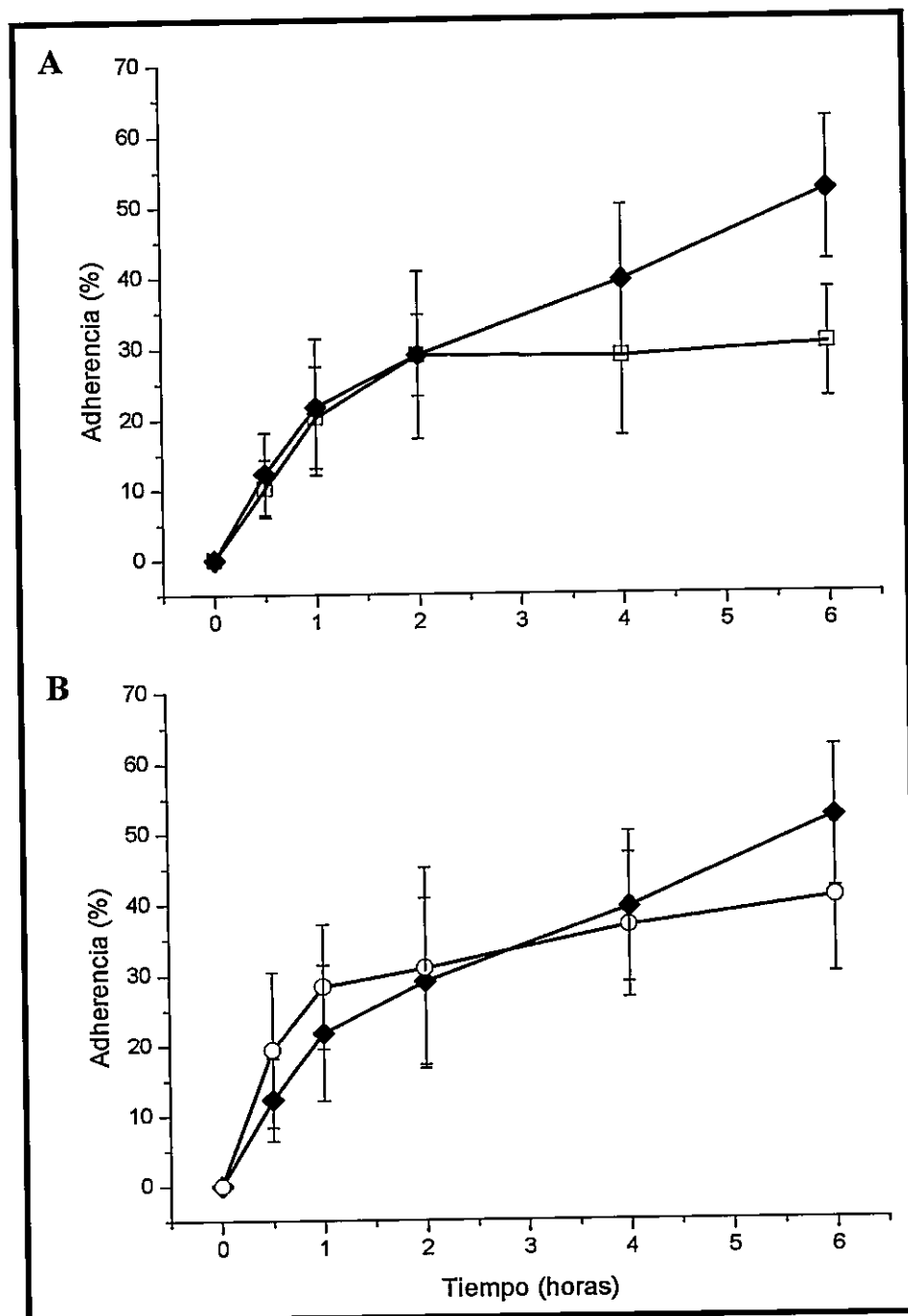
se asume que se obtiene una población bacteriana homogénea, permitiendo así una observación más clara de los posibles efectos de AHLs y análogos de AHLs.



**Figura 16.** Estructuras moleculares de las moléculas de AHLs (A - H) y análogos de AHLs (I - L) usados en este trabajo. Las estructuras fueron dibujadas con el software "ChemSketch" (ACD labs): A) 3-OH-C10-AHL, B) 3-OH-C12-AHL, C) 3-OH-C14-AHL, D) 3-OH-C16-AHL, E) 3-Oxo-C10-AHL, F) 3-Oxo-C12-AHL, G) 3-Oxo-C14-AHL, H) 3-Oxo-C16-AHL, I) 3-Sulfonilamida-C8-HSL, J) 4-Bromo-3-(Bromometileno)-Furanona, K) *p*-Bromo,3-Fenil-HSL, L) 4-Fenil-3-oxo-HSL, M) Molécula de AHL (C4-AHL) empleada como control. Todas estas moléculas fueron sintetizadas en el laboratorio de Química Orgánica, UMR CNRS-UCB-CPE 5181, INSA, 69621 Villeurbanne, Francia en el marco del proyecto de colaboración ECOS C05 B04.

Al incubar las células de *A. ferrooxidans* con una mezcla de AHLs, compuesta por hidroxil-(C10, C12, C14, C16)-AHLs y oxo-(C10, C12, C14, C16)-AHLs, se observó una inhibición de 42 % de la adherencia a pirita (Figura 17A). Seis horas después de la incubación con la mezcla de AHLs, sólo un 30 % ( $30.4 \pm 7.6$ ) de la población bacteriana se adhirió a la pirita comparada con un 52 % ( $52.2 \pm 10.1$ ) de adherencia para la población bacteriana control (no tratada) (Figura 17A). Se evaluaron dos moléculas de la mezcla AHLs por separadas: OH-C16-AHL y Oxo-C16-AHL. Ninguna indujo un efecto sobre la adherencia a la pirita (resultados no mostrados), sugiriendo, que no eran éstas las AHLs responsables de la disminución de adherencia observada en el experimento anterior.

Análogos de AHLs con sustituyentes del tipo aril, alquil, fenil, sulfonilurea, sulfonilamida y urea fueron también probados. Después de 6 h de inducción, el derivado 4-fenil-3-oxo-HSL produjo una disminución en el nivel de la adherencia (22%, de  $52.2 \pm 10.1$  a  $40.7 \pm 10.8$ ) (Figura 17B). Por otro lado, algunos de los análogos de AHLs evaluados indujeron un incremento sobre el nivel de la adherencia (Tabla 12). Estos incrementos observados después de cuatro horas de incubación, fueron del 19%, 26% y 40%, para la 3-sulfonilamida-C8-HSL, 4-bromo-3-(bromometileno)-furanona y p-bromo-3-fenil-HSL, respectivamente.



**Figura 17.** Estudios del efecto de una mezcla de AHLs y de un análogo de AHL sobre la adherencia de *A. ferrooxidans* a la pirita (Ruiz y col., 2008). Se contaron las células planctónicas que permanecían sin unirse a la pirita usando una cámara de “Thoma” durante 6 horas. La cantidad de células adheridas se calculó sustrayendo las células planctónicas del número inicial de células consideradas como el 100 %. **A)** Mezcla de AHL (□) compuesta por OH-AHLs (C10, C12, C14, C16) y oxo-AHLs (C10, C12, C14, C16); (♦), control sin AHLs; **B)** Análogo de AHL, 4-fenil-3-oxo-HSL (o); (♦), control sin AHLs. Cada resultado representa un promedio de seis experimentos. Las barras indican los valores de la desviación estándar.

**Tabla 12.** Estudio del efecto de algunos análogos de AHLs sobre la adherencia de *A. ferrooxidans* a la pirita (Ruiz y col., 2008).

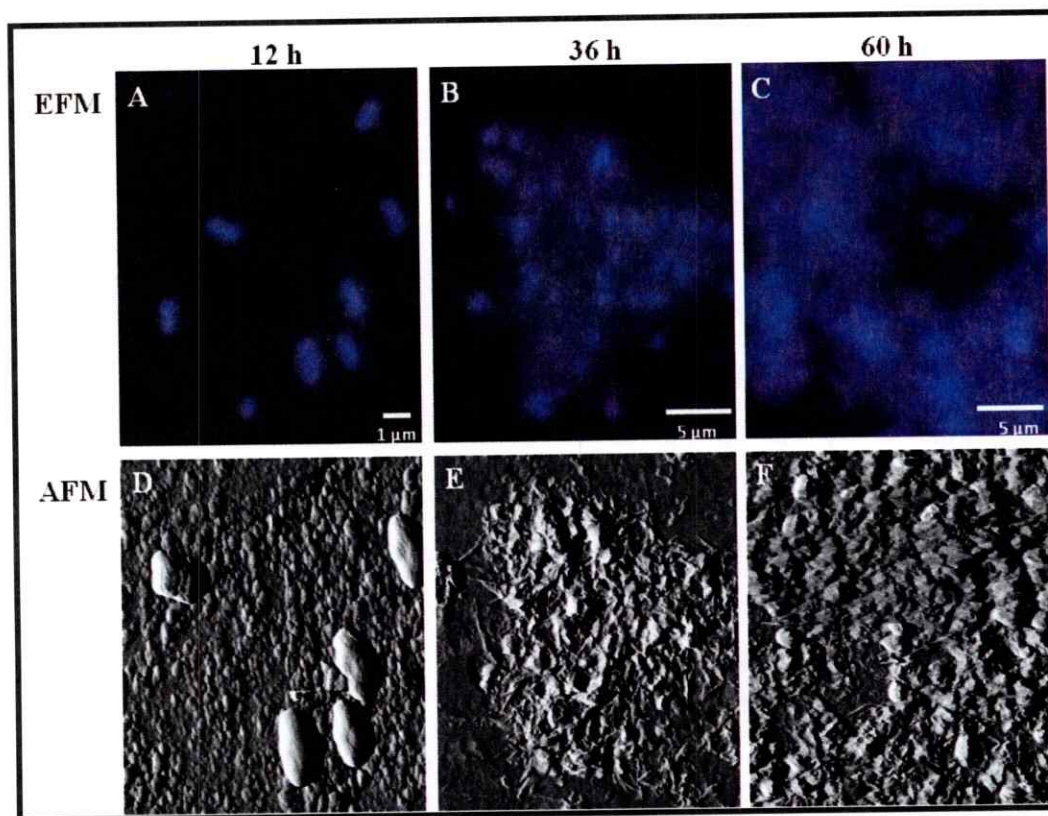
Análogos de AHL	Adherencia (%)
Control sin análogos de AHL	39.4 ± 10.1
3-sulfonilamida-C8-HSL	47.1 ± 11
4-bromo-3-(bromometileno)-furanona	49.9 ± 3.5
p-bromo-3-fenil-HSL	55.4 ± 9.7

Los resultados anteriores muestran una pequeña pero significativa tendencia de la mezcla de AHLs para inhibir la adherencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a la pirita. Por otro lado, algunos análogos incrementan mientras que otros inhiben la adherencia de esta bacteria a la pirita. Aunque se requiere un trabajo experimental adicional los presentes datos sugieren que las moléculas de AHLs, probablemente a través de su interacción con la proteína AfeR de *A. ferrooxidans*, y por lo tanto el sistema de QS del tipo AI-1, podrían estar involucradas en la adherencia de este microorganismo a la pirita.

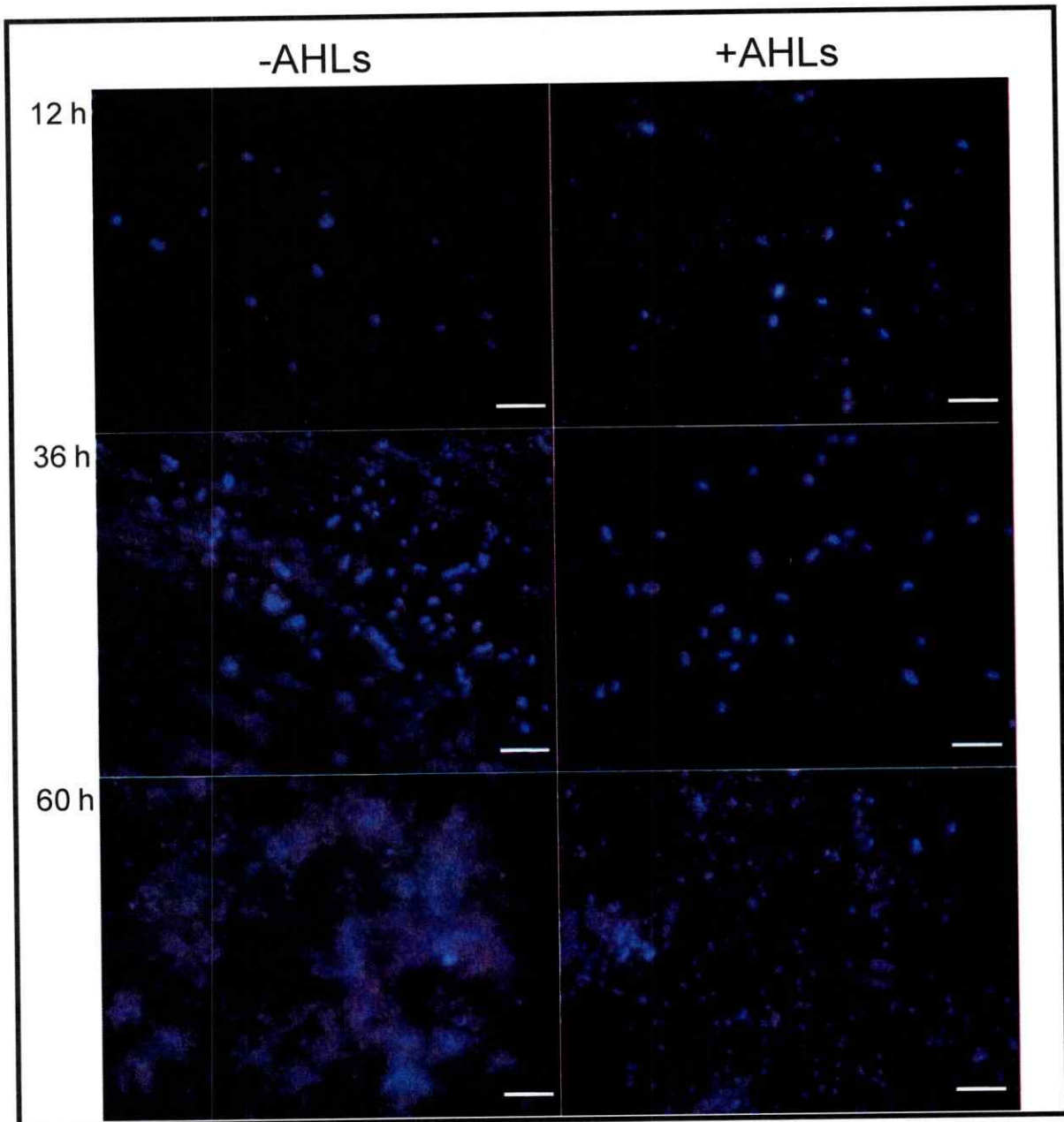
Debido a que la conclusión anterior fue obtenida mediante una aproximación indirecta, nos propusimos corroborarla de una forma directa. Por lo tanto, se utilizaron las técnicas de las microscopías de fuerza atómica (AFM) y de epifluorescencia (EFM) para estudiar el efecto de la mezcla de AHLs y análogos de AHLs sobre la adherencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a la pirita.

El análisis de la formación de biopelícula por *A. ferrooxidans* sobre pirita, mostró que a las 12 horas, se presenta adherencia “irreversible”, a las 36 horas se comenzaron a observar microcolonias y a las 60 horas se había establecido una monocapa (Figura 18).

Posteriormente, se analizó el efecto de la mezcla de AHLs sobre la formación de biopelícula por *A. ferrooxidans*. Se observó un efecto similar al descrito en el experimento anterior (Figura 17) evidenciándose la formación de microcolonias, a las 36 horas, más discreta (Figura 19) y monocapas a las 60 h fueron más dispersas (Figura 19) sobre las laminas de pirita.



**Figura 18.** Análisis del desarrollo de biopelícula en *A. ferrooxidans* mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) (D-F) acoplada a microscopía de epifluorescencia EFM (A-C). Unión (12 h) (A y D). Microcolonia (36 h) (B y E). Monocapa (60 h) (C y F). La escala de las imágenes no es similar, (A) ampliada, (B y C) escala similar, (D) escáner de 5 x 5  $\mu\text{m}$ , (E y F) escáner de 20 x 20  $\mu\text{m}$



**Figura 19.** Análisis del efecto de una mezcla de AHLs en el desarrollo de biopelícula en *A. ferrooxidans* mediante microscopía de epifluorescencia. La barra de escala representa una distancia de 5  $\mu\text{m}$ .



## 4. DISCUSIÓN

### Vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans*

El análisis de la secuencia genómica del DNA de la bacteria extremófila *A. ferrooxidans* ATCC 23270 indicó la presencia de 5 ORFs que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP. Continuando con esta línea de trabajo, el subsecuente análisis del genoma de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* (<http://genome.ornl.gov/microbial/lfer/>), nos ha permitido detectar también 35 ORFs que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP. Asimismo, estudios bioinformáticos realizados por nuestro grupo indican la presencia de esta vía en otros microorganismos asociados a procesos de biolixiviación: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, y *Leptospirillum ferrooxidans* (Castro y col., 2009). Todo lo anterior nos sugiere que la vía de señalización mediante el c-di-GMP podría ser de gran relevancia para el consorcio de bacterias asociadas a procesos de biolixiviación (Tabla 13).

El número de ORFs codificando para las proteínas involucradas en la vía de señalización mediante el c-di-GMP varía enormemente para las diversas especies bacterianas (Römling y col., 2005). *Vibrio vulnificus* y *Shewanella oneidensis* encabezan la lista de bacterias con respectivamente, 99 y 98 ORFs, que codifican para probables proteínas con actividades DGC y PDE. Continúan, *V. cholerae* con 61 ORFs y *Vibrio fischeri* con 48 ORFs, *P. aeruginosa* con 38 ORFs, *E. coli* K12 con 36 ORFs, *Bacillus subtilis* con 7 ORFs, el pequeño genoma de *Rickettsia prowazekii* con solamente 2 ORFs y *Mycobacterium smegmatis* con 1 ORF, que codifican para probables proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP (Galperin y col., 2001; Galperin, 2004; Römling y col.,

Tabla 13. Vía del c-di-GMP en bacterias asociadas a procesos de biolixiviación.

	GGDEF	EAL	GGDEF/EAL	HD	HD-GYP	PilZ	FleQ	[AAA]	PeID	Total
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	—	1	4	3	—	2	—	13	—	23
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	18	—	3*	Nd	14	1	1	16	—	53
<i>A. thiooxidans</i> *	4	2	7	3	—	7	—	—	1	24
<i>A. caldus</i> *	9	3	6	3	—	8	—	16	1	46
<i>Leptospirillum</i> sp. Group II	Nd	Nd	5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	5

Nd: no determinado; —: no presente

\*Tesis de Doctorado de Matías Castro, estudiante del Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología de la Universidad de Chile (Castro y col., 2009). \* Estos tres ORFs codifican para proteínas con dominios GGDEF/EAL/HD-GYP.

2005; Kumar y Chatterji, 2008). Esta variabilidad en el número de ORFs codificando para proteínas de la vía c-di-GMP sugiere que el número de ORFs codificando para proteínas de la vía c-di-GMP podría estar asociado con el ambiente particular de la bacteria. Sin embargo, a pesar de la similitud de los ambientes de las cepas ATCC 53993 y ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, la cepa ATCC 53993 codifica para más proteínas probables dedicadas al metabolismo del c-di-GMP que la cepa ATCC 23270 empleada en esta tesis. Entonces, otros factores podrían estar determinando esta gran variabilidad, entre los cuales se destacan los diversos mecanismos regulatorios de las proteínas pertenecientes a la vía c-di-GMP (Jonas y col., 2009). Posiblemente a nivel transcripcional, un número bajo de genes codificando para proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP podría ser compensado con un nivel alto de expresión. Por ejemplo, el genoma de *Xanthomonas campestris* posee 37 ORFs que codifican para proteínas con dominios GGDEF/EAL y HD-GYP. El análisis de la expresión mediante qPCR de estos 37 genes indicó que el número de copias de cada transcrito fluctúa entre 100 y 1500 (Ryan y col., 2007). En contraste, nuestros resultados revelan que en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 los 4 ORFs que codifican para proteínas con dominios GGDEF/EAL tienen niveles relativos de transcritos génicos que oscilan entre 19700 y 79600 copias, siendo esta expresión 197 y 53 veces mayor que el rango de expresión de *X. campestris* (Figura 5, pag. 49).

Varios estudios han descrito genes involucrados en el metabolismo del c-di-GMP como parte de operones involucrados en la síntesis de polisacáridos, formación de biopelícula y motilidad. Por ejemplo el operón *cdg1* involucrado en el control de la síntesis de celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* (previamente *Acetobacter xylinum*) posee los genes *cdg1a*, *pdeA1*, *dgc1*, y *cdg1d*, que codifican para un regulador transcripcional, una

PDE, una DGC y una proteína hipotética, respectivamente (Tal y col., 1998). El operón *vieSAB* de *V. cholerae*, codifica para una quinasa, un regulador de respuesta tipo CheY con actividad PDE (EAL) y un regulador de respuesta con un dominio fosforeceptor, respectivamente. VieSAB conforma un “fosforelay” involucrado en la regulación de la formación de biopelícula y la motilidad (Martínez-Wilson y col., 2008). El operón *scrABC* de *V. parahaemolyticus*, codifica para una enzima dependiente de piridoxal fosfato, una proteína de unión de solutos extracelulares y una proteína bifuncional DGC/PDE, respectivamente. Este operón es inducido por crecimiento sobre superficies y modula inversamente la expresión génica del flagelo lateral y polisacárido capsular (Ferreira y col., 2008). Por su parte, en *S. oneidensis* el operón *mxdABCD* es esencial para la unión a la matriz y la formación de biopelículas, *mxdA* codifica para una DGC, *mxdB* codifica para una probable glicosiltransferasa asociada a membrana, *mxdC* codifica para una probable bomba de eflujo asociada a membrana y *mxdD* codifica para una probable proteína de membrana sin homología con proteínas conocidas (Thormann y col., 2006). Sin embargo, los contextos génicos de estos operones son diversos y no se puede derivar ninguna conclusión de ellos. Coherente con esta gran diversidad, los contextos génicos de los ORFs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 involucrados en la vía del c-di-GMP (Figura 4, pag. 47) incluyen genes asociados con cubierta celular; procesos de detoxificación, portadores de compuestos con cationes y hierro, tráfico y secreción de proteínas y péptidos, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos, metabolismo de deoxiribonucleótidos, replicación, recombinación y reparación del DNA y funciones de transposón (Figura 4, pag. 47). Por lo tanto, los procesos regulados por el c-di-GMP en *A. ferrooxidans* podrían ser tan diversos como las unidades genéticas que rodean los genes

involucrados en el metabolismo del c-di-GMP de esta bacteria extremófila (Figura 4, pag. 47)

La literatura revela que un número importante de proteínas con dominios GGDEF y EAL está asociado con dominios sensores citoplasmáticos, tales como PAS y GAF, mientras que otra fracción considerable de éstas son proteínas de membrana (Galperin y col., 2001, Römling y col., 2005). Se ha postulado que la localización celular es importante en la función de la detección de las condiciones ambientales extracelulares (Galperin y col., 2001, Römling y col., 2005). No obstante, se ha reportado un solo estudio enfocado a la caracterización de la localización subcelular de una proteína implicada en el metabolismo del c-di-GMP (Güvener y col., 2007). El sistema de transducción de señales Wsp de *P. aeruginosa*, el cual es homólogo a los sistemas de quimiotaxis e incluye la proteína receptora WspA y el regulador de respuesta WspR, una DGC que sintetiza c-di-GMP cuando es fosforilada. El análisis de la distribución subcelular de estas proteínas, indicó que WspA se encuentra formando agregados en la membrana, mientras que WspR varía su distribución en el citoplasma dependiendo de su estado de fosforilación, agregándose a nivel citoplasmático sólo cuando está dedicado a la síntesis de c-di-GMP durante procesos celulares como la formación de biopelícula (Güvener y col., 2007). Nuestro análisis bioinformático reveló que la mayoría de las proteínas involucradas en la vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans* no tienen dominios de membrana y entonces estarían ubicadas en el citoplasma, sugiriendo que los procesos relacionados con esta vía se presentarían en este compartimiento celular. Consiguientemente, la formación de complejos proteicos podría ser importante en la producción compartimentalizada del c-di-GMP en *A. ferrooxidans*, así como lo descrito para la proteína WspR de *P. aeruginosa* (Güvener y col., 2007).

La síntesis de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP puede ser regulada transcripcionalmente por diversos reguladores transcripcionales o al nivel post-transcripcional por mecanismos que incluyen fosforilación, localización, interacciones proteína-proteína o estabilidad de proteínas (Jonas y Römling, 2009). Las cuatro proteínas DGC/PDE involucradas en el metabolismo del c-di-GMP, poseen el sitio I (inactivación), que une c-di-GMP e inhibe la síntesis de c-di-GMP (Figura 3, pag. 46) (Christen y col., 2005; Christen y col., 2006). Por lo tanto, los niveles del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* muy probablemente son regulados por este mecanismo alostérico.

### **Funcionalidad de la vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans***

La presencia del c-di-GMP ha sido reportada en varias bacterias Gram-negativas y algunas bacterias Gram-positivas. Hasta el momento, éste es el primer estudio sobre la vía de señalización mediante el c-di-GMP en una bacteria extremófila, la cual además es de gran interés en la industria biominera.

En esta tesis reportamos que la presencia del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* es independiente de la fuente energética: hierro, azufre o tiosulfato (Figura 7, pag. 54).

En nuestras condiciones experimentales determinamos que las cuatro proteínas con dominios GGDEF/EAL (AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379), presentaron actividad DGC (Tabla 10, pag. 66; ANEXOS 5-10). Esta probable redundancia sugiere que diversas funciones celulares podrían ser reguladas por la vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans* durante los diferentes estados del crecimiento o de acuerdo con las condiciones ambientales enfrentadas por la bacteria. Las cuatro DGCs de *A. ferrooxidans* al igual que las 5

probables proteínas GGDEF/EAL de *Leptospirillum* sp. (Tabla 13) tienen diferentes dominios sensores, PAS y GAF, ubicados en el amino terminal. La presencia de estos dominios sensores sugiere que en estas bacterias acidófilas la vía del c-di-GMP podría ser regulada por diversas señales ambientales, tal como ocurre en otras bacterias. Las proteínas citoplasmáticas con dominios PAS son importantes en la detección de factores ambientales que cruzan la membrana celular y/o afectan el metabolismo celular, tales como quimioattractantes o quimiorrepelentes, cambios en la luz, potencial redox, niveles de oxígeno y el estatus energético celular (Morgan y col., 2006; Taylor, 2007). Entretanto, el dominio GAF puede unir cGMP. ¿Que parámetros podrían ser detectados por PAS y GAF en el ambiente acidofílico de *A. ferrooxidans*? ¿Son los efectos de estos dominios sensores aditivos o jerárquicos? En *L. ferrooxidans* provenientes de un drenaje ácido de mina (AMD) con respecto a los provenientes de una represa acidica a 2 Km del AMD se incremento la expresión de los genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF y EAL (Parro y col., 2007). A diferencia de la represa acídica, el AMD es rico en hierro, sulfato y sales; también, posee una baja concentración de oxígeno (Parro y col., 2007). Estas condiciones podrían ser detectadas por los sensores PAS de las probables DGC de estos microorganismos acidofílicos.

Con las condiciones experimentales empleadas en esta tesis, observamos que de las cuatro DGC con dominios GGDEF/EAL (AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379) solo las proteínas AFE1360 y AFE1373 son capaces de inducir una producción significativa de celulosa (Figura 13 y 14, pags. 63 y 64, respectivamente). Esta diferencia en la capacidad de inducir producción de celulosa y la actividad DGC pueden depender de la concentración de cada proteína o de la regulación de su actividad, los cuales a su vez determinarán los

niveles de c-di-GMP producidos por cada una de ellas. También, la estructura de los dominios puede determinar en algún grado la cantidad de c-di-GMP producido (Kader y col., 2006). La sobreexpresión de AdrA de *S. typhimurium*, que solo contiene un dominio GGDEF, conduce a una concentración del orden de pmoles 10.000 veces mayor que la concentración basal a nivel celular, mientras que otras proteínas con dominios GGDEF/EAL de *S. typhimurium*, STM2123 y STM3388, conducen a concentraciones solamente cinco y tres veces superior al nivel basal, respectivamente (Kader y col., 2006). La concentración del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* se estimó bajo diversas condiciones, encontrándolo en el rango de 7.25 a 725 pmoles c-di-GMP/ mg proteína (Figura 8, pag. 55; Figura 15, pag. 68 y Tabla 11, pag. 68). Sería interesante establecer cual es el aporte de cada una de las DGC/PDE AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379 y si esta relación varía según la curva de crecimiento. El “pool” de c-di-GMP es regulado por la actividad de proteínas DGCs y PDEs, esto ocurre en varios niveles desde el control transcripcional de los respectivos genes hasta la estimulación de la actividad enzimática por transducción de señales. Otros mecanismos regulatorios incluyen la compartimentalización espacial de las proteínas, interacciones específicas proteína-proteína y la inhibición de la actividad enzimática por el producto (Chan y col., 2004; Römling y col., 2005).

Muchas de las proteínas estudiadas que poseen los dominios GGDEF-EAL combinados presentaban una sola actividad enzimática: DGC o PDE (Römling y col., 2005, Ryjenkov y col., 2005). Sin embargo, recientemente ha sido establecido que proteínas con ambos dominios pueden presentar ambas actividades enzimáticas, dependiendo de las condiciones ambientales (Tarutina y col., 2006; Ferreira y col., 2008; Kumar y Chatterji, 2008). Bajo nuestras condiciones experimentales, las proteínas con dominios GGDEF y



EAL, AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379, presentaron una actividad DGC. Entonces, ¿cuál es la proteína que cumple el papel de PDE específica para el c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ATCC 23270? Este acidófilo no presenta ORFs que codifican para PDE de tipo HD-GYP y posee solamente un ORF que codifica para una probable PDE con un dominio EAL "AFE1852". Desafortunadamente, no fue posible amplificar el gen *AFE1852* con ninguno de los 6 pares de partidores diseñados y bajo las condiciones de optimización empleadas. Teniendo en cuenta los estudios de las proteínas bifuncionales con actividad DGC y PDE, no se puede descartar que algunas proteínas con los dominios GGDEF/EAL de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 puedan presentar actividad PDE. Por otro lado, si bien identificamos tres fosfohidrolasas dependientes de metal con el dominio HD, éstas no poseen el motivo GYP la subfamilia de PDE (HD-GYP), lo cual sugiere que la actividad PDE caracterizada en este trabajo podría deberse a las proteínas GGDEF/EAL y/o a la proteína EAL. Sería entonces muy interesante para nuestro laboratorio lograr clonar la PDE con dominio EAL y además indagar si existen algunas condiciones experimentales que favorezcan que AFE0053, AFE1360, AFE1373 y AFE1379 actúen como PDEs.

En células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato se observó que los niveles del c-di-GMP eran muy bajos durante la fase estacionaria del crecimiento (Figura 8, pag. 55). Un fenómeno similar se reportó para *V. cholerae* (Waters y col., 2008), al contrario de *M. smegmatis* que presenta un incremento de tres veces en el nivel del c-di-GMP en la fase estacionaria del crecimiento, sugiriendo que en esta bacteria este mensajero secundario es importante para la adaptación, sobrevivencia y persistencia de bacterias (Kumar y Chatterji, 2008, Waters y col., 2008) (Figura 8, pag. 55). La diferencia en los niveles del c-di-GMP

durante la fase estacionaria podría deberse a que estas bacterias ocupan nichos ecológicos muy diferentes, por ende su fisiología también es muy diferente.

Así como en otras bacterias (Simm y col., 2004; Tischler y Camilli, 2004; Römling y col., 2005; Hickman y col., 2005; Camilli y Bassler, 2006; Römling y Amikam, 2006; Thorman y col., 2006; Simm y col., 2007), los niveles de c-di-GMP son 10 veces mayores en células de *A. ferrooxidans* conformando una biopelícula (Figura 15, pag. 68). Además y en correlación con este resultado los niveles del c-di-GMP son mayores cuando *A. ferrooxidans* es crecido con un sustrato energético sólido (Tabla 11, pag. 68). Ambos resultados, sugieren fuertemente un papel de la vía de señalización mediante el c-di-GMP en la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans*.

Recientemente, se ha descrito como la vía del c-di-GMP puede ser afectada por condiciones limitantes de Pi. En *Pseudomonas*, describieron que bajo condiciones limitantes de Pi se induce la transcripción del gen *rapA* que codifica para una PDE. La actividad PDE de RapA es requerida para la inhibición de la formación de biopelícula (Monds y col., 2007). El operón *acgAB* de *V. cholerae* se induce bajo condiciones limitantes de Pi, *acgAB* codifica para enzimas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP. Esta regulación positiva influye la motilidad *in vitro* de *V. cholerae* (Pratt y col., 2009). En *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en condiciones limitantes de Pi (0.22 mM), con respecto al medio de cultivo óptimo para el crecimiento (22 mM), no se observó ninguna diferencia significativa en la transcripción de los ORFs que codifican para probables DGCs y PDEs (Tabla 9, pag. 51). Para *V. cholerae* y *E. coli* se consideran condiciones limitantes de Pi concentraciones inferiores a 1  $\mu$ M y 4  $\mu$ M, respectivamente (Pratt y col., 2009). Eso sugiere que aunque para *A. ferrooxidans* la condición de carencia con una concentración de

Pi de 220  $\mu$ M fue sensada como limitante para el sistema de QS de tipo AI-1, sobreexpresándose el gen *afeI* 20 veces mas con respecto a la condición 22 mM y aumentando la síntesis de AHLs (Farah y col., 2005), esta condición no genera una condición suficientemente limitante para influir sobre la vía de c-di-GMP.

Actualmente, han sido caracterizados varios tipos de efectores para la vía del c-di-GMP entre los cuales esta la familia de proteínas PilZ, el factor de transcripción FleQ (dominio AAA $\sigma^{54}$ ), la proteína PelD, el sitio de unión "T" en muchos dominios GGDEF, la proteína de membrana LapD une c-di-GMP a través de un dominio EAL degenerado, el regulador transcripcional Clp que posee un dominio de unión conservado para cNMP que une c-di-GMP y los "riboswitches" con el dominio de RNA conservado "GEMM" (Christen y col., 2007; Lee y col., 2007; Prat y col., 2007; Hickman y Harwood, 2008; Sudarsan y col., 2008; Hengge, 2009; Jonas y col., 2009; Pesavento y Hengge, 2009; Newell y col., 2009; Tao y col., 2010). Las proteínas de ensamble de pili tipo IV con el dominio PilZ (AFE1172 y AFE1374) que identificamos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 pueden ser unos de los probables efectores de la vía c-di-GMP. Así como ocurre en otras bacterias Gram-negativas, las proteína de *A. ferrooxidans* con dominio PilZ podrían estar involucrada en la motilidad de tipo "twitching". La motilidad por pili de tipo IV a nivel de células individuales es requerida para el desarrollo de la biopelícula con una arquitectura sofisticada (Klausen, 2003). Lo anterior, sugiere que la vía de señalización mediante el c-di-GMP puede estar involucrada en la regulación de la colonización del mineral y la formación de biopelícula por *A. ferrooxidans*. Además, utilizando la proteína FleQ de *P. aeruginosa* como entrada de búsqueda en las bases de datos, se identificaron 13 ORFs en el genoma de *A. ferrooxidans* con alta identidad a la proteína FleQ de *P. aeruginosa*

(ANEXO 3). FleQ es el regulador máster de la expresión de los genes flagelares en *P. aeruginosa*. En su amino terminal posee el dominio con su mismo nombre “FleQ”, a continuación está el dominio AAA $\sigma^{54}$  de unión a c-di-GMP y finalmente se encuentra un dominio HTH de unión a DNA (Hickman y Harwood, 2008). Los 13 ORFs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 codificando para probables proteínas con homología a FleQ no poseen el dominio “FleQ”. Este dominio es importante en la unión con FleN, un antiactivador de FleQ que también participa en la regulación de la expresión de *pel* (síntesis de EPS). Sin embargo, estos 13 ORFs poseen el dominio AAA $\sigma^{54}$ , que se ha postulado como receptor del c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008). La cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*, posee un ORF que codifica para una proteína de tipo PilZ, al menos un ORF que codifica para una proteína con el dominio “FleQ” y el dominio AAA $\sigma^{54}$ , así como varios ORFs que codifican para proteínas con el dominio AAA $\sigma^{54}$ , sugiriendo algunos mecanismos de transducción similares en ambas cepas.

Por otro lado, el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 no presenta genes *fla* o genes relacionados con *fla* que podrían expresar flagelo, tampoco presenta genes *che* que expresan las funciones clásicas de quimiotaxis (Valdés y col., 2008). En contraste, análisis realizados en nuestro laboratorio del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 indicaron que esta cepa posee 24 ORFs relacionados directamente con estructura y biogénesis del flagelo, así como ORFs que codifican para probables proteínas reguladores de la quimiotaxis con dominios CheY, entre los cuales destacamos que 32 de las probables DGCs y PDEs poseen el dominio CheY: 18 (CheY-GGDEF) y 14 (CheY-HD-GYP). Por lo tanto, la probable proteína con el dominio “FleQ” de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*, podría funcionar como el regulador de la biosíntesis del flagelo en esta cepa. Mientras, que en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 los 13 ORFs con el dominio AAA  $\sigma^{54}$

podrían funcionar como reguladores transcripcionales modulados por c-di-GMP. Sería entonces muy interesante determinar la(s) función(es) regulada(s) por estos probables reguladores transcripcionales en *A. ferrooxidans* y su relación con c-di-GMP.

Dentro los principales resultados obtenidos en relación con el estudio de la vía c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, es importante destacar que la presencia de niveles bajos de c-di-GMP durante la fase estacionaria de células crecidas en tiosulfato se correlaciona con una mayor actividad PDE global y que lógicamente en la fase exponencial tardía una actividad PDE global menor se correlaciona con niveles altos de c-di-GMP (Figura 20A). No obstante lo anterior, no se puede descartar que además exista una mayor actividad DGC global durante la fase exponencial tardía. Para corroborarlo se tendría que cuantificar el mRNA de las DGCs mediante qPCR o experimento de microarreglos de DNA comparando las diferentes fases del crecimiento bacteriano. La realización de los experimentos de microarreglos de DNA se evaluará en el marco de un proyecto internacional CONICYT-CNRS en conjunto con el Laboratorio de la Dra. Bonnefoy en Francia. Resultados preliminares revelaron que los genes *AFE0053* y *AFE1379* que codifican para DGC/PDE, divergen en su expresión en células planctónicas de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre versus las crecidas en sulfato de hierro, uno incrementa mientras que el otro disminuye su expresión (comunicación personal del laboratorio de la Dra. Bonnefoy). Lo anterior sugiere que se presenta una regulación fina de la actividad DGC en *A. ferrooxidans*, además que un nivel determinado de c-di-GMP obedece tanto a la actividad DGC como a la actividad PDE. Por otro lado, es significativo recordar que en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en tiosulfato versus hierro, se presenta una mayor actividad PDE global así como un mayor nivel del c-di-GMP, esto también

podría deberse a una mayor actividad DGC global (Figura 20B). Finalmente, es esencial reiterar que en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 conformando biopelícula sobre perlas azufre hay un mayor nivel de c-di-GMP que en las células planctónicas, lo cual podría deberse a una menor actividad PDE global así como una mayor actividad DGC global o el conjunto de ambos (Figura 20C).

A		
Tiosulfato		
Fase estacionaria		Fase exponencial
[C-di-GMP]	>	[C-di-GMP]
Ac. PDEg	<	Ac. PDEg
Ac. DGCg	>	Ac. DGCg

B		
Fase exponencial		
Hierro		Tiosulfato
[C-di-GMP]	<	[C-di-GMP]
Ac. PDEg	<	Ac. PDEg
Ac. DGCg	<	Ac. DGCg

C		
Azufre		
Planctónicas		Biopelícula
[C-di-GMP]	<	[C-di-GMP]
Ac. PDEg	>	Ac. PDEg
Ac. DGCg	<	Ac. DGCg

**Figura 20.** Síntesis de los principales resultados relativos al papel fisiológico de la vía del c-di-GMP en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **A.** Influencia de la fase del crecimiento. **B.** Influencia de la fuente energética. **C.** Influencia del desarrollo de biopelícula. [C-di-GMP], concentración del mensajero secundario c-di-GMP. Ac. PDEg, actividad fosfodiesterasa global. Ac. DGCg, actividad diguanilato ciclasa global. En la franja blanca de los cuadrantes se resumen los principales resultados de la vía c-di-GMP obtenidos en la presente tesis. En la franja gris se hipotetiza que podría estar pasando con las actividades PDE y DGC globales.

## Posible papel del sistema de QS de tipo AI-1 en el desarrollo de biopelícula en *A. ferrooxidans*

*A. ferrooxidans* produce AHLs con cadenas acilo cuyo largo oscila entre 8 y 16 carbonos y sustituciones del tipo oxo e hidroxilo en el C-3 (OH-C8-AHL, OH-C10-AHL, C12-AHL, oxo-C12-AHL, OH-C12-AHL, C14-AHL, oxo-C14-AHL, OH-C14-AHL, y OH-C16-AHL) (Farah y col., 2005). Estas AHLs son producidas por el sistema de QS de tipo AI-1 (Farah y col., 2005) y la sintasa de AHL codificada por el gen *act* (Rivas y col., 2007).

Las AHLs y análogos de AHLs usados en esta tesis afectaron los niveles de adherencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a la pirita. Una mezcla de AHLs y el análogo de AHL, 4-fenil-3-oxo-HSL, inducen una disminución en los niveles de adherencia en un 42 % y 22 %, respectivamente (Figura 17, pag. 72). Por otro lado, los análogos de AHLs, 3-sulfonilamida-C8-HSL, 4-Br-3-(bromometileno)-furanona y p-bromo-3-fenil-HSL, inducen un aumento en la adherencia en un 19 %, 26 % y 40 %, respectivamente (Tabla 12, pag. 73). La mezcla de AHLs también tuvo efecto a nivel de la formación de la biopelícula, disminuyendo la densidad celular de las monocapas. Todo lo anterior nos permite concluir que el sistema de QS de tipo AI-1 tiene un papel en la regulación de la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Esta regulación podría presentarse en las primeras fases de la formación de biopelícula. Las cuales incluyen la detección de la pirita, el movimiento hacia la pirita y la expresión de sustancias poliméricas extracelulares que facilitan la adhesión a la pirita.



La biopelícula formada por *A. ferrooxidans* sobre la pirita es una monocapa, que posiblemente permite un contacto estrecho de la bacteria con el sulfuro metálico para su oxidación (Harneit y col., 2006; Rohwerder y col., 2003). La adición exógena de AHLs a los cultivos de *A. ferrooxidans* puede crear un ambiente semejante al de alta densidad celular, el cual podría gatillar la búsqueda de sustrato energético y por ende la motilidad bacteriana. Posiblemente, ésta sea una razón por la cual la mezcla de AHLs compuesta por OH-(C10, C12, C14, C16)-AHLs y oxo-(C10, C12, C14, C16)-AHLs, disminuyó la adherencia de *A. ferrooxidans* a los granos de pirita (Figura 17A, pag. 72), así como la formación de microcolonias en las láminas de pirita fueron discretas (Figura 19, pag. 75) y las monocapas dispersas (Figura 19, pag. 75).

El efecto de AHLs y análogos de AHLs podría divergir para formas físicas distintas de un mismo sustrato. En los granos de pirita la mezcla de AHLs generó una disminución en la unión de *A. ferrooxidans* después de seis horas (Figura 17A, pag. 72), mientras que en la lámina de pirita la mezcla de AHL no tuvo un efecto en la unión de *A. ferrooxidans* después de doce horas (Figura 19, pag. 75). Lo anterior puede deberse a diferencia de la hidrodinámica del fluido en los granos de pirita y las láminas de pirita, lo cual podría influenciar la señalización célula a célula (Horswill y col., 2007).

La longitud de la cadena acilo lateral de las AHLs descritas hasta la fecha oscila entre 4 y 18 átomos de carbono (Schaefer y col., 2002; Wagner-Döbler y col., 2005). También, se presenta gran variabilidad a nivel de la sustitución química de la cadena acilo lateral. Las AHLs presentan un grupo ceto en posición C1, asimismo algunas AHL presentan un grupo ceto o hidroxilo en la posición C3. Conjuntamente, la cadena acilo

puede variar en saturación. La mayoría de AHLs presenta la cadena acilo completamente saturada, pero algunas son insaturadas como la 3-hidroxi,7-*cis*-tetradecanoil homoserina lactona de *Rhizobium leguminosarum* (Wagner-Döbler y col., 2005, Blosser-Middleton y Gray, 2001). Todas estas características químicas de la cadena acilo de la AHL, influyen en la hidrofobicidad relativa de la señal. En *V. fischeri*, la señal 3-oxo-hexanoil-HSL difunde rápidamente dentro y fuera de la célula (Kaplan y Greenberg, 1985). Por otro lado, en *P. aeruginosa*, la C4-AHL difunde libremente a través de la membrana celular mientras que la señal 3-oxo-C12 AHL se distribuye en la membrana celular y para su extracción se requiere de la bomba de transporte (Pearson y col., 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las AHLs y análogos de AHLs usados ingresaron a las células de *A. ferrooxidans*. Por otro lado, el exopolisacárido puede ser altamente hidrofóbico, permitiendo secuestrar AHLs en la matriz de SPEs (Kolter y Greenberg, 2006). Por ejemplo, la molécula 3-oxo-C12 AHL de *P. aeruginosa* se distribuye a nivel de la matriz extracelular de la biopelícula (Charlton y col., 2000). Lo anterior nos sugiere que parte de las AHLs adicionadas exógenamente a las células de *A. ferrooxidans* podrían ser secuestradas por la matriz de SPEs.

Los análogos de AHLs empleados en esta tesis modulan la inducción de bioluminiscencia inducida por la molécula 3-oxo-C6-HSL al interactuar con LuxR el regulador de QS de *Vibrio fischeri* (Castang y col., 2004; Frezza y col., 2006, 2008). Por otro lado, estudios de dinámica molecular y “docking”, permitieron establecer que la molécula C14-AHL que presenta una conformación curva en el espacio por la remoción de una cadena alquilo, esta muy bien adaptada al sitio activo de AfeR (Soulère y col., 2008).

Estos estudios sugieren que las AHLs y análogos de AHLs podrían unirse al sitio activo de AfeR e inducir la respuesta observada (Figura 17, pag. 72).

Todos estos resultados fueron obtenidos con la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*. Sin embargo, es importante mencionar que se presentan variaciones en la adherencia a la pirita entre las diferentes cepas de *A. ferrooxidans* (Ghauri y col., 2007). Este hecho, sugiere que el papel del sistema de QS de tipo AI-1 en la unión al sulfuro metálico puede presentar variaciones entre las diferentes cepas de *A. ferrooxidans*. Por lo anterior, sería de gran interés realizar este tipo de estudios en otras cepas de *A. ferrooxidans*.

### **Interconexión del sistema de QS y la vía c-di-GMP**

Las bacterias usan diversas moléculas para la señalización extra- e intracelular. Sienten mezclas de pequeñas moléculas para obtener información del ambiente extracelular y de su estatus fisiológico intracelular. La integración de la información de la señalización extra- e intracelular permite responder a los cambios en su ambiente (Camilli y Bassler, 2006). El QS y la señalización mediante el mensajero secundario c-di-GMP regulan procesos fisiológicos similares como formación de biopelícula, síntesis de EPS y motilidad. Diversas correlaciones a nivel experimental han permitido proponer que el QS y la vía del c-di-GMP presentan varios tipos de conexiones (Ryan y col., 2006; Rahman y col., 2007; Waters y col., 2008; Hammer y Bassler, 2009; Ueda y Wood, 2009).

A continuación se recopilan los principales hallazgos por nuestro laboratorio del sistema de QS tipo AI-1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 que nos han llevado a considerarlo como un factor clave en la regulación del desarrollo de biopelícula. En células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre versus las crecidas en sulfato de hierro durante la fase estacionaria, se induce la expresión del gen *afeI* que codifica para la sintasa de AHLs correlacionándose con una mayor presencia de C12-AHL y C14-AHL (Farah y col., 2005). A su vez, éstas moléculas adicionadas exógenamente a células de *A. ferrooxidans* aumentan la formación de biopelícula en azufre (González, 2010; Tesis de Doctorado Sigde Mamani). Por otro lado, una mezcla de AHLs compuesta por OH-(C10, C12, C14, C16)-AHLs y oxo-(C10, C12, C14, C16)-AHLs, disminuyó la adherencia de *A. ferrooxidans* a los granos de pirita (Ruiz y col., 2008) y la formación de biopelícula (esta tesis). Todo esto nos ha permitido concluir que el sistema de QS de tipo AI-1 regula la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans* ATCC23270.

La producción preferencial de C12-AHL y C14-AHL en azufre durante la fase estacionaria y su capacidad de inducir la formación de biopelícula en *A. ferrooxidans*, así como el hecho que las células conformando biopelícula sobre la perla de azufre presentan niveles del mensajero c-di-GMP significativamente mayores que las células planctónicas nos llevan a interrogarnos sobre posibles interconexiones entre el sistema de QS de tipo AI-1 y el c-di-GMP: ¿Tienen C12-AHL y C14-AHL la capacidad de inducir actividad DGC o inhibir actividad PDE? ¿Tiene la mezcla de AHLs la capacidad de inhibir actividad DGC o activar actividad PDE? Para tratar de contestar estas preguntas, nuestro laboratorio planifica realizar ensayos de qPCR y microarreglos de DNA.

Por otro lado, la presencia de bajos niveles de c-di-GMP en la fase estacionaria del crecimiento de *A. ferrooxidans* (Figura 8, pag. 55), podría deberse a un posible control mediante QS, así como lo reportaron para *V. cholerae* (Waters y col., 2008).

Los resultados presentados en esta tesis abren una nueva forma de explorar los mecanismos de adaptación a nivel molecular en microorganismos asociados a procesos de biolixiviación y especialmente la regulación del estilo de vida en la biopelícula de *A. ferrooxidans*.

## 5. CONCLUSIONES

*Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 posee una vía funcional de señalización mediante el mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP). Esta vía está involucrada en la respuesta al sustrato energético y en la regulación del desarrollo de biopelícula de *A. ferrooxidans*.

El sistema de QS de tipo AI-1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, está involucrado en la regulación del desarrollo de la biopelícula de *A. ferrooxidans* sobre pirita.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, J., I. Peirano, and C. A. Jerez. 1986. *In vivo* and *in vitro* methylation of proteins from chemolithotrophic microorganisms: a possible role in chemotaxis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8:309–317.
- Acuña, J., J. Rojas, A. M. Amaro, H. Toledo, and C.A. Jerez. 1992. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: comparison with the *Escherichia coli* chemosensory system. *FEMS Microbiol Lett.* 75:37–42.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaler, J. Zhang, Z. Zheng, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST – A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Amaro A.M., M. Seeger, R. Arredondo, M. Moreno, and C. A. Jerez. 1993. The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids, p. 577–585. In A. E. Torma, M. L. Apel, and C. L. Brierley (ed.), *Biohydrometallurgical technologies*. The Minerals, Metals and Material Society, Warrendale, Pa.
- Andersen, J., A. Heydorn, M. Hentzer, L. Eberl, O. Geisenberger, B. Christensen, S. Molin, and M. Givskov. 2001. *gfp*-Based *N*-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:575–585.
- Aravind, L., and E. V. Koonin. 1998. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends. Biochem. Sci.* 23:469–472.
- Arredondo R., García A. and Jerez C.A. 1994. Partial Removal of Lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* Affects Its Adhesion to Solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2846–2851.
- Barreto, M., E. Jedlicki, and D. S. Holmes. 2005. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2902–2909.
- Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, and E. L. Sonnhammer. 2002. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 30:276–280.
- Beyhan, S., A.D. Tischler, A. Camilli, and F.H. Yildiz. 2006. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J. Bacteriol.* 188:3600–3613.
- Bobrov, A.G., O. Kirillina, and R.D. Perry. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:123–130.
- Blosser-Middleton, R. S., and K. M. Gray. 2001. Multiple *N*-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J. Bacteriol.* 183:6771–6777. Bobrov, A.G., O. Kirillina, and R.D. Perry. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:123–130.
- Brasseur, G., G. Levican, V. Bonnefoy, D. Holmes, E. Jedlicki, and D. Lemesle-Meunier. 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1656:114–126.
- Brouillette, E., M. Hyodo, Y. Hayakawa, D. K. Karaolis, and F. Malouin. 2005. 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 49:3109–3113.
- Bruscella, P., C. Appia-Ayme, G. Levicán, J. Ratouchniak, E. Jedlicki, D. S. Holmes, and V. Bonnefoy. 2007. Differential expression of two bc1 complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology.* 153:102–110.
- Burmølle, M., J. S. Webb, D. Rao, L. H. Hansen, S. J. Sørensen, and S. Kjelleberg. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3916–3923.

- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25:169–193.
- Camilli, A., and B. L. Bassler. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science.* 311:1113–1116.
- Castang, S., B. Chantegrel, C. Deshayes, R. Dolmazon, P. Gouet, R. Haser, S. Reverchon, W. Nasser, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and A. Doutheau. 2004. N-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:5145–5149.
- Castro M., L. M. Ruíz, A. Barriga, C. A. Jerez, D. Holmes, and N. Guiliani. 2009. C-di-GMP pathway in biomining bacteria. *Adv. Mat. Res.* 71–73:223–226.
- Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. C. Amiot, B. Giese, U. Jenal, and T. Schirmer. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17084–17089.
- Charlton, T. S., R. de Nys, A. Netting, N. Kumar, M. Hentzer, M. Givskov, and S. Kjelleberg. 2000. A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography-mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environ. Microbiol.* 2:530–541.
- Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte, and U. Jenal. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* 280:30829–30837.
- Christen, B., M. Christen, R. Paul, F. Schmid, M. Folcher, P. Jenoe, M. Meuwly, and U. Jenal. 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* 281:32015–32024.
- Christen, M., B. Christen, M.G. Allan, M. Folcher, P. Jenö, S. Grzesiek, and U. Jenal. 2007. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:4112–4117.
- Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711–745.
- Davey, M. E., and G. A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847–867.
- Davies, D.G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280:295–298.
- Davis, R. A. Jr., A. T. Welty, J. Borrego, J. A. Morales, J. G. Pendon, and J. G. Ryan. 2000. Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environ. Geol.* 39:1107–1116.
- Deppe, U., H. H. Richnow, W. Michaelis, and G. Antranikian. 2005. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles.* 9:461–470.
- Drobner, E., H. Huber, and K. O. Stetter. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2922–2923.
- Dubern, J. F., B. J. Lugtenberg, and G. V. Bloemberg. 2006. The *ppuI-rsaL-ppuR* Quorum-Sensing System Regulates Biofilm Formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by Controlling Biosynthesis of the Cyclic Lipopeptides Putisolvins I and II. *J. Bacteriol.* 188:2898–2906.
- Duquesne, K., S. Lebrun, C. Casiot, O. Bruneel, J. C. Personné, M. Leblanc, F. Elbaz-Poulichet, G. Morin, and V. Bonnefoy. 2003. Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6165–6173.
- Farah, C., M. Vera, D. Morin, D. Haras, C. A. Jerez, and N. Guiliani. 2005 Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7033–7040.
- Farah C. (2006) Caracterización del Quorum Sensing Tipo AI-1 en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Memoria de título Ingeniero en Biotecnología Molecular. Escuela de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Ferreira, R. B., L. C. Antunes, E. P. Greenberg, and L. L. McCarter. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J. Bacteriol.* 190:851–860.



- Frezza, M., S. Castang, J. Estephane, L. Soulere, C. Deshayes, B. Chantegrel, W. Nasser, Y. Queneau, S. Reverchon, and A. Doutheau. 2006. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* 14:4781–4791.
- Frezza, M., L. Soulere, S. Reverchon, N. Guilliani, C. Jerez, Y. Queneau, and A. Doutheau. 2008. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorg. Med. Chem.* 16:3550–3556.
- Fuqua, W.C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269–275.
- Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:11–21.
- Galperin, M.Y. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol* 6:552–567.
- Garcia, B., C. Latasa, C. Solano, F. Garcia-del Portillo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 54: 264–277.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D., and Sand W. 1998. Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2743–2747.
- Gehrke, T., R. Hallmann, K. Kinzler, and W. Sand. 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water. Sci. Technol.* 43:159–167.
- Geske, G.D., R. J. Wezeman, A. P. Siegel, and H. E. Blackwell. 2005. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J. Am. Chem. Soc.* 127:12762–12763.
- Ghannoum, M., and G. O'Toole. 2004. *Microbial Biofilms*. ASM press, Washington, DC.
- Ghauri, A., N. Okibe, and D. B. Johnson. 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. *Hydrometall.* 85: 72–80.
- González, A. 2010. Estudio del papel del sistema de Quorum Sensing tipo AI-1 en la biolixiviación de cobre en *A. ferrooxidans* y otras bacterias del consorcio biominero. Tesis de Doctor en Biotecnología. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.
- González-Toril, E., E. Llobet-Brossa, E. O. Casamayor, R. Amann, and R. Amils. 2003. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4853–4865.
- Guilliani, 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.
- Güvener, Z. T., and C. S. Harwood. 2007. Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66:1459–1473.
- Haft, D. H., J. D. Selengut, and O. White. 2003. The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic Acids Res.* 31:371–373.
- Hammer, B. K., and B. L. Bassler. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 50:101–104.
- Hammer, B. K., and B. L. Bassler. 2009. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. *J. Bacteriol.* 191:169–177.
- Harman, J. G. 2001. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1547:1–17.
- Harneit K., Göksel A., Kock D., Klock J., Gehrke T., and Sand W. 2005. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium Editors: Harrison S, Rawlings D and Petersen J. ISBN: 1-920051-17-1.

- Harneit, K., A. Göksel, D. Kock, J. Klock, T. Gehrke, and W. Sand. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometall.* **83**: 245–254.
- Heinhorst, S., S. H. Baker, D. R. Johnson, P. S. Davies, G. C. Cannon, and J. M. Shively. 2002. Two Copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Curr. Microbiol.* **45**:115–117.
- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Rev.* **7**:263–273.
- Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:14422–14427.
- Hickman, J. W., and C. S. Harwood. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **69**:376–389.
- Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
- Hisert, K.B., M. MacCoss, M. U. Shiloh, K. H. Darwin, S. Singh, R. A. Jones, S. Ehrt, Z. Zhang, B. L. Gaffney, S. Gandotra, D. W. Holden, D. Murray, and C. Nathan. 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol. Microbiol.* **56**:1234–1245.
- Hofmann, K., P. Bucher, L. Falquet, A. Bairoch. 1999. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**:215–219.
- Horswill, A. R., P. Stoodley, P. S. Stewart, and M. R. Parsek. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**:371–380.
- Huber, B., K. Riedel, M. Hentzer, A. Heydorn, A. Gotschlich, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol.* **147**:2517–2528
- Jenal, U. 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:185–191.
- Johnson M.R., Montero C.I., Connors S.B., Shockley K.R., Bridger S.L. and Kelly R.M. 2005. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Mol. Microbiol.* **55**:664–674.
- Jonas, K., O. Melefors, and U. Römling. 2009. Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol.* **4**:341–358.
- Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**:195–202.
- Kader, A., R. Simm, U. Gerstel, M. Morr, and U. Römling. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **60**:602–616.
- Kaplan, H.B., and E. P. Greenberg. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**:1210–1214.
- Karatan, E., T. R. Duncan, and P. I. Watnick. 2005. NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J. Bacteriol.* **187**:7434–7443.
- Kastbjerg, V. G., K. F. Nielsen, I. Dalsgaard, M. Rasch, J.B. Bruhn, M. Givskov, and L. Gram. 2007. Profiling acylated homoserine lactones in *Yersinia ruckeri* and influence of exogenous acyl homoserine lactones and known quorum-sensing inhibitors on protease production. *J. Appl. Microbiol.* **102**:363–374.
- Klausen, M., A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**:61–68.
- Kolter, R., and E. P. Greenberg. 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature.* **441**:300–302.

- Krogh, A., B. Larsson, G. vonHeijne, and E. L. L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**:567–580.
- Kulesakara, H., V. Lee, A. Brencic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel, and S. Lory. 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:2839–2844.
- Kumar M., and D. Chatterji. 2008. Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiol.* **154**:2942–2955.
- Labbate, M., S. Y. Queck, K. S. Koh, S.A. Rice, M. Givskov, and S. Kjelleberg. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **186**:692–698.
- Ledgham, F., C. Soscia, A. Chakrabarty, A. Lazdunski, and M. Foglino. 2003. Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res. Microbiol.* **154**:207–213.
- Lee, V. T., J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and S. Lory. 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**:1474–1484.
- 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.
- Lewin, B. 2004. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River, NJ 07458. USA. 1027p. ISBN 0-13-143981-2.
- Lithgow, J. K., A. Wilkinson, A. Hardman, B. Rodelas, F. Wisniewski-Dyé, P. Williams, and J. A. Downie. 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* **37**:81–97.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. P. Chepenik, S. A. Waldman. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**:375–414.
- Lynch, M. J., S. Swift, D. F. Kirke, C. W. Keevil, C. E. Dodd, and P. Williams. 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* **4**:18–28.
- Mackintosh, M. E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* **105**:215–218.
- Mangold, S., K. Harneit, T. Rohwerder, G. Claus, and W. Sand. 2008. Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization of leaching bacteria on pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:410–415.
- Martínez-Wilson, H. F., R. Tamayo, A. D. Tischler, D. W. Lazinski, and A. Camilli. 2008. The *Vibrio cholerae* hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *J. Bacteriol.* **190**:6439–6447.
- Méndez-Ortiz, M.M., M. Hyodo, Y. Hayakawa, and J. Membrillo-Hernández. 2006. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J. Biol. Chem.* **281**:8090–8099.
- Merighi M., V.T. Lee, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and S. Lory. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **65**:876–895.
- Møller, S., C. Sternberg, J. B. Andersen, B. B. Christensen, J. L. Ramos, M. Givskov, and S. Molin. 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:721–732.
- Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole. 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1

- biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol. Microbiol.* **63**:656–679.
- Moons, P., C. W. Michiels, and A. Aertsen. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* **35**:157–168.
  - Moré, M. I., L. D. Finger, J. L. Stryker, C. Fuqua, A. Eberhard, and S. C. Winans. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*. **272**:1655–1658.
  - Morgan, R., S. Kohn, S. H. Hwang, D. J. Hassett, and K. Sauer. 2006. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**:7335–7343.
  - Nakai, K., and P. Horton. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**:34–36.
  - Newell, P.D., R. D. Monds, and G. A. O'Toole. 2009. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:3461–3466.
  - Parro, V., M. Moreno-Paz, and E. González-Toril. 2007. Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays. *Environ. Microbiol.* **9**:453–464.
  - Parsek, M. R., D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Cronan Jr., and E. P. Greenberg. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:4360–4365.
  - Parsek, M. R., and E. P. Greenberg. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13**:27–33.
  - Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Gen. Dev.* **18**:715–727.
  - Paul, B. J., M. B. Berkmen, and R. L. Gourse. 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:7823–7828.
  - Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**:1203–1210.
  - Pesavento, C., and R. Hengge. 2009. Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:170–176.
  - Pollastri, G., D. Przybylski, B. Rost, and P. Baldi. 2002. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins*. **47**:228–235.
  - Pratt, J. T., R. Tamayo, A.D. Tischler, and A. Camilli. 2007. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* **282**:12860–12870.
  - Pratt, J. T., E. McDonough, and A. Camilli. 2009. PhoB Regulates Motility, Biofilms, and Cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **191**:6632–6642.
  - Pretorius, I. M., D. E. Rawlings, and D. R. Woods. 1986. Identification and cloning of *Thiobacillus ferrooxidans* structural *nif* genes in *Escherichia coli*. *Gene*. **45**:59–65.
  - Prigent-Combaret, C., O. Vidal, C. Dorel, and P. Lejeune. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:5993–6002.
  - Pronk, J. T., W. M. Meijer, W. Hazeu, J. P. van Dijken, P. Bos, and J. G. Kuenen. 1991. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on Formic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2057–2062.
  - Rahman, M., R. Simm, A. Kader, E. Basseres, U. Römling, and R. Möllby. 2007. The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **273**:172–179.
  - Ramirez, P., N. Guiliani, L. Valenzuela, S. Beard, and C. A. Jerez. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4491–4498.
  - Rashid, M. H., K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum

- sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:9636–9641.
- Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. Annu. Rev. Microbiol. 56:65–91.
  - Reguera, G., R. B. Pollina, J. S. Nicoll, and D. R. Lovley. 2007. Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. J. Bacteriol. 189:2125–2127.
  - Reiness, G., H. L. Yang, G. Zubay, and M. Cashel. 1975. Effects of guanosine tetraphosphate on cell-free synthesis of *Escherichia coli* ribosomal RNA and other gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72:2881–2885.
  - Rivas, M., M. Seeger, D. S. Holmes, and E. Jedlicki. 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Biol. Res. 38:283–297.
  - Rivas, M., M. Seeger, E. Jedlicki, and D. S. Holmes. 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 73:3225–3231.
  - 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.
  - Römling, U., M. Gomelsky, and M.Y. Galperin. 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol. Microbiol. 57:629–639.
  - Römling, U., and D. Amikam. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr. Opin. Microbiol. 9:218–228.
  - Ross, P., Y. Alón, H. Weinhouse, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, and M. Benziman. 1986. Control of cellulose synthesis *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. Carbohydr. Res. 149:101–117.
  - Rowe, O. F., J. Sanchez-Espana, K. B. Hallberg, and D. B. Johnson. 2007. Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. Environ. Microbiol. 9:1761–1771.
  - Ruiz, L.M., S. Valenzuela, M. Castro, A. González, M. Frezza, L. Soulère, T. Rohwerder, Y. Queneau, A. Doutheau, W. Sand, C. Jerez, and N. Guiliani. 2008. AHL communication is a widespread phenomenon in *Acidithiobacillus ferrooxidans* species and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. Hydrometallurgy. 94:133–137.
  - Ryan, R.P., Y. Fouhy, J.F. Lucey, L.C. Crossman, S. Spiro, Y.W. He, L.H. Zhang, S. Heeb, M. Cámara, P. Williams, and J.M. Dow. 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103:6712–6717.
  - Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, B. L. Jiang, Y. Q. He, J. X. Feng, J. L. Tang, and J. M. Dow. 2007. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. Mol. Microbiol. 63:429–442.
  - Ryjenkov, D. A., M. Tarutina, O. V. Moskvina, and M. Gomelsky. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. J. Bacteriol. 187:1792–1798.
  - Ryjenkov, D.A., R. Simm, U. Römling, and M. Gomelsky. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. J. Biol. Chem. 281:30310–30314.
  - Sand W., and Gehrke T. 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Res. Microbiol. 157:49–56.
  - Schaefer, A. L., D. L. Val, B. L. Hanzelka, J. E. Jr. Cronan, and E. P. Greenberg. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:9505–9509.
  - Schaefer, A.L., T. A. Taylor, J. T. Beatty, and E. P. Greenberg. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. J. Bacteriol. 184:6515–6521.

- Schippers A., and Sand W. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulphur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:319–321.
- Schmidt, A.J., D.A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* **187**:4774–4781.
- Schwartz, J. H. 2001. The many dimensions of cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:13482–13484.
- Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**:1123–1134.
- Simm, R., A. Lusch, A. Kader, M. Andersson, and U. Römling. 2007. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol.* **189**:3613–3623.
- Slater, H., M. Crow, L. Everson, and G. P. Salmond. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol. Microbiol.* **47**:303–320.
- Soullère, L., N. Guilliani, Y. Queneau, C.A. Jerez, and Doutheau A. 2008. Molecular insights into quorum sensing in *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria via molecular modelling of the transcriptional regulator AfeR and of the binding mode of long-chain acyl homoserine lactones. *J. Mol. Model.* **14**:599–606.
- Steidle, A., M. Allesen-Holm, K. Riedel, G. Berg, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2002. Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6371–6382.
- Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183–215.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link, and R. R. Breaker. 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science.* **321**:411–413.
- Tao, F., Y. W. He, D.H.Wu, S. Swarup, and L. H. Zhang. 2010. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J. Bacteriol.* **192**:1020–1029.
- Tal, R., H. C. Wong, R. Calhoon, D. Gelfand, A. L. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana, and M. Benziman. 1998. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**:4416–4425.
- Tamayo, R., A.D. Tischler, and A. Camilli. 2005. The EAL Domain Protein VieA is a Cyclic Diguanylate Phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **280**:33324–33330.
- Tamayo, R., J. T. Pratt, and A. Camilli. 2007. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:131–148
- Tamayo, R., S. Schild, J. T. Pratt, and A. Camilli. 2008. Role of cyclic Di-GMP during *el* tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the *in vivo*-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infect. Immun.* **76**:1617–1627.
- Tarutina, M., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **281**:34751–34758.
- Taylor, B. L. 2007. Aer on the inside looking out: paradigm for a PAS-HAMP role in sensing oxygen, redox and energy. *Mol. Microbiol.* **65**:1415–1424.
- Thomas, D. N., and G. S. Dieckmann. 2002. Ocean Science - Antarctic Sea ice--a habitat for extremophiles. *Science.* **295**:641–644.

- Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo, S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann. 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* **188**:2681–2691.
- Tischler, A.D., and A. Camilli. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**:857–869.
- Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar, and J. F. Banfield. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature.* **428**:37–43.
- Ueda, A., and T. K. Wood. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* **5**(6):e1000483.
- Ulrich, L. E., E. V. Koonin, and I. B. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**:52–56.
- Valdés, J., I. Pedroso, R. Quatrini, R. J. Dodson, H. Tettelin, R. 2<sup>nd</sup> Blake, J. A. Eisen, and D. S. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics.* **9**:597.
- Valenzuela, S., A. Banderas, C. A. Jerez, and N. Guiliani. 2007. p. 293–306. Chapter 13 in: Donati, Edgardo R., Sand Wolfgang (ed.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. ISBN-10: 1-4020-5588-9. ISBN-13: 9781402055881 Springer.
- Waters, C. M., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and B. L. Bassler. 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. *J. Bacteriol.* **190**:2527–2536.
- Wagner-Döbler, I., V. Thiel, L. Eberl, M. Allgaier, A. Bodor, S. Meyer, S. Ebner, A. Hennig, R. Pukall, and S. Schulz. 2005. Discovery of complex mixtures of novel long-chain quorum sensing signals in free-living and host-associated marine alphaproteobacteria. *Chembiochem.* **6**:2195–2206.
- Watnick, P., and R. Kolter. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**:2675–2679.
- Weinberg, Z., J. E. Barrick, Z. Yao, A. Roth, J. N. Kim, J. Gore, J. X. Wang, E. R. Lee, K. F. Block, N. Sudarsan, S. Neph, M. Tompa, W. L. Ruzzo, and R. R. Breaker. 2007. Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res.* **35**:4809–4819.
- Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:365–404.
- Witte, G., S. Hartung, K. Buttner, and K. P. Hopfner. 2008. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol. Cell.* **30**:167–178.
- Yarzabal, A., C. Appia-Ayme, J. Ratouchniak, and V. Bonnefoy. 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology.* **150**:2113–2123.
- Zhu, J., M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, and J. J. Mekalanos. 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:3129–3134.



## AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency

Lina María Ruiz<sup>a</sup>, Susana Valenzuela<sup>a</sup>, Matias Castro<sup>a</sup>, Alex Gonzalez<sup>a</sup>, Marine Frezza<sup>b</sup>, Laurent Soullère<sup>b</sup>, Thore Rohwerder<sup>c</sup>, Yves Queneau<sup>b</sup>, Alain Doutheau<sup>b</sup>, Wolfgang Sand<sup>c</sup>, Carlos A. Jerez<sup>a</sup>, Nicolas Guiliani<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Bacterial Communication Unit, Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences and Institute for Cell Dynamics and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile

<sup>b</sup> Laboratoire de Chimie Organique, UMR 5246-ICBMS CNRS, Université Lyon 1, INSA, Lyon, France

<sup>c</sup> Biofilm Centre Aquatische Biotechnologie, Universität Duisburg – Essen, Duisburg, Germany

### ARTICLE INFO

Available online 24 June 2008

#### Keywords:

Quorum sensing  
Acyl-homoserine lactones  
Biofilm  
Biomining  
*A. ferrooxidans*

### ABSTRACT

Biofilm development plays a pivotal role in the bioleaching process. Quorum sensing (QS) is recognized as one of the main regulatory ways of extracellular polymeric substances (EPS) production and biofilm formation in bacteria. Previous works revealed that *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 strain possesses a functional QS type AI-1 system. However, there is neither available data concerning the presence of a QS system in other *A. ferrooxidans* strains nor any other biomining bacterial species. Thus, in this work, different strains of *A. ferrooxidans* (ATCC 19859, ATCC 1927, ATCC 33020, DSMZ 583, DSMZ 9464), *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSMZ 504, DSMZ 9463, DSMZ 11478) and *Leptospirillum ferrooxidans* (DSMZ 2391, DSMZ 2705) were screened for their ability to produce QS-signaling molecules [acyl-homoserine lactone (AHLs)]. Thin-layer chromatography (TLC) analysis revealed that all the *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produced AHL-signaling molecules while both tested *L. ferrooxidans* strains did not. Nevertheless, by using bioinformatic tools to screen the genome sequence of a *Leptospirillum* sp. type III belonging to an AMD biofilm, a QS type AI-1 locus in which the structural organization is different from that of *A. ferrooxidans* has been identified. The effect of synthetic AHLs and AHL-analogues on attachment of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to pyrite was analyzed. Interestingly, preliminary results suggested that some of these molecules change the rate and extent of bacterial attachment to pyrite. The production of AHLs by *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains, the identification of a QS type AI-1 locus in *Leptospirillum* sp. type III and the impact of AHLs and AHL-analogues on the pyrite adhesion of *A. ferrooxidans* cells open new perspectives for the (bio)mining industry to eventually improve bioleaching process and control the acid mine drainage (AMD) contamination.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The attachment and adhesion of acidophilic bacteria to the sulfidic energy source and the subsequent biofilm formation are prerequisites for mineral dissolution in natural environments and industrial operations. Therefore, a thorough understanding of the molecular mechanisms involved in the control and regulation of biofilm formation would be of great importance to control the bioleaching process from the biomining industry and the acid mine drainage (AMD) damages.

Biofilm formation is a complex process that can be regulated at different levels through diverse mechanisms. The most studied mechanism that controls biofilm development is quorum sensing (QS) signaling (Waters and Bassler, 2005). QS is a cell-to-cell signaling

system that functions by means of diffusible autoinducer (AI) signal molecules that allow the regulation of cellular processes in a manner that depends on the density of the microbial population.

Recently, a functional QS system type AI-1 involving two divergent genes *afel* and *afeR* has been identified in the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2005). Overexpression of the protein Afel in *Escherichia coli* and the characterization of associated synthesis of AHLs demonstrated that Afel is an AHL synthase (Farah et al., 2005). *A. ferrooxidans* produces AHLs with acyl chains whose length oscillates between 8 and 16 carbons and presents substitutions of the type oxo- and hydroxyl- in C-3 (3-hydroxy-C8-AHL, 3-hydroxy-C10-AHL, C12-AHL, 3-oxo-C12-AHL, 3-hydroxy-C12-AHL, C14-AHL, 3-oxo-C14-AHL, 3-hydroxy-C14-AHL, and 3-hydroxy-C16-AHL). The AHL hydroxy substitution was independent of the nature of the culture medium whereas the keto substitution was displayed only in cells grown on sulfur and thiosulfate. Besides, the transcription of *afel* gene is higher in sulfur- and thiosulfate-grown cells with respect to iron-grown cells and appears to be related to phosphate metabolism (Farah et al., 2005). Based on this experimental background,

\* Corresponding author. Unidad de Comunicación Bacteriana, Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Tel.: +56 978 7241.

E-mail address: [nguilian@uchile.cl](mailto:nguilian@uchile.cl) (N. Guiliani).



different authors suggested that the QS system type AI-1 could regulate biofilm formation in *A. ferrooxidans* (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2005; Valenzuela et al., 2006; Valenzuela et al., 2007).

This work attempts to examine if the quorum sensing type AI-1 system identified in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is a widespread phenomenon in *A. ferrooxidans* species and other biomining bacteria. Knowledge of the molecular mechanisms that regulate biofilm formation in biomining bacteria such as *A. ferrooxidans* is limited. Therefore, the involvement of the AHL-signaling molecules in the attachment of the type strain *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to mineral surfaces was examined. Since marker exchange mutagenesis for the construction of QS mutants in *A. ferrooxidans* is still very difficult to carry out, we decided to use different synthetic AHLs and AHL-analogues that have been evaluated as potential inhibitors and/or activators of QS in other microorganisms (Castang et al., 2004; Geske et al., 2005; Frezza et al., 2006).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacteria

The following strains of biomining bacteria obtained from culture collections were used: (i) six strains of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 type strain, ATCC 19859, ATCC 1927, ATCC 33020, DSMZ 583, DSMZ 9464; (ii) three strains of *Acidithiobacillus thiooxidans* DSMZ 504, DSMZ 9463, DSMZ 11478; two strains of *Leptospirillum ferrooxidans* DSMZ 2391, DSMZ 2705.

### 2.2. Growth media and culture conditions

*A. ferrooxidans* strains were grown in ferrous iron-containing modified 9K medium at pH 1.5 as described previously, and growth on elemental sulfur was done at pH 2.5 with 5% (wt/v) sulfur prills (Amaro et al., 1991). Growth of *A. ferrooxidans* strains in thiosulfate was done at pH 4.6 in DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate as described before (Ramírez et al., 2004). *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* strains were grown on their corresponding DSMZ medium.

### 2.3. Southern analysis

Genomic DNAs were obtained by using the Wizard Genomic DNA Purification Kit for Gram-negative bacteria, as described by Promega. 5 µg of purified genomic DNA was digested by EcoRI and HindIII restriction enzymes (New England Biolabs) at 37 °C during 4 h. After separation of the restriction enzyme-digested DNA fragments by electrophoresis, they were denatured and transferred to a positively charged nylon membrane (Immobilon-NY+; Millipore) by the semi-dry capillary method (Sambrook and Russel, 1989). <sup>32</sup>P labelled-*afel* probe was obtained by using the NEBlot kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's recommendations. Prehybridizations and hybridizations were accomplished as described by Sambrook and Russel (1989). <sup>32</sup>P-signal detection was carried out by using the PhosphorImager (Molecular Imager FX; Biorad).

### 2.4. AHL-signaling molecules determination

Extracts for analytical thin-layer chromatography (TLC) and LC-MS-MS were prepared from 600-ml cultures. Bacteria were removed by centrifugation and the supernatant was extracted twice with equal volumes of dichloromethane (DCM) as described previously (Farah et al., 2005). Extracts were then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated to dryness.

For TLC plate analysis, dried samples were dissolved in 30–60 µl of HPLC-grade ethyl acetate. Samples (20–40 µl) were spotted onto C<sub>18</sub> reversed-phase TLC plates (Merck) along with a set of standards and developed with methanol/water (60:40; vol/vol). After development,

the TLC plates were air-dried and AHL-signaling molecules were detected by using as a bioreporter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) as described previously (Shaw et al., 1997). Briefly, 250 µl of an overnight culture of *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) AHL reporter strain grown in 25-ml LB medium with gentamicin 25 µg/ml was inoculated in AB minimal glucose medium (ABm) and grown during 8 h at 30 °C with shaking. The culture was then mixed with an equal volume of 1.5% TOP agar containing 80 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), and the preparation was spread over the surface of developed TLC plates. Overlaid TLC plates were incubated overnight at 30 °C in a closed plastic container. Production of AHL is visualized by the development of a blue color.

For LC-MS-MS analysis, residues were dissolved in 0.5 ml of HPLC-grade acetonitrile and analyzed by using reverse-phase liquid chromatography coupled with positive-ion electrospray ionization and ion trap mass spectrometry (LC-MS-MS) (Morin et al., 2003). In the case of 3-hydroxy-AHLs, their identification was done by comparison with synthetic 3-hydroxy-AHLs based on three criteria: MS-MS fragmentation product ions ([M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> and *m/z* 102), their relative intensities and HPLC retention times.

### 2.5. Attachment assay

This assay was carried out only with the type strain of *A. ferrooxidans*, ATCC 23270. It is based on the reduction of the number of planktonic cells in the solution due to the attachment of the bacteria to a mineral sulfide substratum (Gehrke et al., 1998; Harneit et al., 2006). Pyrite (FeS<sub>2</sub>) (Suior mine in Baia Mare, Romania) was the substratum used for the attachment assay. Ground FeS<sub>2</sub> was wet sieved to a grain size of 50–100 µm (Test sieves, Retsch, Germany). To remove ferric iron, the FeS<sub>2</sub> was boiled in 6 N HCl with stirring for 1 h. Then, the HCl was removed by washing extensively with distilled H<sub>2</sub>O. Next, sulfur compounds were extracted from the FeS<sub>2</sub> by washing twice with acetone. Finally, FeS<sub>2</sub> aliquots were put under vacuum and gassed with nitrogen and sterilized at 115 °C for 48 h (Schippers and Sand, 1999). For the attachment assay, 5 × 10<sup>9</sup> cells were incubated with 20% (w/v) FeS<sub>2</sub> in a final volume of 50-ml mineral salt solution in 100-ml Erlenmeyer flask. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 grown in FeSO<sub>4</sub> medium was harvested in the late exponential growth phase. Harvesting was performed by cross flow filtration (Hemoflow F60S, Fresenius, Germany) or centrifugation for 20 min at 6000 ×g, at 10 °C and the cells thus obtained were resuspended in 50 ml of mineral salts solution. Then, cell concentration was determined using a Thoma counting chamber (depth 0.02 mm, smallest square area 0.0025 mm<sup>2</sup>). Subsequently, cell concentration was adjusted at 1 × 10<sup>8</sup> cells per ml. Next, this cell suspension was distributed among 100-ml Erlenmeyer flasks. Bacteria harvested by centrifugation were supplemented with 0.2 g of ferric iron l<sup>-1</sup> and kept overnight at 17 °C to regenerate their EPS. Afterwards, AHLs or AHL-analogues were added and the mix was incubated for 1 h at 30 °C, at 180 rpm. Subsequently, 10 g of FeS<sub>2</sub> was added to each Erlenmeyer flask containing the assay mixture and agitated on a benchtop shaker (Type TR, Infors HT, Switzerland) at 120 rpm and room temperature for 8 h. Samples (1 ml) of the culture supernatant were taken at specific time intervals and the cell concentration was determined using a Thoma counting chamber. Cell counting was done with a light microscope (Zeiss) in phase contrast mode with 400-fold magnification.

## 3. Results

### 3.1. Quorum sensing type AI-1 system and biomining bacteria

In previous experiments, we reported that *A. ferrooxidans* type strain possesses a functional QS type AI-1 system and is able to produce nine different kinds of AHL-signaling molecules (Farah et al., 2005). To examine if the QS type AI-1 system is a widespread phenomenon in biomining bacteria, we analyzed if other strains of *A.*

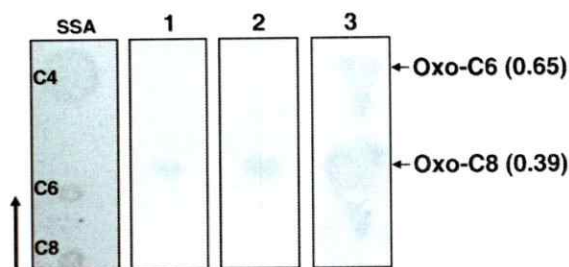


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of the AHL-signaling molecules purified from spent culture supernatant of *A. thiooxidans* strains DSMZ 504 (1), DSMZ 9463 (2) DSMZ 11478 (3). Detected molecules are indicated by arrows and respective Rf values are noted. SSA, Standard of synthetic AHLs composed of C4-AHL, C6-AHL and C8-AHL. The direction of solvent migration is marked with a vertical arrow.

*ferrooxidans* and other members of the biomining community, such as *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans*, are capable of producing AHL-signaling molecules. Dichloromethane extracts of spent culture supernatants were subjected to  $C_{18}$  reversed-phase TLC and tested for their ability to activate the *A. tumefaciens* reporter strain, as described in Materials and methods. This experiment revealed that all the tested *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produce AHL-signaling molecules while no reporter activity was detected in the *L. ferrooxidans* extracts suggesting that DSMZ 2391 and DSMZ 2705 strains of this bacterial species which belongs to *Leptospirillum* sp. type I, do not produce detectable amount of AHL-signaling molecules. However, a bioinformatic analysis of the complete and partial genome sequences of microorganisms present in an AMD biofilm (Tyson et al., 2004) allowed us to identify a QS type AI-1 locus for *Leptospirillum* sp. type III, as previously reported (Valenzuela et al., 2007). This locus is composed of two convergent genes, *ltxR* and *ltxI* (for *Leptospirillum* sp. type three), which code for putative proteins that are 50% and 59% similar to R and I proteins from *Geobacter uraniumreducens* Rf4. A third ORF was identified in the *ltxIR* intergenic region and it coded for a protein with 42% similarity to a transposase from *Bacillus halodurans* C-125.

The identified AHL-signaling molecules obtained for the three *A. thiooxidans* strains are shown in Fig. 1. The characteristic tailing spot (Shaw et al., 1997) and the estimated Rf values allowed us to determine that all the *A. thiooxidans* strains synthesize 3-oxo-C8-AHL (Fig. 1, lanes 1–3). Moreover, the DSMZ 11478 strain also produced 3-oxo-C6-AHL (Fig. 1, lane 3). As the same relative supernatant quantities were spotted onto the TLC plates, in our experimental conditions, the strain DSMZ 11478 appeared to overproduce oxo-C6-AHL and oxo-C8-AHL compared with the

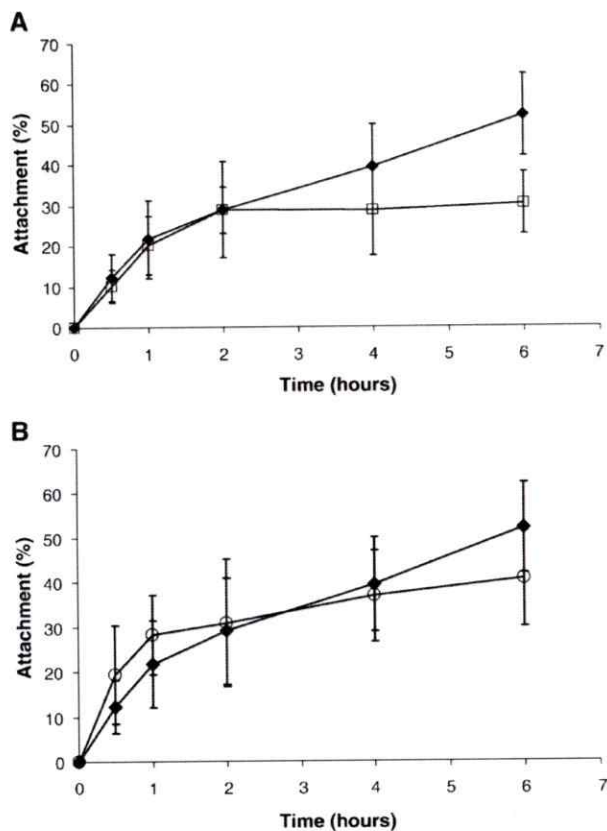


Fig. 3. Effects of an AHL mixture and an AHL-analogue on the attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite. A) AHL mixture (□) composed of hydroxyl-AHLs (C10, C12, C14, C16) and oxo-AHLs (C10, C12, C14, C16); B) AHL-analogue, 4-phenyl-3-oxo-HSL (○); (●), control without AHLs. Each result represents an average of six experiments. The bars show the standard deviation values.

other two strains. Since no *A. thiooxidans* genome sequence is currently available in the data base, it is actually impossible to know what kind of AHLs synthase family(ies) is(are) in charge of the production of oxo-C6-AHL and oxo-C8-AHL.

Regarding *A. ferrooxidans* strains, additional studies were performed to characterize more precisely the AHL-signaling molecules of the different strains. Besides, we compared the genomic organization of QS loci from

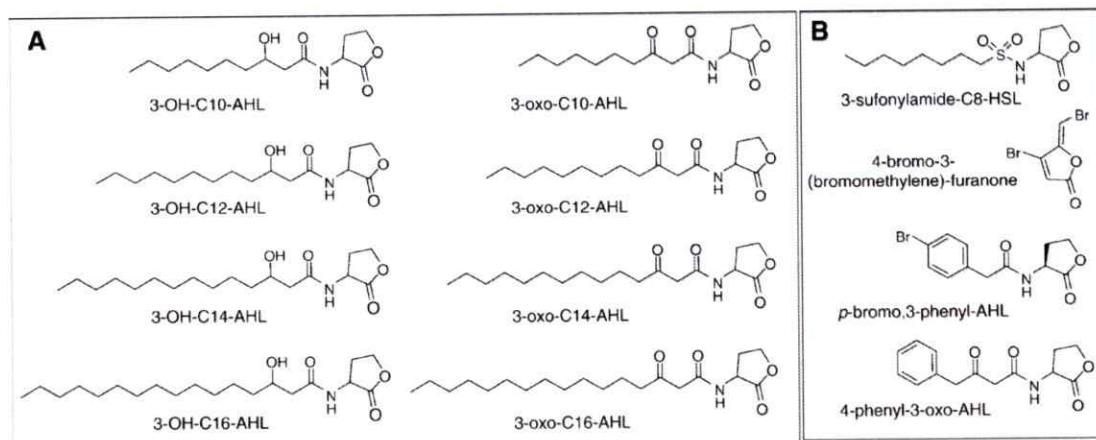


Fig. 2. Structures of AHLs (A) and AHL-analogues (B) used in this work.

three geographically and phylogenetically different *A. ferrooxidans* strains. LC–MS–MS revealed that all the *A. ferrooxidans* strains produced hydroxy-AHLs with an acyl-chain length ranging from C8 to C16 and in addition, strains ATCC 19859 and DSMZ 583 also synthesized C12-AHL and C14-AHL (data not shown). On the other hand, by using an *afel* labelled-probe, Southern blot analysis of genomic DNA digested by EcoRI and BamHI restriction enzymes revealed that the *afel* gene encoding for an AHL synthase was present in strains ATCC 19859, ATCC 33020 and DSMZ 9464 (data not shown). Therefore, in these strains *Afel* protein should be also responsible for the synthesis of some AHL molecules. However, as in the case in the *A. ferrooxidans* type strain, the presence of an AHL synthase belonging to the HdtS family cannot be excluded (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2007). Despite being isolated from different continents and in different kinds of mines and having different positions in an *A. ferrooxidans* phylogenetic tree (Karavaiko et al., 2003), the size similarities between the different EcoRI (1.3 kb) and HindIII (12 kb) positive restriction fragments revealed that the QS locus genomic organization of the *A. ferrooxidans* strains DSMZ 9464, ATCC 19859 and ATCC 33020 is similar to the type strain. These strongly suggest that the QS Type AI-1 locus was a widespread and conserved phenomenon in *A. ferrooxidans* species.

### 3.2. Quorum sensing type AI-1 system and mineral attachment

As the QS type AI-1 system appears to be a widespread phenomenon in *A. ferrooxidans* species and, at least, 7 of nine AHLs identified in the *A. ferrooxidans* type strain were characterized in other *A. ferrooxidans* collection strains (this work), all the attachment experiments were performed with the *A. ferrooxidans* type strain. To study the role of QS type AI-1 system in cell attachment to a mineral, we assessed the effects of synthetic AHL and AHL-analogues shown in Fig. 2. *A. ferrooxidans* cells were harvested by centrifugation, a condition in which a partial loss of EPS is induced. For the replenishment of their EPS, cells were left overnight in a mineral salt solution supplemented with ferric iron. In this way, a homogeneous bacterial population was obtained, allowing us to observe clearly the possible effects of AHLs and AHL-analogues.

Indeed, an AHL mixture, composed by hydroxyl-AHLs (C10, C12, C14, C16) and oxo-AHLs (C10, C12, C14, C16), inhibited cell attachment to pyrite by 42% (Fig. 3A). Six hours after the incubation with the AHL mixture, only 30% (30.4 ± 7.6) of the bacterial population was attached compared with 52% (52.2 ± 10.1) of attachment for the control bacterial population (not treated) (Fig. 3A). Similar attachment values (50%) were reported for the strain *A. ferrooxidans* 23270 (Barreto et al., 2005). However, the rate and extent of attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite vary depending on the strain (Ghuri et al., 2007) as well as with the batch of pyrite used (unpublished results). So far, we evaluated individually two molecules of the mixture: hydroxy-C16-AHL and the Oxo-C16-AHL; in our experimental conditions, none of these two compounds affected the attachment.

In addition, we analyzed several AHL-analogues. After 6 h of induction, a preliminary result revealed that the 4-phenyl-3-oxo-HSL derivative produced a decrease on the attachment level (22%; from 52.2 ± 10.1 to 40.7 ± 10.8) (Fig. 3B) while some of the AHL-analogues evaluated induced an increase on the attachment levels (Table 1). Variations in control data with the previous experiment (Fig. 3) were due to the use of different pyrite batches.

**Table 1**  
Effect of different AHL-analogues on attachment of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to pyrite

AHL-analogues	Attachment (%)
Control without AHL-analogues	39.4 ± 10.1
3-sulfonylamid-C8-AHL	47.1 ± 11
4-bromo-3-(bromomethylene)-furanone	49.9 ± 3.5
p-bromo-3-phenyl-HSL	55.4 ± 9.7

## 4. Discussion

Multiple microorganisms coexist in the environment as communities, competing for or sharing resources and often associated as biofilms. Cell–cell communication through AHL-signaling between different bacterial species inside a mixed biofilm has been reported (Riedel et al., 2001). On the other hand, different works revealed that mixed cultures composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* increase the yield of pyrite oxidation and, on the other hand, that EPS plays a pivotal role in this bioleaching process (Schippers and Sand, 1999; Gehrke et al., 2001; Harneit et al., 2006; Sand and Gehrke, 2006; Akcil et al., 2007). In many Gram-negative bacteria, EPS production and biofilm formation are regulated by QS type AI-1 (Lynch et al., 2002; Marketon et al., 2003).

Two relevant questions can be addressed for the bioleaching process: i) Does cell–cell communication occur in a mixed biofilm composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans*? ii) Are the AHL-signaling molecules involved in the efficiency of mineral colonization by bacterial cells?

To answer the first question, the production of AHL-signaling molecules by different *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* strains was analyzed. The results obtained revealed that all tested *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produce AHL-signaling molecules while both *L. ferrooxidans* strains do not. However, the presence of minor amounts of AHL-signaling molecules cannot be ruled out. On the other hand, it may be possible that even though *L. ferrooxidans* does not synthesize its own AHLs, it could detect exogenous AHLs synthesized by other microbial species belonging to its ecological niche through the expression of a *sdiA*-like gene, as is the case for *Escherichia* and *Salmonella* spp. (Michael et al., 2001). In *Escherichia* and *Salmonella* spp., the *SdiA* protein responds with the highest sensitivity to AHLs that have a keto modification at the third carbon and an acyl-chain length of 6 or 8 (Michael et al., 2001). Therefore, if a *SdiA*-like protein was present in *L. ferrooxidans* strains, these microorganisms could detect, at least, oxo-C6-AHLs and oxo-C8-AHLs produced by *A. thiooxidans*. All these data allowed us to hypothesize that an AHL communication could be effective inside bioleaching planktonic and/or biofilm communities. This cell–cell communication could certainly occur between i) different *A. ferrooxidans* strains, ii) different *A. thiooxidans* strains, and iii) *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains. In addition, to date it appears that *L. ferrooxidans* cannot talk through AHL-signaling molecules but there is no data to avoid thinking that it could hear the *A. ferrooxidans*/*A. thiooxidans* conversation.

The understanding of the molecular mechanisms involved in bacterial–mineral attachment and biofilm formation could be relevant to design biological strategies to improve bioleaching timing and efficiency. Thus, to address the second question, we tested the effect of AHL-analogues on the attachment of *A. ferrooxidans* cells to pyrite. Our preliminary results showed a small but significant tendency of the AHL mixture to inhibit attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite. However, these tendencies are preliminary results and further experiments will be required to identify which molecules and at what specific concentrations they affect adherence of this bacterium to pyrite. In addition, some AHL-analogues increased attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite whereas others inhibited its attachment. The present data suggest that the AHL-signaling molecules and probably *AfeR* protein from *A. ferrooxidans* – therefore the QS type AI-1 system – may be involved in its attachment to pyrite.

In conclusion, these results strongly suggest that QS interferences could be an appropriate strategy to improve or to prevent the pyrite (mineral) colonization by pure and/or mixed cultures and therefore to affect the timing and efficiency of the bioleaching process. Therefore, cost analysis and studies with different strains and with bacterial communities composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* will be of great importance.

## Acknowledgments

For LC–MS–MS facilities, we acknowledge D. Haras and D. Morin from the Laboratoire de Biologie et Chimie Marine (EA 3884), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France. We thank Dr. Violaine Bonnefoy for critical reading of the manuscript. This work was supported by FONDECYT 1040676, ECOS/CONICYT C05 B04, and ICM grant P 05-001-F. L.M. Ruiz was supported by a scholarship from DAAD.

## References

- Akci, A., Ciftci, H., Devci, H., 2007. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcocopyrite concentrate. *Mineral Engineering* 20, 310–318.
- Amaro, A.M., Seeger, M., Arredondo, R., Moreno, M., Jerez, C.A., 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173, 910–915.
- Barreto, M., Gehrke, T., Harnett, K., Sand, W., Jedlicki, E., Holmes, D., 2005. Unexpected insights into biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by genome analysis and experimental conditions. In: Harrison, S.T.L., Rawlings, D.E., Petersen, J. (Eds.), Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Cape Town, South Africa, pp. 817–825.
- Castang, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Dolmazon, R., Gouet, P., Haser, R., Reverchon, S., Nasser, W., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Doutheau, A., 2004. *N*-sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5145–5149.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A., Guiliani, N., 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7033–7040.
- Frezza, M., Castang, S., Estephane, J., Soulere, L., Deshayes, C., Chantegrel, B., Nasser, W., Queneau, Y., Reverchon, S., Doutheau, A., 2006. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4781–4791.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W., 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2743–2747.
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W., 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*—a model for structure–function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Sci. Technol.* 43, 159–167.
- Geske, G.D., Wezeman, R.J., Siegel, A.P., Blackwell, H.E., 2005. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12762–12763.
- Chauri, A., Okibe, N., Johnson, D.B., 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: the significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy* 85, 72–80.
- Harnett, K., Gökse, A., Kock, D., Klock, J., Gehrke, T., Sand, W., 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83, 245–254.
- Karavaiko, G.I., Turova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Lysenko, A.M., Kolganova, T.V., Ageeva, S.N., Muntyan, L.N., Pivovarova, T.A., 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 113–119.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* 4, 18–28.
- Marketon, M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A., Gonzalez, J.E., 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185, 325–331.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F., Ahmer, B.M., 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* 183, 5733–5742.
- Morin, D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C., Haras, D., 2003. On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr. A* 1002, 79–92.
- Ramirez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S., Jerez, C.A., 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4491–4498.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., 2001. *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147, 3249–3262.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S., Jedlicki, E., 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 38, 283–297.
- Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3225–3231.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 1989. *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sand, W., Gehrke, T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157, 49–56.
- Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 319–321.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan Jr., J.E., Rinehart, K.L., Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6036–6041.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428, 37–43.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Jerez, C.A., 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24, 197–211.
- Valenzuela, S., Banderas, A., Jerez, C.A., Guiliani, N., 2007. Chapter 13. In: Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer, Netherlands, pp. 293–306.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.

ANEXO 2

1 **The extremophile bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a**  
2 **c-diGMP signaling pathway that could play a significant role in**  
3 **bioleaching process**

4  
5  
6  
7 Ruiz, L.M.<sup>1</sup>, Castro M.<sup>1</sup>, Barriga, A.<sup>2</sup>, Jerez C.A.<sup>3</sup> and Guilian, N.<sup>1\*</sup>

8  
9  
10  
11 <sup>1</sup>Laboratorio de Comunicaciones Bacterianas, Departamento de Biología, Facultad de  
12 Ciencias, Universidad de Chile. <sup>2</sup>CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y  
13 Farmacéuticas, Universidad de Chile. <sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular y  
14 Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, e Instituto de  
15 Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB), Universidad de Chile.

16  
17  
18  
19  
20 \*Corresponding author: Mailing address: <sup>1</sup>Laboratorio de Comunicaciones Bacterianas,  
21 Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

22 Phone: 56 2 9787241

23 E-mail: nguilian@uchile.cl

24

## ANEXO 2

### ABSTRACT

25

26

27       The extremophilic bacterium *Acidithiocillus ferrooxidans* forms biofilms over  
28 metallic sulphur whose formation is mediated by an exopolysaccharide matrix (EPS). In  
29 many Gram-negative bacteria, EPS production is regulated by quorum sensing and c-di-  
30 GMP signaling pathway. In this work we present results regarding to the  
31 characterization of the c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans*. A bioinformatic search in  
32 the genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 revealed the presence of several  
33 genes encoding for proteins involved in the c-di-GMP pathway, including diguanylate  
34 cyclases (DGCs), phosphodiesterases (PDEs) and two PilZ-effector proteins. MS/MS  
35 analysis allowed to identify c-di-GMP in nucleotide extracts from *A. ferrooxidans* cells  
36 grown in different energetic substrates. By using a specific substrate, a c-di-GMP  
37 phosphodiesterase activity has been characterized in *A. ferrooxidans* proteic-crude  
38 extracts. In addition, qRT-PCR assays revealed that genes encoding for DGC, PDE and  
39 PilZ proteins are transcribed. Gene overexpressions in *Escherichia coli* demonstrated  
40 that AFE1360 and AFE1373 are diguanylate cyclases. On the other hand, c-di-GMP  
41 levels in sulphur medium were higher in prill-adhered cells comparing to planktonic  
42 cells. Finally, highest levels of c-di-GMP have been characterized in *A. ferrooxidans*  
43 cells grown on solid energetic substrates comparing with soluble substrates. All together  
44 these results allow to conclude that *A. ferrooxidans* possesses a functional c-di-GMP  
45 pathway that could play a key role in biofilm formation.

46

47

48

## INTRODUCTION

49

50

51 *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an acidophilic Gram-negative bacterium of great  
52 importance in biomining processes. To gain energy out, this bacterium require to  
53 oxidize ferrous iron or reduce sulphur components presents in its ecological niche. Its  
54 energetic metabolism is responsible for the solubilization of metals imbedded in ores  
55 and directly involved in biomining processes (40, 48).

56 Binding and adherence of *A. ferrooxidans* to the mineral surface and the subsequent  
57 biofilm formation improve the leaching efficiency. For this reason, there is great interest  
58 in understanding the molecular mechanisms involved in biofilm formation. Such  
59 binding is carried out through an exopolysaccharide (EPS) matrix (16, 47, 48). This  
60 acidophilic bacterium forms a monolayer biofilm composed by bacterial cells embedded  
61 in a EPS matrix whose role is fundamental in keeping close contact with the mineral,  
62 thus improving metallic sulphur oxidation (18).

63 Biofilm formation is a complex process that can be regulated in several ways through  
64 many mechanisms. This regulation can be highly restricted according to the specific  
65 ecologic niche (24). The most studied mechanisms controlling biofilm development are  
66 quorum sensing (QS) and the secondary messenger cyclic-bis (3',5') diguanylic acid (c-  
67 di-GMP) signaling pathway. Moreover, different works have recently demonstrated that  
68 in several bacterial species both pathways are interconnected (43, 59).

69 C-di-GMP plays a central role in controlling surface attachment in many bacterial  
70 systems. It controls the transition from planktonic to biofilm lifestyles through the  
71 control of EPS production and regulation of pili and flagellum apparatus (4, 15, 21, 57,  
72 58). C-di-GMP is synthesized by diguanylate cyclase (DGC) and degraded by  
73 phosphodiesterase (PDE) enzymes. DGC proteins are characterized by a GGDEF

## ANEXO 2

74 domain meanwhile PDE proteins can present EAL or HD-GYP domains (23, 43, 46,  
75 49). C-di-GMP levels can affect enzymatic activity, protein-complexe assembly and  
76 gene expression. Until now, five classes of c-di-GMP effector-proteins capable to bind  
77 c-di-GMP molecules have been identified (3, 12, 21, 29, 30, 34, 55). PilZ, PelD and  
78 LapD affect proteic complexes involved in the biosynthesis of alginate, cellulose  
79 synthase, flagellum and pilli (9, 29, 31, 34, 38, 45). In contrast, FleQ and Clp affect the  
80 transcriptional regulation of genes involved in EPS synthesis (20) and virulence activity  
81 (55).

82

83 In the course to identify molecular mechanisms involved in biofilm formation in  
84 extremophile bacteria involved in bioleaching process, we have previously reported the  
85 existence of a functional QS system in *A. ferrooxidans* (11, 60). In this study, we provide  
86 first evidences that a c-di-GMP pathway is functional in the extremophile bacteria *A.*  
87 *ferrooxidans* and the intracellular levels of c-di-GMP increase during the biofilm  
88 physiological state suggesting a key role.

89

90

## MATERIALS AND METHODS

91

92 **Bacterial strains and growth media.** *A. ferrooxidans* ATCC 23270 was grown as  
93 described previously in ferrous iron-containing modified 9K medium at pH 1.5 (1) or in  
94 DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate at pH 4.4 (39).

95 **Bioinformatic tools.** Motifs involved in c-di-GMP metabolism were used as query  
96 sequences to search in the genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270  
97 (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi>). The analysis of the sequence  
98 was performed with the software Artemis (Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit).



## ANEXO 2

99 The potential candidate protein identified with Artemis was used to formulate a BlastP  
100 search of the nonredundant database at NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Further  
101 characterization of putative proteins was performed employing bioinformatical tools in  
102 Expert Protein Analysis System portal (<http://www.expasy.org/>).

103

104 **RNA extraction.** Cells cultivated under different conditions were harvested in different  
105 growth phases and washed with acid water (pH 2.0) and 10 mM sodium citrate  
106 solutions. This was followed by alkaline lysis and the extraction of RNA was performed  
107 by a modified hot-phenol method as described previously (17). Briefly, there were  
108 performed two extractions with acid phenol, two extractions with acid  
109 phenol/chloroform and two extractions with chloroform. The extracted RNA was  
110 precipitated with 0.1 V of sodium acetate 3 M and 1 V of absolute ethanol. The  
111 obtained RNA was washed with ethanol at 70% and then digested with DNase I.  
112 Finally, the total RNA obtained was checked by 1% agarose gel electrophoresis and  
113 quantified by spectrometry.

114

115 **Quantitative reverse transcriptase PCR (qPCR).** Calibration curves with serial  
116 dilutions of *A. ferrooxidans* genomic DNA were constructed. Based on the molecular  
117 weight of *A. ferrooxidans* genomic DNA ( $1.97 \times 10^9$  g/mol) and the copy number of  
118 each gene into the genome, the amount of RNA copies was estimated. Random primers  
119 (Promega) were used to generate cDNA pools from 1 µg of RNA from each sample.  
120 cDNA samples were subjected to qPCR with specific oligonucleotides designed with  
121 LightCycler probe design software (Roche) (Table 1) using the kit Light Cycler Fast  
122 Star DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and  
123 the Rotor-Gene 6000 thermocycler (Corbett). Amplification included a previous step at

## ANEXO 2

124 95°C during 10 min and 40 cycles of the following steps: 10 s at 95°C, 15 s at 62°C,  
125 and 20 s at 72°C. Results were calculated by the comparative cycle threshold method,  
126 where the amount of target mRNA is normalized to an internal control (16S rRNA)  
127 amplified as previously described (33, 61). At least three independent experiments were  
128 done.

129

130 **C-di-GMP purification from *A. ferrooxidans*.** The nucleotides were extracted with  
131 organic solvent (22). Briefly, bacteria from cultures grown with different energy sources  
132 and on the late exponential phase of growth were harvested. Cellular pellets were  
133 washed twice with acid water pH 1.5 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and elsewhere with sodium citrate (pH  
134 7.0). Then, bacterial cells were resuspended in 1 ml of 50 mM Tris, pH 8.5 and then  
135 sonicated on ice. Afterward, lysates were spun at 13000 r.p.m., 4°C for 30 min. The  
136 supernatant was saved in a clean tube. Subsequently, one volume of supernatant (which  
137 an aliquot was stored for protein quantification) was combined with one volume of  
138 chloroform, 4 volumes of methanol and 3 volumes of nanopure water. Next, samples  
139 were mixed with vortex, pelleted at 13000 r.p.m. for 15 min and the aqueous phase rich  
140 in nucleotides were evaporated under vacuum and stored at -80°C.

141 For the preparation of nucleotidic extract from *A. ferrooxidans* cells conforming  
142 biofilms on sulfur prills, pyrite or cooper concentrated, planktonic cells were first  
143 removed. For this, cultures were centrifuged at low velocity and cell-supernatants saved  
144 in a clean flask. Then solid substrates were washed three times with fresh M9K medium  
145 to discard the remaining planktonic cells. Therefore solid substrates were incubated with  
146 fresh M9K medium supplemented with 0.05 % of Triton X-100 during 5 min and hardly  
147 vortexed. After that, the adhered-cell were recovered by centrifugation at 5000 rpm  
148 during 3 min. Cellular pellets were resuspended in 1 ml of 50 mM Tris, pH 8.5 and

## ANEXO 2

149 sonicated on ice. Protein concentrations of total protein extracts were quantified and  
150 finally the nucleotidic extracts were prepared as indicated previously.

151

152 **Detection and quantification of c-di-GMP by mass spectrometric analysis.**

153 Measures were performed according to the protocol previously described by Simm et al.  
154 (2004). C-di-GMP synthetic was prepared at 175 µg/ml concentration in 80%  
155 acetonitrile, 20 mM ammonium acetate. *A. ferrooxidans* and *E. coli* nucleotidic extracts  
156 were diluted 1:10 in 80% acetonitrile, 20 mM ammonium acetate. The spectrograms  
157 were obtained on an electrospray-ionisation (ESI) ion-trap (IT) mass spectrometer (MS)  
158 Esquire 4000 ESI-IT (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). Synthetic c-di-GMP and  
159 samples (100 µl) were loaded directly into the ESI-IT-MS using a syringe (Cole-  
160 Parmer, IL-USA) the flux was 2.5 µL/min. The nebulization was performed at 300°C,  
161 10.0 psi and 5 L/min. Samples were analyzed in negative ion detection mode. Based on  
162 (i) the m/z of 689 [M-H]<sup>-</sup> of the molecular ion and (ii) MS/MS-fragmentation pattern of  
163 the molecular ion and the corresponding m/z signals 344 and 538, synthetic c-di-GMP  
164 was used as a reference to identify c-di-GMP in cell nucleotidic extracts.

165 For the quantification of c-di-GMP levels in the nucleotide extracts from *A.*  
166 *ferrooxidans*, samples were analyzed by separation with HPLC (Agilent 1100, Agilent  
167 Technologies) coupled to mass spectrometry. The column C18 150x1.0mm, 4 µm y 90  
168 Å (Jupiter-Proteo, Phenomenex Inc., CA-USA) was directly-connected with the mass  
169 spectrometer (without UV detection and without split of flux). HPLC system was  
170 controlled through the software ChemStation v A.10.02 (Agilent 1100, Agilent  
171 Technologies). The HPLC separation was performed with the phase A 10 mM  
172 tributylamine, 15 mM acetic acid and 3% methanol, the flux was 0.1 ml/min, and  
173 methanol gradient (62).

## ANEXO 2

174

175 **Evaluation of phosphodiesterase activity from *A. ferrooxidans* total extracts.** The  
176 artificial substrate bis(*p*-nitrophenyl) phosphate which presents similar structure with *c*-  
177 di-GMP was chosen for the evaluation of PDE activity (4, 43). Briefly, a standard  
178 reaction mixture contained 1 mg of total proteic extract, 5 mM of bis-*p*NPP (Sigma-  
179 Aldrich Co., St. Louis, MO), 50 mM Tris-HCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 8.5. Standard assays  
180 were performed at 37 °C for 1 hour and the release of *p*-nitrophenol (*p*NP) was  
181 quantified at 410 nm (4). Determination of PDE activity was carried out in duplicate  
182 from at least two independent assays.

183 **Molecular cloning of *A. ferrooxidans* genes encoding proteins with GGDEF/EAL**  
184 **domains.** To construct recombinant strains of *E. coli* overexpressing *A. ferrooxidans*  
185 putative proteins involved in *c*-di-GMP metabolism, genomic DNA from  
186 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 strain was used as template for PCR amplification (Table  
187 1). *AFE0053*, *AFE1360*, *AFE1373* and *AFE1379* genes were amplified by PCR with  
188 primers containing insert restriction sites for cloning purposes (Table 1). PCR products  
189 were purified from 1 % agarose gel with the Wizard kit (Promega) and they were cloned  
190 independently in pGEM-T plasmids (Promega). The different constructions  
191 pGEM-T::*AFE0053*, pGEM-T::*AFE1360*, pGEM-T::*AFE1373* were produced into  
192 *E. coli* JM109 strain and purified with Miniprep Wizard kit (Promega). Then, purified  
193 pGEM-T-constructions were digested with *Nhe*I or *Nde*I and *Bam*HI. DNA fragments  
194 containing the AFE-genes were purified from agarose gel and cloned into the  
195 *Nhe*I/*Bam*HI or *Nde*I/*Bam*HI sites of the expression vector pET-21b(+) (Novagen).  
196 Then the different plasmids pET-21a(+)::*AFE0053*, pET-21a(+)::*AFE1360* and pET-  
197 21a(+)::*AFE1373* were transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain. All the plasmid  
198 constructions were checked by automatic DNA sequencing (MACROGEN, Korea).

## ANEXO 2

199

200 **Determination of Congo red binding from different *E. coli* strains overexpressing**  
201 ***A. ferrooxidans* genes encoding for putative DGC/PDE proteins.**

202 Qualitative and quantitative assays to detect cellulose biosynthesis in *E. coli*  
203 BL21(DE3) and TOP10 strains overexpressing *A. ferrooxidans* genes encoding proteins  
204 with GGDEF domains were performed by measuring the cell binding of Congo red  
205 (CR). In both kinds of experiments, we used as a positive control an *E. coli* strain  
206 overexpressing the DGC PleD, kindly provided by Dr. Jenal (10). For the assessment of  
207 a pdar colony morphology, which is indicative for cellulose biosynthesis (63), 3 µl of an  
208 overnight culture of each strain was spotted onto LB agar plates without NaCl  
209 supplemented with CR (40 µg/ml), ampicillin (100 µg/ml) and with IPTG (1 mM) or  
210 not. Spots were grown for 20 h at 37 °C and then for 48 h at room temperature (51).  
211 The quantitative assay was adapted from protocols previously reported (29, 52). Once  
212 more, 3 µl of an overnight culture of each strain was spotted onto LB agar plates  
213 without NaCl supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and with IPTG (1 mM) or not.  
214 Plates were incubated for 24 h at 37°C. The bacterial content of each spot was collected  
215 with a spatula, re-suspended in 1 ml of 1% tryptone supplemented CR (50 µg/ml) and  
216 incubated for 90 min at 37°C at 150 rpm. Bacterial cells were collected by  
217 centrifugation. The amount of cell-bound CR was quantified by measuring values of  
218 absorbance at 490 nm of CR in standard solutions and free-cell supernatants (remaining  
219 CR). Results obtained were normalized with the total protein content in each cellular  
220 pellet.

221

222

## RESULTS

223

## ANEXO 2

### 224 *In silico* identification of the molecular components of the c-di-GMP pathway.

225 With the purpose to characterize the molecular mechanisms that could regulate biofilm  
226 formation in *A. ferrooxidans*, we initiated the characterization of the main components  
227 of the c-di-GMP signaling pathway in *A. ferrooxidans*. Analysis of the genomic  
228 sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 allowed us to identify 5 open reading frames  
229 (ORFs) that encode for putative DGCs and PDEs, metabolic enzyme of the c-di-GMP  
230 pathway (Table 2). Four of them (AFE0053, AFE1360, AFE 1373 and AFE1379)  
231 encode for proteins with both GGDEF/EAL domains instead one (AFE1852) encodes  
232 for a protein with a single EAL domain. Besides, we identify 3 ORFs (AFE2122, AFE  
233 2309 and AFE 2473) encode for proteins with HD metal-dependent phosphohydrolases  
234 domain. As it occurs in other bacteria, the four proteins with GGDEF/EAL domains  
235 also possess sensing domains including PAS and GAF which are involved in the  
236 signalling transduction (13, 42). Interestingly, site I motif which is involved in allosteric  
237 control of c-di-GMP level (8, 10) have been identified in the four GGDEF/EAL  
238 proteins. As reported for most bacteria (14, 42) the domains GGDEF, EAL and HD of  
239 *A. ferrooxidans* proteins are mainly predicted in the cytosolic compartment. In addition  
240 to these 5 putative c-di-GMP metabolic enzymes, two ORFs (AFE1172 and AFE1374)  
241 that encode for a putative c-di-GMP effector proteins with a PilZ domain has been  
242 identified (Table 2). The putative effector protein AFE1374 is located downstream of  
243 the GGDEF/EAL protein AFE1373. Both have the same orientation suggesting that  
244 they could form a functional unit.

245 Based on these bioinformatic results, we decided first to determine if some of these  
246 genes are transcribed and secondly to identify DGC and PDE activities in *A.*  
247 *ferrooxidans* cell by measuring the presence of c-di-GMP molecules in nucleic extract  
248 and PDE activities in proteic extracts, respectively.

## ANEXO 2

249

250 **Genes involve in the c-di-GMP pathway are transcribed in *A. ferrooxidans*.** RT-  
251 PCR experiments were initially developed. Results revealed that seven of the eight  
252 ORFs encoding for c-di-GMP metabolic enzymes and the ORF encoding for the PilZ  
253 domain are transcribed (not shown). However, to quantify the relative expression of  
254 each of these genes, qPCR assays were realized (Figure 1). Out of the genes that encode  
255 for metal-dependent phosphohydrolases with the HD domain, AFE2309 show the  
256 highest number of copies of mRNA ( $226.000 \pm 91.590$ ) whereas AFE2473 show the  
257 lowest number of copies of mRNA ( $48.850 \pm 2.050$ ). Also, genes that encode for  
258 proteins with GGDEF and EAL domains AFE1379 present the highest number of  
259 copies of mRNA ( $79.600 \pm 8.061$ ). In contrast, AFE1373 present the lowest number of  
260 copies of mRNA ( $19.700 \pm 2.545$ ).

261

262 **Secondary messenger c-di-GMP is present in the extremophile bacterium**  
263 *A. ferrooxidans*. The presence of c-di-GMP was evaluated through mass spectrometry  
264 analysis of nucleic extracts of *A. ferrooxidans* cells grown with different energy  
265 sources. By comparing with MS/MS spectrograms obtained from c-di-GMP standard  
266 solution (Figure 2A), 344 m/z and 538 m/z signals corresponding to characteristic c-di-  
267 GMP fragments were identified in nucleotide extract of *A. ferrooxidans* cells grown in  
268 thiosulphate medium (Figure 2B). Same results were obtained with nucleotide extracts  
269 of *A. ferrooxidans* cells grown in sulfur and iron media (not shown). This allows us to  
270 conclude that *A. ferrooxidans* is capable to synthesize c-di-GMP molecules and  
271 therefore that this bacterium possesses a functional DGC activity. However, this DGC  
272 activity in *A. ferrooxidans* could be associated to one or even several of the four  
273 proteins with GGDEF domains (AFE0053, AFE1360, AFE1373, AFE1379).

## ANEXO 2

274

275 *A. ferrooxidans* possesses a specific c-di-GMP phosphodiesterase activity. To  
276 answer this point, bis-pNPP, an artificial substrate (Figure 3A) which present similar  
277 structure with c-di-GMP was used to measure the presence of PDE activity in total  
278 proteic extracts of *A. ferrooxidans* as described by Bobrov *et al.* (2005). Positive results  
279 concerning a functional PDE activity were obtained with total proteic extracts from *A.*  
280 *ferrooxidans* cells grown in thiosulfate and iron (Figure 3B) and sulfur (not shown).  
281 While no differences on the PDE activity between exponential and stationary phases in  
282 total proteic extracts from iron grown-cells (Figure 3B), it clearly appeared that in  
283 thiosulfate-grown cells the PDE activity increases during the stationary phase (Figure  
284 3B). In agreement with this result, the quantification of the c-di-GMP levels in  
285 nucleotide extracts of *A. ferrooxidans* cells grown in thiosulphate revealed that the  
286 amount of c-di-GMP is lower during stationary phase than exponential phase (Figure  
287 S1). Both results clearly revealed that *A. ferrooxidans* possesses a PDE activity. In  
288 addition, preliminary results suggest that during the stationary phase the PDE activity  
289 decreased 6-fold times in sulfur-grown cells comparing to thiosulphate-grown cells (not  
290 shown).

291 **Analysis of DGC and PDE activities in *E. coli* BL21 (DE3) recombinant strains**  
292 **harbouring plasmids with *A. ferrooxidans* genes encoding proteins with**  
293 **GGDEF/EAL domains.** As mentioned above, the identified DGC activity may result  
294 from one or more of the four proteins with GGDEF domain. To identify, at least, one  
295 DGC enzyme, all the genes encoding for both GGDEF/EAL domains were cloned and  
296 overexpressed in *E.coli*. Then recombinant strains were tested for cellulose-production  
297 phenotype and c-di-GMP production. On the other hand, due to the presence of the EAL



## ANEXO 2

298 domains, PDE activity was also analyzed in total proteic extracts obtained from these  
299 recombinant strains.

300 Wild type *E. coli* strains are not capable to synthesize c-di-GMP molecules themselves  
301 and therefore need to be complement with plasmid harbouring gene encoding for DGC  
302 enzyme to produce cellulose (51). Then, the cellulose-production phenotype can be  
303 tested by using a Congo red solid medium in which bacterial colonies show a  
304 characteristic red color (51). Qualitative analysis of Congo red binding does not allow  
305 us to get definitive conclusions (Figure 4A). *E. coli* recombinant strains harbouring the  
306 *A. ferrooxidans* genes do not present a strong red morphotype. Red color appeared  
307 higher than the negative control but significantly lower than the PleD positive control  
308 (Figure 4A). This could be explained by the fact that the gene encoding the DGC PleD  
309 is cloned in the pET-42 vector while the other constructs have been developed in the  
310 pET-21b vector. Thus quantitative assays in which binding of Congo red is measured  
311 were performed (Figure 4B). Regarding to the negative control, no change was observed  
312 in the recombinant strain harbouring the *A. ferrooxidans* AFE0053 gene. However,  
313 levels of Congo red assimilation after IPTG induction were increased 2-fold in strains  
314 harbouring the *A. ferrooxidans* AFE1360 and AFE1373 genes (Figure 4B) suggesting  
315 that both genes encode for DGC proteins.

316 For undetermined reasons, the cloning of gene AFE1379 into the pET-21b  
317 overexpression vector failed. Then, to overpass this technical failure, gene AFE1379  
318 were cloned into the overexpression pBADTOPO vector (Invitrogen) and transformed  
319 into the *E. coli* TOP10 strain. In addition genes AFE0053 and AFE1360 corresponding  
320 in the previous quantitative assay to negative and positive results, respectively, were  
321 also cloned in this overexpression vector. No differences have been detected between

## ANEXO 2

322 negative control and strain harbouring the plasmid. pBADTOPO::AFE1379 (Figure S2).  
323 As expected, similar results were obtained with the pBADTOPO::AFE0053 and  
324 pBADTOPO::AFE1360 constructs comparing with the pET21b ones.

325 On the other hand, comparing with the recombinant strain *E. coli* BL21 (DE3)  
326 harbouring with pET-21b without insert, no significant increase of PDE activity was  
327 detected in total proteic extracts obtained from the four recombinant strains (not  
328 shown). In agreement with this result, c-di-GMP molecules were detected in nucleic  
329 extract obtained from all the recombinant strains (Table 3; Figure S3). All these results  
330 strongly suggested that AFE0053, AFE1369, AFE1373 and AFE1360 encode for DGC  
331 proteins.

332 **Analysis of the probable role of c-di-GMP pathway in the regulation of biofilm**  
333 **formation in *A. ferrooxidans*.** To understand if the c-di-GMP pathway can play a key  
334 role in biofilm formation of *A. ferrooxidans*, we decided to compare first the c-di-GMP  
335 levels between planktonic and adhered sulfur (Figure 5A) and on the other hand  
336 between *A. ferrooxidans* cells grown on different energetic substrates (Figure 5B). C-di-  
337 GMP levels increased 11-fold in cells conforming biofilm on sulphur prills ( $568 \pm 199.3$   
338 ng c-di-GMP/mg protein) comparing with planktonic cells ( $56.4 \pm 20.1$  ng c-di-  
339 GMP/mg protein) harvested from the same culture (Figure 5A). In agreement with this  
340 result c-di-GMP levels are higher in solid than soluble substrates (Figure 5B). These  
341 results are clear evidences that as it occurs in other Gram-negatives bacteria, c-di-GMP  
342 pathway is involved in biofilm formation in *A. ferrooxidans*.

343

344

345

346

**DISCUSSION**

347 The presence of c-di-GMP has been reported for several Gram negative bacteria and a  
348 few Gram positive bacteria. To our knowledge, this is the first study about c-di-GMP  
349 pathway in an extremophile bacterium of great interest in biomining industry.  
350 Moreover, we reported the presence of c-di-GMP independent of the energy source,  
351 iron, sulphur or tiosulphate (Figure 5).

352 The analysis of *A. ferrooxidans* genomic sequence revealed the presence of 8 genes that  
353 encode for proteins involve in c-di-GMP metabolism (Table 2). We have determined  
354 that in our experimental conditions the four proteins with GGDEF/EAL can synthetize  
355 c-di-GMP in *E.coli* (Table 3). This likely redundancy suggest that diverse cellular  
356 functions could be regulated by the c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans* during the  
357 different states of growth or according to the environmental conditions faced by the  
358 bacterium. This last argument is very probable taking into account that the four DGC of  
359 *A. ferrooxidans* have different sensor domains (PAS and GAF) in the amine terminal  
360 that may be sensing diverse environmental signals. Which parameters are sensed by  
361 PAS and GAF on the acidophilic environment of *A. ferrooxidans*? Bioleaching and  
362 biooxidation of minerals are industrial processes which involve a consortium of  
363 acidophilic iron- and/or sulfur-oxidizing bacteria (40). Acid mine drainage is the natural  
364 medium of the consortium, which usually present a high content of iron, sulfate, salt,  
365 Al, Mg, Co, Cr, Ni, Pb and As, with low dissolved oxygen (35). The iron oxidizer  
366 bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* is part of the consortium in its natural medium  
367 genes encoding putative proteins with GGDEF/EAL and PAS domains are upregulated  
368 (35). *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus caldus* are also part of the

## ANEXO 2

369 consortium of chemolithoautotrophic acidophilic biomining bacteria. These bacteria as  
370 well encode EAL, GGDEF, HD and GGDEF-EAL domain proteins (6).  
371  
372 C-di-GMP mediated signalling pathways are not equally abundant in diverse bacterial  
373 species (42). For instance, *Vibrio cholera* encodes 12 EAL, 30 GGDEF, 9 HD-GYP,  
374 and 10 GGDEF-EAL domain proteins (14). C-di-GMP plays a key role in regulating the  
375 changes in *V. cholerae* gene expression that occur during the shift from aquatic to host  
376 environments (54). *Mycobacterium smegmatis* has a single bifunctional protein with  
377 both GGDEF and EAL domains key for long-term survival under conditions of  
378 nutritional starvation (28). Is there a relationship between bacterial environment and the  
379 quantity of proteins dedicated to c-di-GMP signaling pathway? Another strain of *A.*  
380 *ferrooxidans* the ATCC 53993, have 3.5 times more putative proteins dedicated to the c-  
381 di-GMP metabolism that the strain ATCC 23270 used in this study. The number might  
382 be significant according to the special environment of bacteria. However, the most  
383 remarkably is the regulation around each protein belonging to c-di-GMP pathway (25).  
384 Possibly, a few numbers of genes dedicated to the c-di-GMP pathway could be  
385 compensated with a high level of expression. For example, the plant pathogenic  
386 bacterium *Xanthomonas campestris* encodes 37 proteins with GGDEF, EAL, and HD-  
387 GYP domains. The expression of genes of cyclic di-GMP pathway was measured in *X.*  
388 *campestris* 8004 by RT-PCR. The relative levels of gene transcripts are ranging  
389 between 100 and 1500 copies (XC1411 and XC3163) (44). In contrast, *A. ferrooxidans*  
390 encodes 4 proteins with GGDEF/ EAL domains and the relative levels of gene  
391 transcripts are ranging between 19700 and 79600 copies (Figure 1).  
392

## ANEXO 2

393 We observed that in our experimental conditions between the four DGC with  
394 GGDEF/EAL domain, AFE0053, AFE1360, AFE1373 and AFE1379, just AFE1360 is  
395 able to activate a significant production of cellulose (Figure 4). The different activities  
396 could depend on the concentration or activation of the respective protein. Also, the  
397 domain structure might to some extent determine the amount of c-di-GMP produced  
398 (26). Overexpression of AdrA, which contains only a GGDEF output domain, leads to  
399 pmol amounts of c-di-GMP (51), which corresponds to concentrations approximately  
400 10.000 times over the basal cellular concentration. Other two proteins of *Salmonella*,  
401 STM2123 and STM3388, both are GGDEF/EAL domain proteins, lead to c-di-GMP  
402 concentrations approximately just five and three times over the basal level respectively  
403 (26). The c-di-GMP pool are regulated by the activity of DGC and PDE proteins to  
404 occur on several levels, ranging from transcriptional control of the respective genes over  
405 stimulation of enzymatic activity by signal transduction. Other regulatory mechanisms  
406 are spatial compartmentalization of proteins, specific protein-protein interactions and  
407 product inhibition of the enzymatic activity (7, 42).

408

409 Until recently, most of the studied proteins with combined GGDEF-EAL domains have  
410 DGC or PDE activity (42, 46). Nevertheless, it has been established that proteins with  
411 GGDEF and EAL domains can have both DGC and PDE activities, depending on the  
412 environmental conditions (28). The *Rhodobacter sphaeroides* bacteriophytochrome  
413 BphG1 has GGDEF and EAL domains, and had light-independent PDE activity, BphG1  
414 undergo partial cleavage into the EAL domain and the larger specie with DGC activity,  
415 which was dependent on biliverdin and activated by light (56). Likewise, ScrC is a  
416 protein from *Vibrio parahaemolyticus* that contains both GGDEF and EAL domains.  
417 ScrC has intrinsic DGC and PDE activities, which are controlled by ScrAB. With its

## ANEXO 2

418 absence; ScrC works as DGC, whereas in the presence of ScrAB, ScrC works as PDE  
419 (12). Finally, “MSDGC-1” the single protein with both GGDEF and EAL domains of  
420 *Mycobacterium smegmatis*, shows DGC and PDE activity. This protein is essential for  
421 long-term survival under conditions of nutritional starvation (28). Under our  
422 experimental conditions, the proteins with GGDEF and EAL domains, AFE0053,  
423 AFE1360, AFE1373 and AFE1379, were observed acting as DGCs. So which is the  
424 protein playing the role of c-di-GMP specific PDE in *A. ferrooxidans* ATCC 23270?  
425 Just one putative protein “AFE1852” with an EAL domain is encoded in its genome.  
426 However, we were unable to amplify this gene with any primer and several conditions  
427 of PCR optimization. Taking into account the studies of DGC and PDE bifunctional  
428 proteins, it is very probable that the ones of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 also can have  
429 PDE activity. Although, it is difficult predict activity from primary protein structure,  
430 according to the presence of motifs all *A. ferrooxidans* GGDEF/EAL proteins could be  
431 DGC active or PDE active. Furthermore, we look for PDE with the signature HD-GYP  
432 in the *A. ferrooxidan* ATCC 23270, but it does not have, instead encode for 3 metal-  
433 dependent phosphohydrolases with the HD domain. This phosphohydrolases includes  
434 enzymes as bacterial dGTPase and the stringent-response guanosine polyphosphate  
435 [ppGpp(p)] hydrolase/synthetase (SpoT/RelA), plus a variety of proteins and domains  
436 that are associated with nucleotidyltransferases and helicases. The HD-domain proteins  
437 might function as cyclic-nucleotide phosphodiesterases in prokaryotes (2).

438

439 The c-di-GMP levels during stationary phase of *A. ferrooxidans* were very low (Figure  
440 S1). This behavior was either observed in *V. cholerae* (62). Conversely, the c-di-GMP  
441 levels in *M. smegmatis* show a three times increase during stationary phase, suggesting  
442 a role in adaptation for the secondary messenger (28, 62). The difference in c-di-GMP

## ANEXO 2

443 levels during stationary phase between *V. cholerae* (62), *M. smegmatis* (28) and *A.*  
444 *ferrooxidans* (Figure S1), could be due to the different fisiology of these bacteria.

445

446 As it occurs in another bacteria (5, 21, 41, 42, 50, 51, 57, 58), the presence of 10 times  
447 c-di-GMP levels higher in the *A. ferrooxidans* biofilm (Figure 5A), in addition with the  
448 fact that the levels are higher when *A. ferrooxidans* is growth in a solid energy substrate  
449 (Figure 5B), suggest a role of c-di-GMP pathway in the integration of environmental  
450 conditions for the regulation of biofilm formation in *A. ferrooxidans*.

451

452 Currently, several types of c-di-GMP effector are recognized, the PilZ family of  
453 proteins, the transcription factor FleQ (AAA $\sigma^{54}$  domain), the PelD protein, c-di-GMP-  
454 binding I site in many GGDEF domains and riboswitches with a conserved RNA  
455 domain "GEMM" (9, 19, 20, 25, 29, 36, 38, 53). The type IV pilus assembly protein  
456 with PilZ domain (AFE1172) may be one of the probable effectors of the c-di-GMP  
457 pathway in *A. ferrooxidans*. As in other Gram-negative bacteria, AFE1172 should be  
458 involved in the regulation of twitching motility. The motility mediated by tipe IV pili in  
459 cells is required for the development of a biofilm with sophisticated architecture (27).  
460 The previous idea suggests that c-di-GMP signaling pathway may be involved in the  
461 regulation of mineral colonization and biofilm formation by *A. ferrooxidans*. The other  
462 probable effectors of the c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans* are 13 putative proteins  
463 with FleQ domain most of them are sigma-54 dependent transcriptional regulators, three  
464 are nitrogen regulatory proteins and one is type IV fimbriae expression regulatory  
465 protein. The above raise the targets of c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans* ATCC  
466 23270, with this amplify the processes that could be regulated by the c-di-GMP  
467 signaling pathway in this biomining bacterium.

## ANEXO 2

468

469 The result opens a new way to explore the molecular adaptation mechanisms in bioming  
470 microorganisms and specially the regulation of the way of life of *A. ferrooxidans* in a  
471 biofilm.

472

473

474

### ACKNOWLEDGMENTS

475

476 This work was supported by FONDECYT 1080441 grant. L.M. Ruiz was supported by  
477 scholarships from DAAD (2004-2008) and CONICYT (2008-2009). We thank the  
478 Institute of Genome Research (TIGR) and Integrated Genomics, Inc. (IG), for the use of  
479 their *A. ferrooxidans* genome sequence. We acknowledge Dr. Amiot and Dr. Jenal from  
480 Biozentrum (University of Basel, Switzerland) to kindly provide us synthetic c-di-GMP  
481 and the BL21(DE3) strain overexpressing the DGC PleD from *Caulobacter crescentus*,  
482 respectively.

483

484

485



## FIGURE LEGENDS

486

487

488 FIG. 1. Transcriptional analysis of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 ORFs encoding for  
489 proteins involved in the c-di-GMP pathway by qRT-PCR. Reactions were carried out  
490 with 1 µg of total RNA extracted from thiosulfate-grown cells and digested with DNase  
491 I.

492

493 FIG. 2. Production of c-di-GMP by *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown on  
494 thiosulfate. Analyses were made by direct injection into ESI-IT-MS in negative polarity.

495 A. Synthetic c-di-GMP spectrograms. MS spectrogram shows a strong signal, 689 m/z  
496 ([M-H]<sup>-</sup>) (red) that is equivalent to 690 g/mol of nominal mass. 689 m/z signal was  
497 fragmented and several specific signals (▼) were obtained out of which 344 m/z and  
498 538 m/z were the strongest. B. Spectrograms of nucleotide extract of *A. ferrooxidans*.  
499 The first MS-step allowed the identification of a 689 m/z signal (red). This m/z signal  
500 was automatically extracted and submitted to a second MS-step allowing the  
501 identification of the specific c-di-GMP fragments m/z 344, m/z 424 and m/z 538. C.  
502 Chemical structures of the molecular ion of c-di-GMP and some of its specific  
503 fragments. m/z 344 y m/z, 538 are produced by a double and single bond  
504 fragmentations, respectively.

505

506 FIG. 3. Determination of a phosphodiesterase activity in *A. ferrooxidans* total proteic  
507 extracts. A. Structure of the artificial substrate bis-pNPP. B. The hydrolysis capability  
508 of the artificial substrate bis-pNPP by total proteic extract from *A. ferrooxidans* grown  
509 in thiosulphate (T) or iron (I) and harvested on the exponential (ex) or stationary (st)  
510 phases was tested. An increase in the absorbance at 410 nm is directly proportional with

## ANEXO 2

511 the release of *p*-nitrophenol (*p*NP) from bis-*p*NPP. Results are obtained from three  
512 biological replicates.

513

514 FIG. 4. A. Phenotypic characterization of *E. coli* BL21 (DE3) strain overexpressing  
515 genes encoding proteins with GGDEF/EAL domains from *A. ferrooxidans*  
516 ATCC23270. Cellulose biosynthesis was assessed after the bacteria have been grown on  
517 LB agar plates without NaCl supplemented with 50 µg/ml Congo red and 100 µg/ml  
518 ampicillin with or without IPTG for 24 h at 37°C and room temperature for 48 h.  
519 Bacteria grown by inoculation by scattering. The appearance of a pink, dry and rough  
520 (pdar) colonial morphotype indicates cellulose biosynthesis induced by c-di-GMP (51).  
521 B. Quantification of Congo red binding to different *E. coli* BL21(DE3) strains  
522 expressing the genes encoding for DGC/PDE. White bars (with IPTG), Black bars  
523 (without IPTG).

524

525 Figure 5. Analysis by HPLC coupled to mass spectrometry of c-di-GMP levels in *A.*  
526 *ferrooxidans*. A. *A. ferrooxidans* cells grown with different energy substrate. <sup>a</sup>Solid  
527 substrate, <sup>b</sup>Soluble substrate. B. *A. ferrooxidans* cells forming biofilm in sulfur pearls.

ANEXO 2

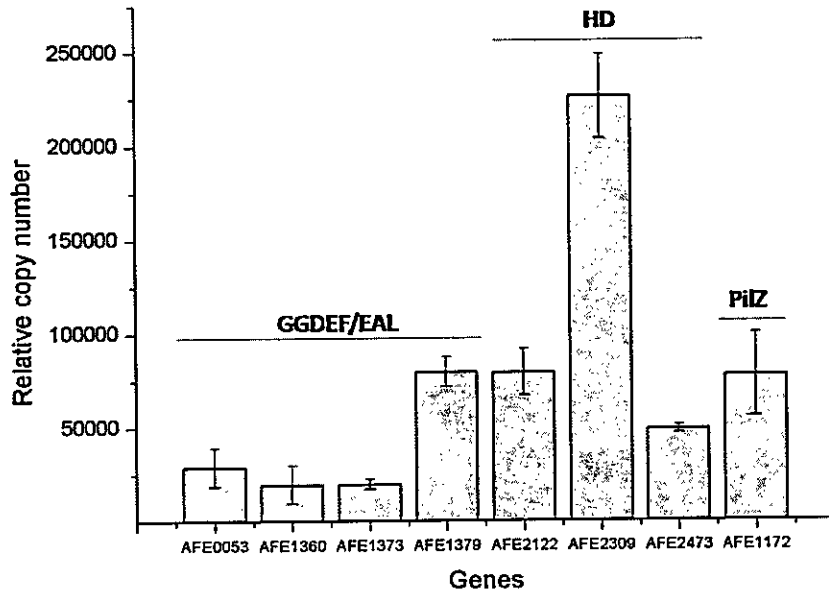


FIGURE 1

528

529

530

ANEXO 2

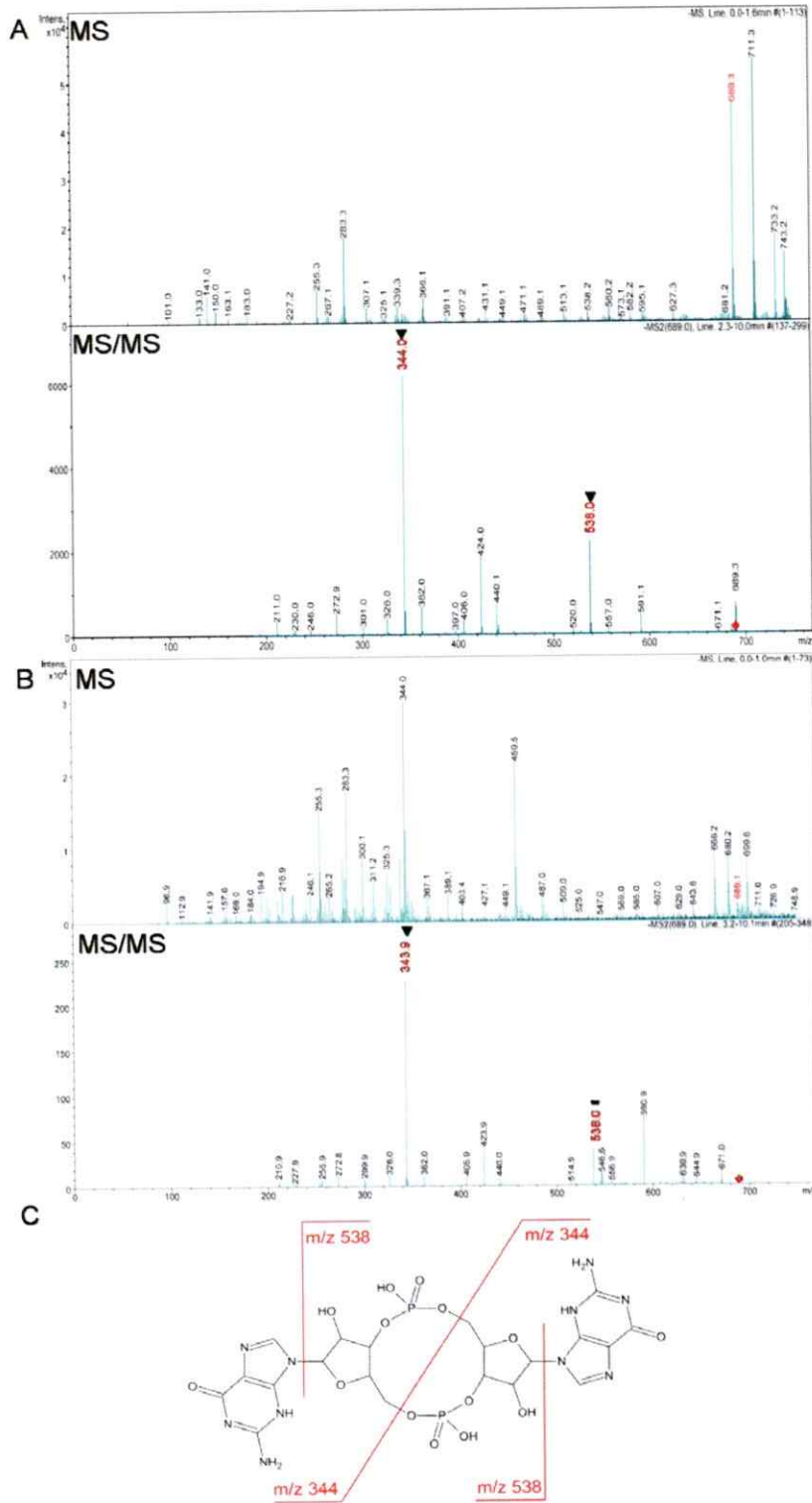
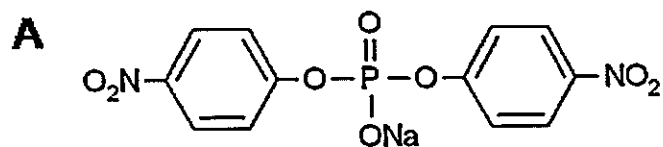


FIGURE 2

532



**B**

<i>A. ferrooxidans</i> Total proteic extract	Release of pNP from bis pNPP Absorbance (410 nm)
Fe exp	0.214 ± 0.016
Fe est	0.201 ± 0.016
Tio exp	0.449 ± 0.032
Tio est	0.765 ± 0.013

FIGURE 3

533

ANEXO 2

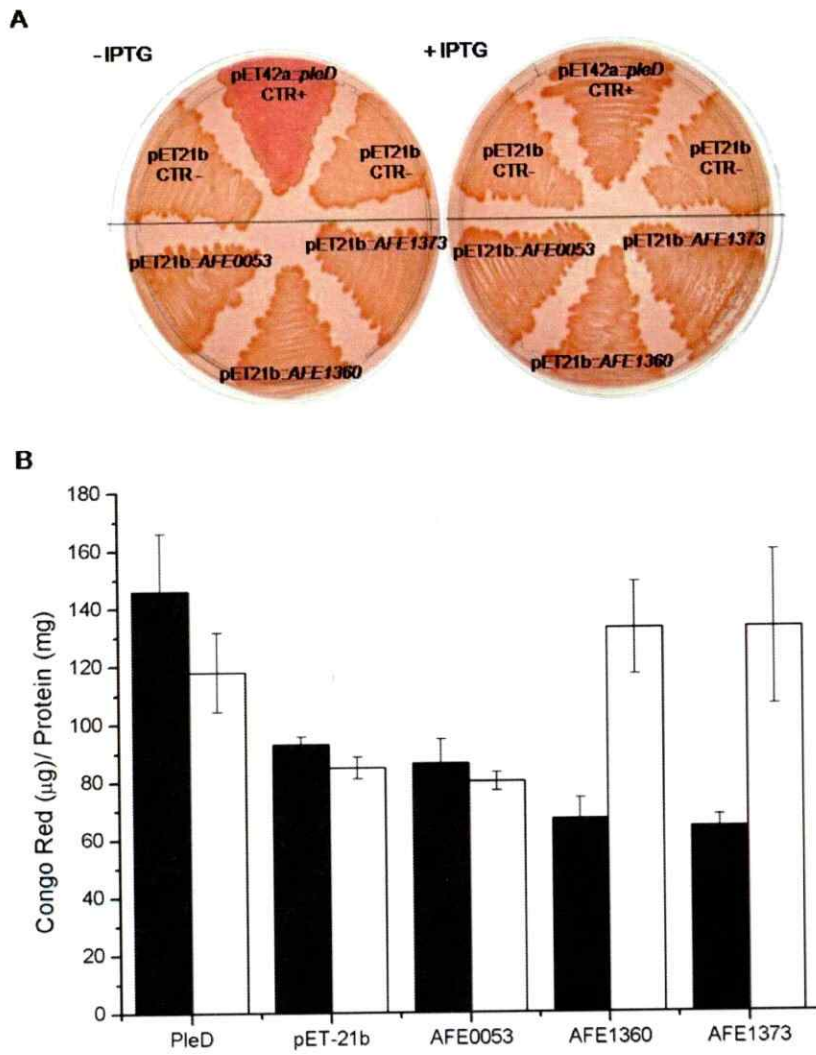


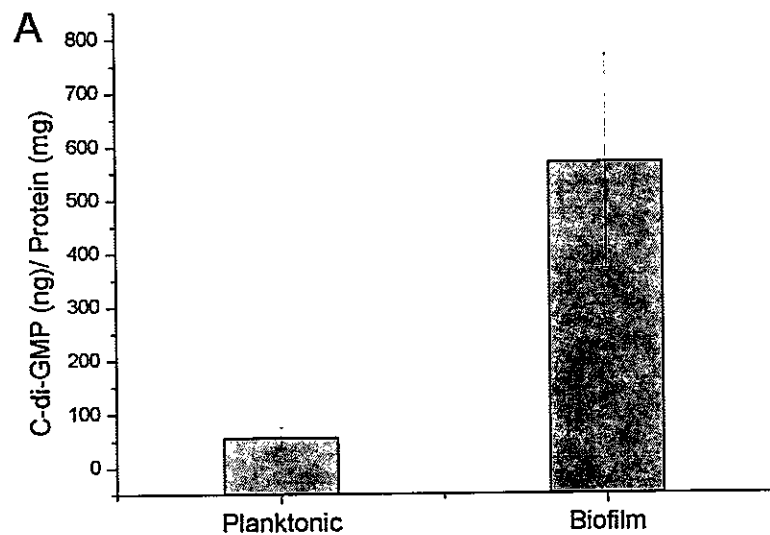
FIGURE 4

534

535

536

ANEXO 2



**B**

Energy substrate	c-di-GMP (ng)/ Protein (mg)
Sulphur <sup>a</sup>	382.9
Cooper concentrated <sup>a</sup>	168.6
Pyrite <sup>a</sup>	49.9
Tiosulphate <sup>b</sup>	24.0
Iron sulphate <sup>b</sup>	2.2

537

538

FIGURE 5

ANEXO 2

539 TABLE 1. Primers used in real time PCR assays and cloning of the different genes  
540 involved in the c-di-GMP metabolism.

Name	Sequence 5'-3'	Product Tm	
		R1	R2 °C
Fw0053-1	TGGAGGTTCTCAGCGAAG	205	61.8
Rv0053-1	GTGAGTGGGTCGGAAAG		59.1
Fw1360-1	ATGGCACAAAGGTTGCATA	176	61.5
Rv1360-1	GGGATCTCTTCGTCTCCTAGATA		61.4
Fw1373-2	GGCTGCAGGTGCAGTTA	151	61.2
Rv1373-2	TCGATTTCCAGCGGCTCA		68.2
Fw1379-1	TACGCCAACGCCAAATC	154	63.3
Rv1379-1	GTTTGGAGGAGTTCGGCATA		63.8
Fw2122	TTGTGCGCCCTGCGATAC	162	63.6
Rv2122	GGTGAGGAGCAGCAGATAG		60.1
Fw2309	GCGGATGAGATCGCCTA	163	62.6
Rv2309	CGGTTTCGTGACGCAATA		63.3
Fw2473	GCCGTGAGAAACACGTCTA	153	61.5
Rv2473	GTCGATACAGACTGTGAACC		57
Fw1172	GTACTGGTAGAGACAGCGA	164	55.3
Rv1172	ACAAACTGGACACCGAT		56.0
AFE0053NH2	<u>CAT<b>ATG</b>CCTTCTTTCCGGCGCCAATG</u>		
AFE0053COOHs	<u>GGATCCCTAAACCGGGACGGAAGATAG</u>		
AFE0053COOH	<u>GGATCCAACCGGGACGGAAGATAGACC</u>		
AFE1360NH2	<u>CAT<b>ATG</b>TCCATCTTCGGCTACGGCTAC</u>		
AFE1360COOHs	<u>GGATCCTCAATGAGTTGTGATGATGATG</u>		
AFE1360COOH	<u>GGATCCATGAGTTGTGATGATGATGAGC</u>		
AFE1373NH2	<u>CAT<b>ATG</b>GGAGAGACCTTAACCTTGGAG</u>		
AFE1373COOHs	<u>GGATCCCTAGATATTATCCCGGCTTTC</u>		
AFE1373COOH	<u>GGATCCGATATTATCCCGGCTTTCACC</u>		
AFE1379NH2	<u>TCTAGATTCAAAAAGATCCCC<b>ATG</b>ACAGCACCAGATA</u>		
AFE1379COOHs	<u>GGATCCCTACAGCATCATCGAAACGTG</u>		
AFE1379COOH	<u>GGATCCCAGCATCATCGAAACGTGC</u>		

541 Grey rows real time PCR primers; Fw, forward; Rv, reverse. White rows Primers used for the cloning of  
542 the different genes involved in the c-di-GMP metabolism. The presence of restriction sites is shown by  
543 underlined nucleotides and sites of translation beginning (cursive and bold nucleotides) and translation  
544 termination (bold nucleotides).  
545

546

547



ANEXO 2

548  
549  
550  
551  
552  
553

**TABLE 2.** Identification of probable proteins implicated in the c-di-GMP pathway of *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Gene	Probable enzymatic activity	Best blast hit (% Identity)	Domains (e-value)
AFE0053	diguanylate cyclase/phosphodiesterase sensor domain (841 aa)	with <i>Azoarcus</i> sp. BH72 (30 %)	GGDEF (1e-42) EAL (2e-44)
AFE1360	diguanylate cyclase/phosphodiesterase sensor domain (709 aa)	with <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB (37 %)	GGDEF (4e-39) EAL (3e-62)
AFE1373	diguanylate cyclase/phosphodiesterase (665 aa)	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB (41 %)	GGDEF (5e-33) EAL (6e-72)
AFE1379	diguanylate cyclase/phosphodiesterase sensor domains (1057 aa)	with <i>Comamonas testosteroni</i> KF-1 (28 %)	GGDEF (1e-37) EAL (1e-44)
AFE1852	diguanylate phosphodiesterase (228 aa)	<i>Frankia</i> sp. CcI3 (32 %)	EAL (2e-23)
AFE1172	type IV pilus assembly protein PilZ (118 aa)	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> MAFF 311018 (43%)	PilZ (4.4e-08)
AFE1374	type IV pilus assembly protein PilZ ( aa)	<i>Bordetella parapertussis</i> 12822	PilZ (4.6e <sup>-06</sup> )
AFE2122	Protein-P-II uridylyltransferase metal dependent phosphohydrolase (862 aa)	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp (38%)	HDc (8.6e-08)
AFE2309	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase (399 aa)	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D (60%)	HDc (1.9e-11)
AFE2473	Metal dependent phosphohydrolase, HD region (734 aa)	<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259 (51%)	HDc (1.8e-09)

554 Proteins with GGDEF/EAL domain (■), Protein with EAL domain (■), Proteins with  
555 PilZ domain (■). Last row proteins with HD domain  
556  
557  
558  
559

ANEXO 2

560  
561  
562  
563  
564

**TABLE 3.** Detection of c-di-GMP in nucleotide extracts obtained from *E. coli* strains transformed with *AFE0053*::pET-21b, *AFE1360*::pET-21b, *AFE1373*::pET-21b and *AFE1379*:: pBADTOPO plasmids.

	C-di-GMP relative quantity
Blank	ND
PleD::pET42/ BL21 +	++
pET21b/ BL21 + I	ND
AFE0053::pET21b/ BL21 + I	+
AFE1360::pET21b/ BL21 + I	+
AFE1373::pET21b/ BL21 + I	+
pBADTOPO/ TOP10 + A	ND
AFE1379::pBADTOPO/ TOP10 + A	+

565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572

Presence of the m/z 344 and m/z 538 ions was evaluated in the different MS/MS spectra as described before. The blank was prepared and examined at the same spectrometric conditions as for samples and standard except water was used. ND, not detected; BL21, *E. coli* BL21 (DE3); TOP10, *E. coli* TOP10; I, induced with IPTG; A; induced with arabinose.

## ANEXO 2

573

### REFERENCES

- 574 1. **Amaro, A. M., D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I.**  
 575 **Peirano, and C. A. Jerez.** 1991. EFFECT OF EXTERNAL PH  
 576 PERTURBATIONS ON INVIVO PROTEIN-SYNTHESIS BY THE  
 577 ACIDOPHILIC BACTERIUM THIOBACILLUS-FERROOXIDANS.  
 578 *Journal of Bacteriology* 173:910-915.
- 579 2. **Aravind, L., and E. V. Koonin.** 1998. The HD domain  
 580 defines a new superfamily of metal-dependent  
 581 phosphohydrolases. *Trends in Biochemical Sciences*  
 582 23:469-472.
- 583 3. **Beyhan, S., A. D. Tischler, A. Camilli, and F. H.**  
 584 **Yildiz.** 2006. Transcriptome and phenotypic responses  
 585 of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level.  
 586 *Journal of Bacteriology* 188:3600-3613.
- 587 4. **Bobrov, A. G., O. Kirillina, and R. D. Perry.** 2005.  
 588 The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain  
 589 is required for negative regulation of biofilm  
 590 formation in *Yersinia pestis*. *Fems Microbiology*  
 591 *Letters* 247:123-130.
- 592 5. **Camilli, A., and B. L. Bassler.** 2006. Bacterial small-  
 593 molecule signaling pathways. *Science* 311:1113-1116.
- 594 6. **Castro, M., L. M. Ruiz, A. Barriga, C. A. Jerez, D.**  
 595 **Holmes, and N. Guiliani.** 2009. C-di-GMP pathway in  
 596 biomining bacteria. *Journal of Advanced Materials*  
 597 *Research*. 71-73:223-226.
- 598 7. **Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. C. Amiot, B. Giese,**  
 599 **U. Jenal, and T. Schirmer.** 2004. Structural basis of  
 600 activity and allosteric control of diguanylate  
 601 cyclase. *Proceedings of the National Academy of*  
 602 *Sciences of the United States of America* 101:17084-  
 603 17089.
- 604 8. **Christen, B., M. Christen, R. Paul, F. Schmid, M.**  
 605 **Folcher, P. Jenoe, M. Meuwly, and U. Jenal.** 2006.  
 606 Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *Journal*  
 607 *of Biological Chemistry* 281:32015-32024.
- 608 9. **Christen, M., B. Christen, M. G. Allan, M. Folcher, P.**  
 609 **Jeno, S. Grzesiek, and U. Jenal.** 2007. DgrA is a  
 610 member of a new family of cyclic diguanosine  
 611 monophosphate receptors and controls flagellar motor  
 612 function in *Caulobacter crescentus* (vol 104, pg 4112,  
 613 2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences*  
 614 *of the United States of America* 104:7729-7729.
- 615 10. **Christen, M., B. Christen, M. Folcher, A. Schauerte,**  
 616 **and U. Jenal.** 2005. Identification and  
 617 characterization of a cyclic di-GMP-specific  
 618 phosphodiesterase and its allosteric control by GTP.  
 619 *Journal of Biological Chemistry* 280:30829-30837.
- 620 11. **Farah, C., M. Vera, D. Morin, D. Haras, C. A. Jerez,**  
 621 **and N. Guiliani.** 2005. Evidence for a functional  
 622 quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic  
 623 bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and*  
 624 *Environmental Microbiology* 71:7033-7040.
- 625 12. **Ferreira, R. B. R., L. C. M. Antunes, E. P. Greenberg,**  
 626 **and L. L. McCarter.** 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC  
 627 modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene  
 628 expression relevant to growth on surfaces. *Journal of*  
 629 *Bacteriology* 190:851-860.

## ANEXO 2

- 630 13. **Galperin, M. Y.** 2004. Bacterial signal transduction  
631 network in a genomic perspective. *Environmental*  
632 *Microbiology* **6**:552-567.
- 633 14. **Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin.**  
634 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component  
635 signal transduction systems. *Fems Microbiology Letters*  
636 **203**:11-21.
- 637 15. **Garcia, B., C. Latasa, C. Solano, F. G. Portillo, C.**  
638 **Gamazo, and I. Lasa.** 2004. Role of the GGDEF protein  
639 family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and  
640 biofilm formation. *Molecular Microbiology* **54**:264-277.
- 641 16. **Gehrke, T., J. Telegdi, D. Thierry, and W. Sand.** 1998.  
642 Importance of extracellular polymeric substances from  
643 *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and*  
644 *Environmental Microbiology* **64**:2743-2747.
- 645 17. **Guiliani, N., A. Bengrine, F. Borne, M. Chippaux, and**  
646 **V. Bonnefoy.** 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the  
647 extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus*  
648 *ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from  
649 all living kingdoms but cannot be transcribed from its  
650 promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology-Uk*  
651 **143**:2179-2187.
- 652 18. **Harneit, K., A. Goksel, D. Kock, J. H. Klock, T.**  
653 **Gehrke, and W. Sand.** 2006. Adhesion to metal sulfide  
654 surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*,  
655 *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum*  
656 *ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **83**:245-254.
- 657 19. **Hengge, R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in  
658 bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **7**:263-273.
- 659 20. **Hickman, J. W., and C. S. Harwood.** 2008.  
660 Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as  
661 a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular*  
662 *Microbiology* **69**:376-389.
- 663 21. **Hickman, J. W., D. F. Tifrea, and C. S. Harwood.** 2005.  
664 A chemosensory system that regulates biofilm formation  
665 through modulation of cyclic diguanylate levels.  
666 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
667 *United States of America* **102**:14422-14427.
- 668 22. **Hisert, K. B., M. MacCoss, M. U. Shiloh, K. H. Darwin,**  
669 **S. Singh, R. A. Jones, S. Ehrt, Z. Y. Zhang, B. L.**  
670 **Gaffney, S. Gandotra, D. W. Holden, D. Murray, and C.**  
671 **Nathan.** 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain  
672 protein of *Salmonella* controls bacterial survival in  
673 mice, antioxidant defence and killing of macrophages:  
674 role of cyclic diGMP. *Molecular Microbiology* **56**:1234-  
675 1245.
- 676 23. **Jenal, U.** 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate  
677 comes of age: a novel secondary messenger involved in  
678 modulating cell surface structures in bacteria?  
679 *Current Opinion in Microbiology* **7**:185-191.
- 680 24. **Johnson, M. R., C. I. Montero, S. B. Connors, K. R.**  
681 **Shockley, S. L. Bridger, and R. M. Kelly.** 2005.  
682 Population density-dependent regulation of  
683 exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic  
684 bacterium *Thermotoga maritima*. *Molecular Microbiology*  
685 **55**:664-674.
- 686 25. **Jonas, K., O. Melefors, and U. Romling.** 2009.  
687 Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future*

## ANEXO 2

- 688 Microbiology 4:341-358.
- 689 26. **Kader, A., R. Simm, U. Gerstel, M. Morr, and U.**  
 690 **Romling.** 2006. Hierarchical involvement of various  
 691 GGDEF domain proteins in rdar morphotype development  
 692 of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular*  
 693 *Microbiology* 60:602-616.
- 694 27. **Klausen, M., A. Aaes-Jorgensen, S. Molin, and T.**  
 695 **Tolker-Nielsen.** 2003. Involvement of bacterial  
 696 migration in the development of complex multicellular  
 697 structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.  
 698 *Molecular Microbiology* 50:61-68.
- 699 28. **Kumar, M., and D. Chatterji.** 2008. Cyclic di-GMP: a  
 700 second messenger required for long-term survival, but  
 701 not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*.  
 702 *Microbiology-Sgm* 154:2942-2955.
- 703 29. **Lee, V. T., J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo,**  
 704 **Y. Hayakawa, and S. Lory.** 2007. A cyclic-di-GMP  
 705 receptor required for bacterial exopolysaccharide  
 706 production. *Molecular Microbiology* 65:1474-1484.
- 707 30. **Mendez-Ortiz, M. M., M. Hyodo, Y. Hayakawa, and J.**  
 708 **Membrillo-Hernandez.** 2006. Genome-wide transcriptional  
 709 profile of *Escherichia coli* in response to high levels  
 710 of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic  
 711 acid. *Journal of Biological Chemistry* 281:8090-8099.
- 712 31. **Merighi, M., V. T. Lee, M. Hyodo, Y. Hayakawa, and S.**  
 713 **Lory.** 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-  
 714 GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are  
 715 required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas*  
 716 *aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 65:876-895.
- 717 32. **Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A.**  
 718 **O'Toole.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-  
 719 GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1  
 720 biofilm formation by controlling secretion of the  
 721 adhesin LapA. *Molecular Microbiology* 63:656-679.
- 722 33. **Navarro, C. A., L. H. Orellana, C. Mauriaca, and C. A.**  
 723 **Jerez.** 2009. Transcriptional and Functional Studies of  
 724 *Acidithiobacillus ferrooxidans* Genes Related to  
 725 Survival in the Presence of Copper. *Applied and*  
 726 *Environmental Microbiology* 75:6102-6109.
- 727 34. **Newell, P. D., R. D. Monds, and G. A. O'Toole.** 2009.  
 728 LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding  
 729 protein that regulates surface attachment by  
 730 *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the*  
 731 *National Academy of Sciences of the United States of*  
 732 *America* 106:3461-3466.
- 733 35. **Parro, V., M. Moreno-Paz, and E. Gonzalez-Toril.** 2007.  
 734 Analysis of environmental transcriptomes by DNA  
 735 microarrays. *Environmental Microbiology* 9:453-464.
- 736 36. **Pesavento, C., and R. Hengge.** 2009. Bacterial  
 737 nucleotide-based second messengers. *Current Opinion in*  
 738 *Microbiology* 12:170-176.
- 739 37. **Pratt, J. T., E. McDonough, and A. Camilli.** 2009. PhoB  
 740 Regulates Motility, Biofilms, and Cyclic di-GMP in  
 741 *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 191.
- 742 38. **Pratt, J. T., R. Tamayo, A. D. Tischler, and A.**  
 743 **Camilli.** 2007. PilZ domain proteins bind cyclic  
 744 diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio*  
 745 *cholerae*. *Journal of Biological Chemistry* 282:12860-

## ANEXO 2

- 746 12870.
- 747 39. **Ramirez, P., N. Guiliani, L. Valenzuela, S. Beard, and**  
 748 **C. A. Jerez.** 2004. Differential protein expression  
 749 during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on  
 750 ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides.  
 751 *Applied and Environmental Microbiology* **70**:4491-4498.
- 752 40. **Rawlings, D. E.** 2002. Heavy metal mining using  
 753 microbes. *Annual Review of Microbiology* **56**:65-91.
- 754 41. **Romling, U., and D. Amikam.** 2006. Cyclic di-GMP as a  
 755 second messenger. *Current Opinion in Microbiology*  
 756 **9**:218-228.
- 757 42. **Romling, U., M. Gomelsky, and M. Y. Galperin.** 2005. C-  
 758 di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling  
 759 system. *Molecular Microbiology* **57**:629-639.
- 760 43. **Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, L. C. Crossman, S.**  
 761 **Spiro, Y. W. He, L. H. Zhang, S. Heeb, M. Camara, P.**  
 762 **Williams, and J. M. Dow.** 2006. Cell-cell signaling in  
 763 *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain  
 764 protein that functions in cyclic di-GMP turnover.  
 765 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*  
 766 *United States of America* **103**:6712-6717.
- 767 44. **Ryan, R. P., Y. Fouhy, J. F. Lucey, B. L. Jiang, Y. Q.**  
 768 **He, J. X. Feng, J. L. Tang, and J. M. Dow.** 2007.  
 769 Cyclic di-GMP signalling in the virulence and  
 770 environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*.  
 771 *Molecular Microbiology* **63**:429-442.
- 772 45. **Ryjenkov, D. A., R. Simm, U. Romling, and M. Gomelsky.**  
 773 2006. The PilZ domain is a receptor for the second  
 774 messenger c-di-GMP - The PilZ domain protein YcgR  
 775 controls motility in enterobacteria. *Journal of*  
 776 *Biological Chemistry* **281**:30310-30314.
- 777 46. **Ryjenkov, D. A., M. Tarutina, O. V. Moskvina, and M.**  
 778 **Gomelsky.** 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous  
 779 signaling molecule in bacteria: Insights into  
 780 biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of*  
 781 *Bacteriology* **187**:1792-1798.
- 782 47. **Sand, W., and T. Gehrke.** 2006. Extracellular polymeric  
 783 substances mediate bioleaching/biocorrosion via  
 784 interfacial processes involving iron(III) ions and  
 785 acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* **157**:49-  
 786 56.
- 787 48. **Schippers, A., and W. Sand.** 1999. Bacterial leaching  
 788 of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms  
 789 via thiosulfate or via polysulfides and sulfur.  
 790 *Applied and Environmental Microbiology* **65**:319-321.
- 791 49. **Schmidt, A. J., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky.** 2005.  
 792 The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic  
 793 diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically  
 794 active and inactive EAL domains. *Journal of*  
 795 *Bacteriology* **187**:4774-4781.
- 796 50. **Simm, R., A. Lusch, A. Kader, M. Andersson, and U.**  
 797 **Romling.** 2007. Role of EAL-containing proteins in  
 798 multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar  
 799 typhimurium. *Journal of Bacteriology* **189**:3613-3623.
- 800 51. **Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling.**  
 801 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic  
 802 di-GMP levels and transition from sessility to  
 803 motility. *Molecular Microbiology* **53**:1123-1134.

## ANEXO 2

- 804 52. Spiers, A. J., J. Bohannon, S. M. Gehrig, and P. B.  
 805 Rainey. 2003. Biofilm formation at the air-liquid  
 806 interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly  
 807 spreader requires an acetylated form of cellulose.  
 808 *Molecular Microbiology* 50:15-27.
- 809 53. Sudarsan, N., E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N.  
 810 Kim, K. H. Link, and R. R. Breaker. 2008. Riboswitches  
 811 in eubacteria sense the second messenger cyclic di-  
 812 GMP. *Science* 321:411-413.
- 813 54. Tamayo, R., S. Schild, J. T. Pratt, and A. Camili.  
 814 2008. Role of cyclic Di-GMP during El tor biotype  
 815 *Vibrio cholerae* infection: Characterization of the in  
 816 vivo-induced cyclic Di-GMP phosphodiesterase CdpA.  
 817 *Infection and Immunity* 76:1617-1627.
- 818 55. Tao, F., Y. W. He, D. H. Wu, S. Swarup, and L. H.  
 819 Zhang. 2010. The Cyclic Nucleotide Monophosphate  
 820 Domain of *Xanthomonas campestris* Global Regulator Clp  
 821 Defines a New Class of Cyclic Di-GMP Effectors.  
 822 *Journal of Bacteriology* 192:1020-1029.
- 823 56. Tarutina, M., D. A. Ryjenkov, and M. Gomelsky. 2006.  
 824 An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter*  
 825 *sphaeroides* involved in turnover of the second  
 826 messenger c-di-GMP. *Journal of Biological Chemistry*  
 827 281:34751-34758.
- 828 57. Thormann, K. M., S. Duttler, R. M. Saville, M. Hyodo,  
 829 S. Shukla, Y. Hayakawa, and A. M. Spormann. 2006.  
 830 Control of formation and cellular detachment from  
 831 *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP.  
 832 *Journal of Bacteriology* 188:2681-2691.
- 833 58. Tischler, A. D., and A. Camilli. 2004. Cyclic  
 834 diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae*  
 835 biofilm formation. *Molecular Microbiology* 53:857-869.
- 836 59. Ueda, A., and T. K. Wood. 2009. Connecting Quorum  
 837 Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm  
 838 Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine  
 839 Phosphatase TpbA (PA3885). *Plos Pathogens* 5.
- 840 60. Valenzuela, S., A. Banderas, C.A. Jerez, and N.  
 841 Guiliani. . 2007. Cell-cell communication in bacteria  
 842 : a promising new approach to improve bioleaching  
 843 efficiency? , p. 314. In E. R. Donati, W. Sand (ed.),  
 844 *Microbial Processing of Metal Sulfides* led. Springer |  
 845 Publish Date 06/07 | Copyright 2007.
- 846 61. Vera, M., F. Pagliai, N. Guiliani, and C. A. Jerez.  
 847 2008. The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus*  
 848 *ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting  
 849 conditions by expressing a C-P lyase operon that  
 850 allows it to grow on phosphonates. *Applied and*  
 851 *Environmental Microbiology* 74:1829-1835.
- 852 62. Waters, C. A., W. Y. Lu, J. D. Rabinowitz, and B. L.  
 853 Bassler. 2008. Quorum sensing controls biofilm  
 854 formation in *Vibrio cholerae* through modulation of  
 855 cyclic Di-GMT levels and repression of vpsT. *Journal*  
 856 *of Bacteriology* 190:2527-2536.
- 857 63. Zogaj, X., M. Nitz, M. Rohde, W. Bokranz, and U.  
 858 Romling. 2001. The multicellular morphotypes of  
 859 *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce  
 860 cellulose as the second component of the extracellular  
 861 matrix. *Molecular Microbiology* 39:1452-1463.

**ANEXO 2**

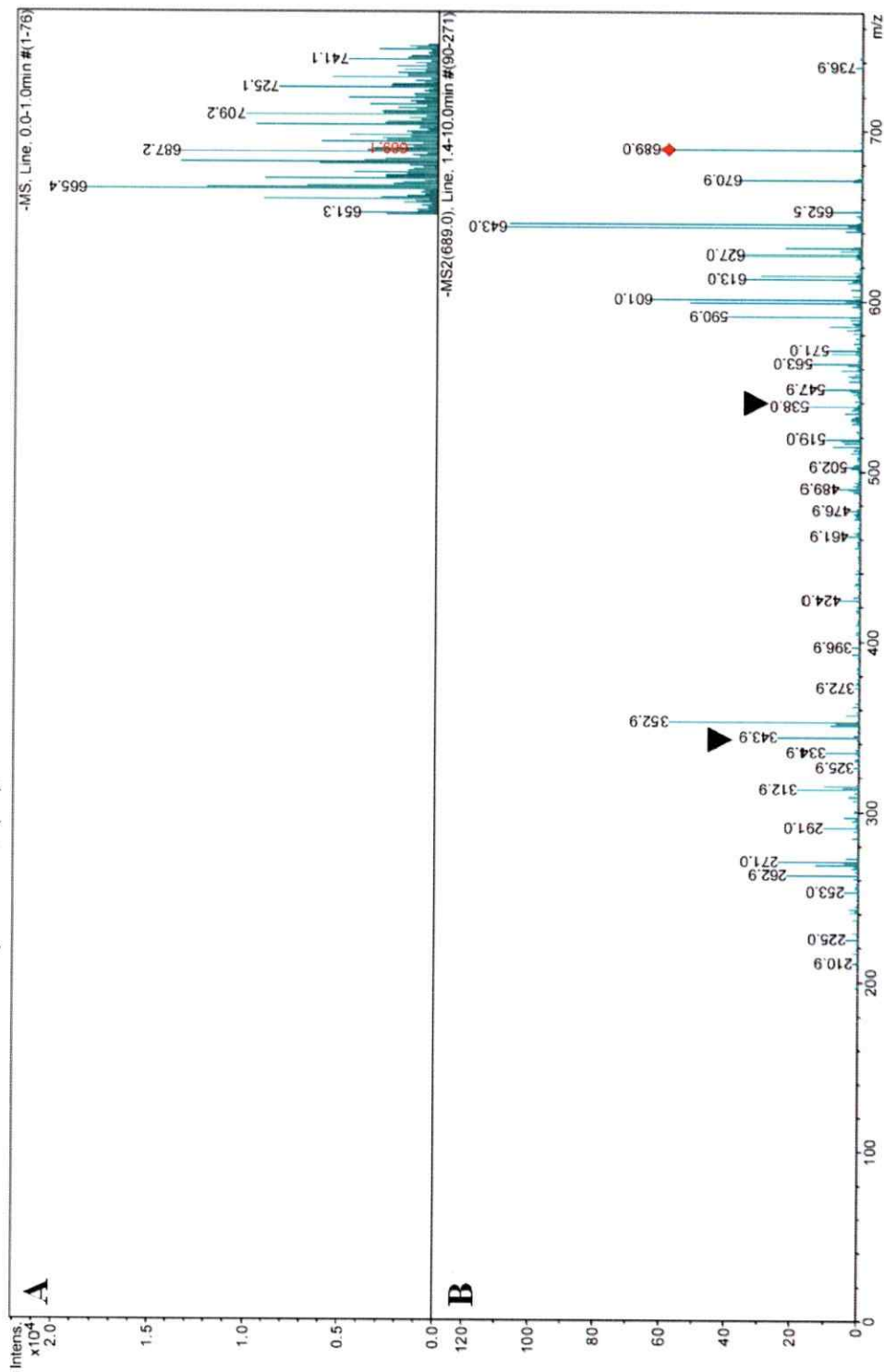
862  
863



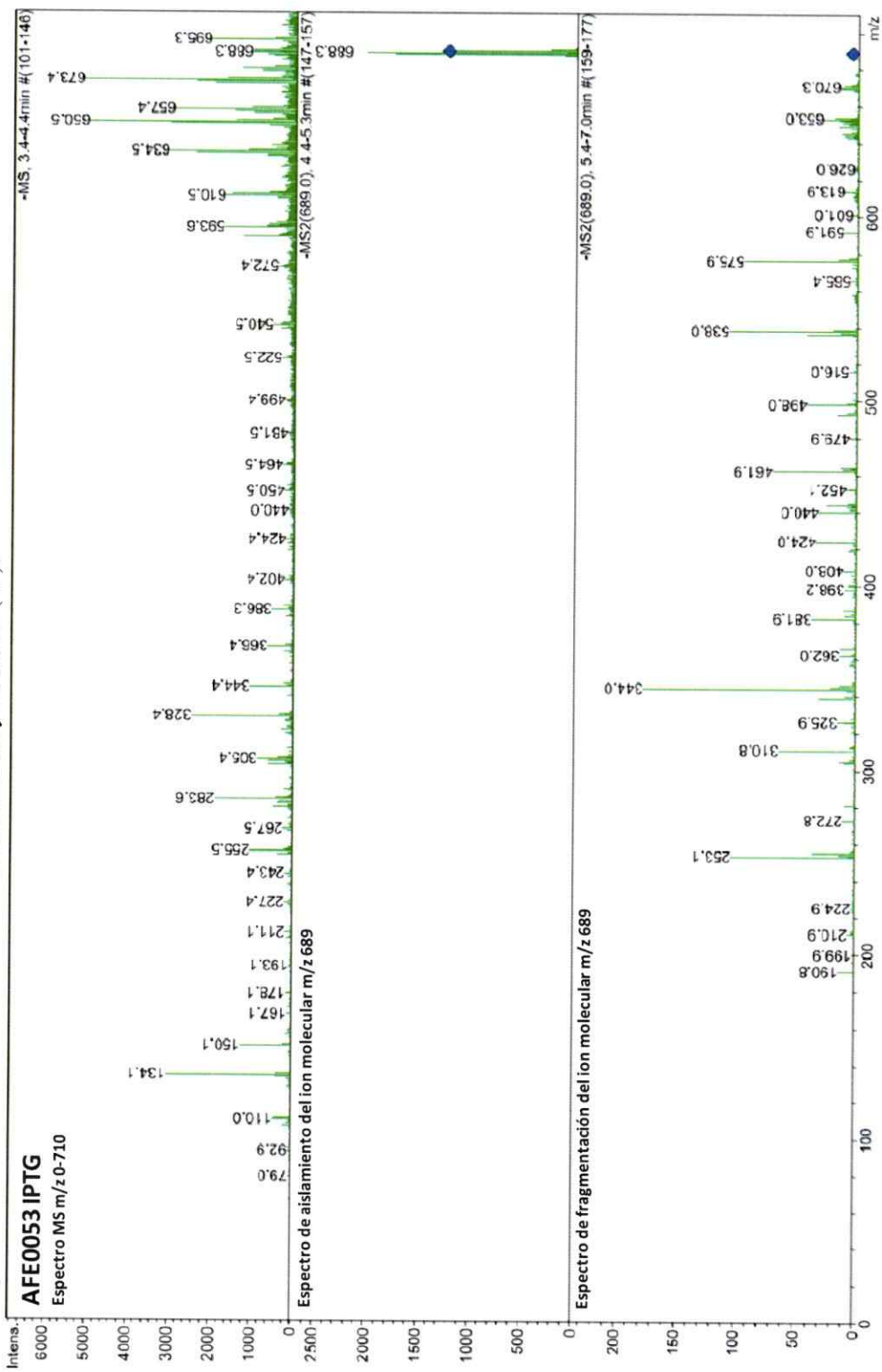
ANEXO 3. Probables proteínas efectoras de la vía c-di-GMP en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Actividad probable	Mejor hit de Blast	% Identidad	Dominios (e-value)
AFE1172 (118 aa) type IV pilus assembly protein PilZ	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> MAFF 311018	43%	PilZ (4.4e-08)
AFE2997 (455 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator-response regulator	<i>Sulfurihydrogenibium</i> sp. YO3AOP1	44%	AtcC (1e-137), REC (2e-25), AAA Sigma54 activat (8e-97), HTH8 (6e-05)
AFE0208 (468 aa) nitrogen regulation protein NRR(I) (ntrC)	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	62%	AtcC (6e-141), REC (3e-26), AAA (2e-08), Sigma54 activat (4e-91), HTH8 (6e-07)
AFE2590 (461 aa) sigma-54 dependent DNA-binding response regulator	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	49%	AtcC (1e-135), REC (4e-25), AAA (4e-05), Sigma54 activat (3e-96), HTH8 (0.002)
AFE1558 (545 aa) Nif-specific regulatory protein (nifA)	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	58%	GAF (3e-16), AAA (4e-08), Sigma54 activat (3e-105), HTH8 (8e-06)
AFE2340 (482 aa) sigma-54 dependent DNA-binding response regulator	<i>Methylocella silvestris</i> BL2	51%	REC (8e-07), AAA (1e-05), Sigma54 activat (9e-88), HTH8 (5e-07)
AFE2090 (451 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	51%	AAA (6e-06), Sigma54 activat (9e-90)
AFE0154 (457 aa) sigma-54 dependent DNA-binding response regulator, putative	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	61%	REC (1e-19), AAA (2e-08), Sigma54 activat (7e-99)
AFE0505 (439 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator, putative	<i>Alkaliimnicola ehrlichei</i> MLHE-1	46%	PAS (0.007), AAA (4e-07), Sigma54 activat (2e-86)
AFE2347 (643 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	41%	AAA (6e-09), Sigma54 activat (2e-83), HTH8 (3e-06)
AFE2841 (445 aa) type IV fimbriae expression regulatory protein PilR, putative	<i>Pseudomonas mendocina</i> ym	50%	REC (8e-20), AAA (4e-05), Sigma54 activat (3e-87)
AFE3000 (xxx aa) nitrogen assimilation regulatory protein NtrX, putative	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	49%	REC (7e-24), AAA (6e-04), Sigma54 activat (5e-67)
AFE1344 (609 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	55%	GAF (2e-05), AAA (0.001), Sigma54 activat (5e-76), HTH8 (2e-04)
AFE0409 (462 aa) sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Burkholderia oklahomensis</i> C6786	40%	AAA (7e-07), Sigma54 activat (8e-68), HTH8 (8e-07)

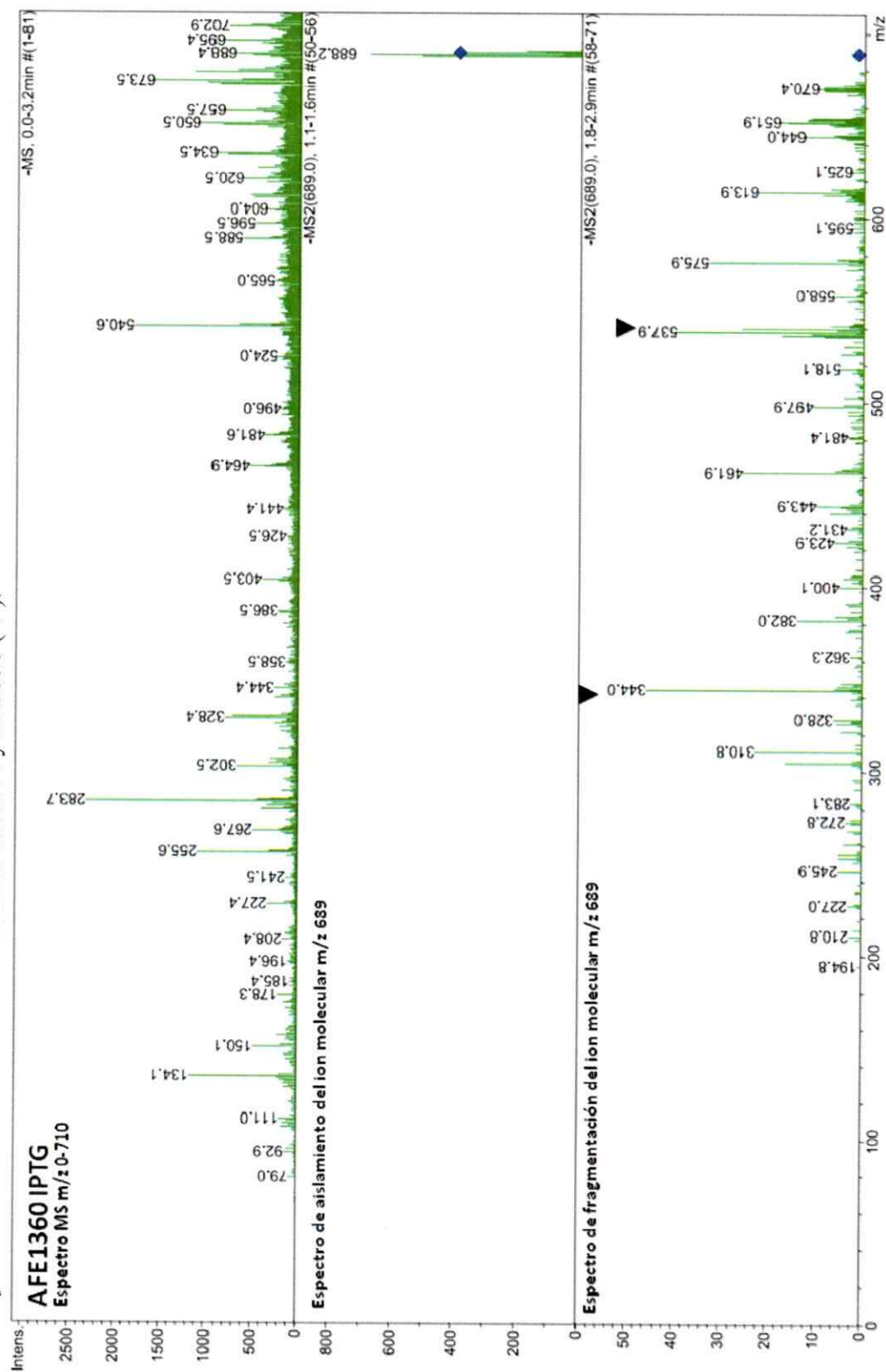
**ANEXO 4.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de células de *A. ferrooxidans* crecidas en sulfato de hierro. Se presentan los espectrogramas en polaridad negativa. A. Espectrograma MS de la señal m/z 689 aislada del extracto nucleotídico total B. Espectrograma MS/MS de la señal m/z 689 en (A). Se señalan las transiciones m/z 344 y m/z 538 (▼).



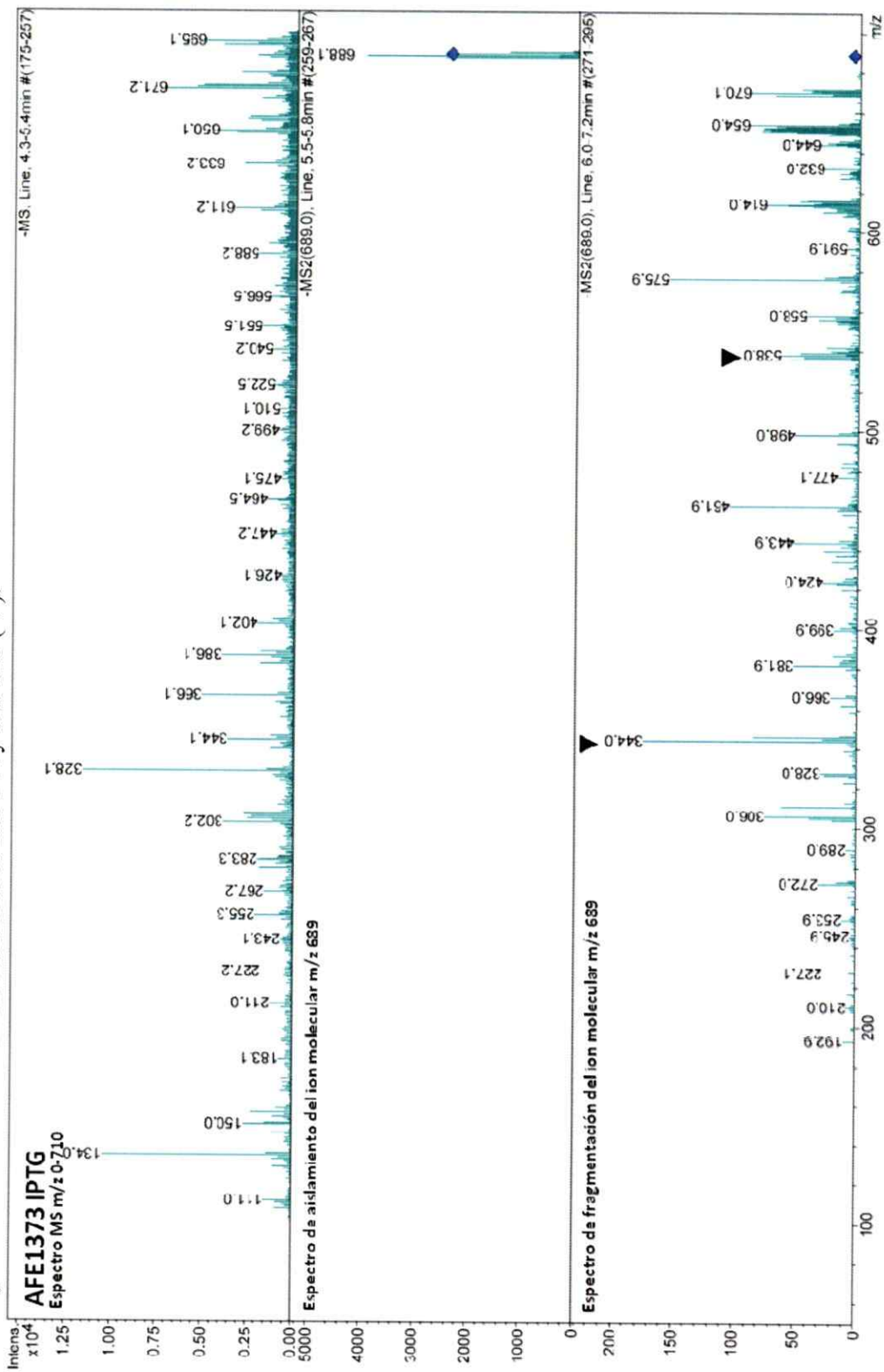
**ANEXO 5.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET-21b::*AFE0053* inducida con IPTG sobreexpresando la proteína *AFE0053* con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*. Se señalan las transiciones m/z 344 y m/z 538 (▼).



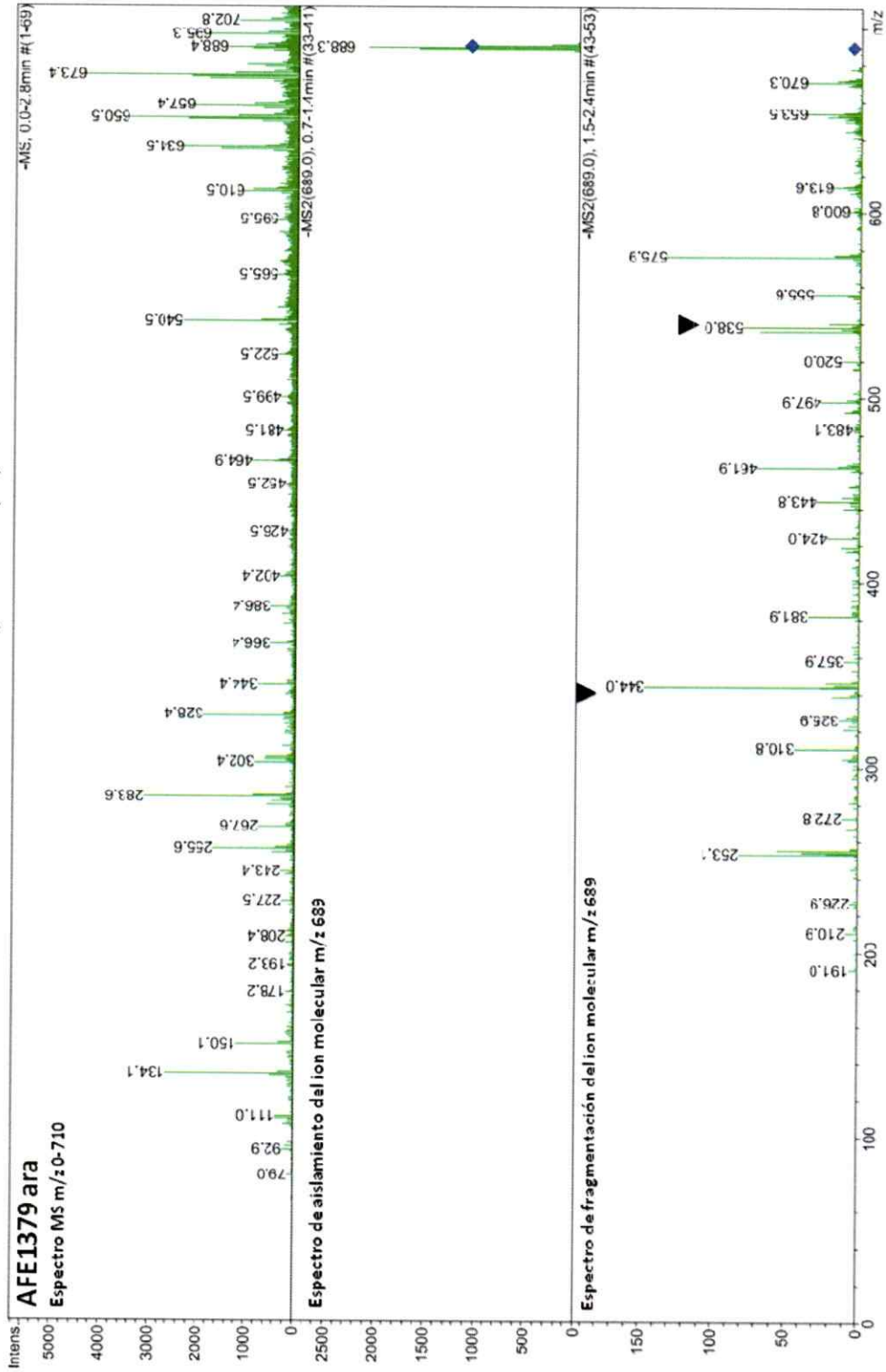
**ANEXO 6.** Análisis de la presencia de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET-21b::*AFE1360* inducida con IPTG sobrexpresando la proteína *AFE1360* con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*. Se señalan las transiciones m/z 344 y m/z 538 (▼).



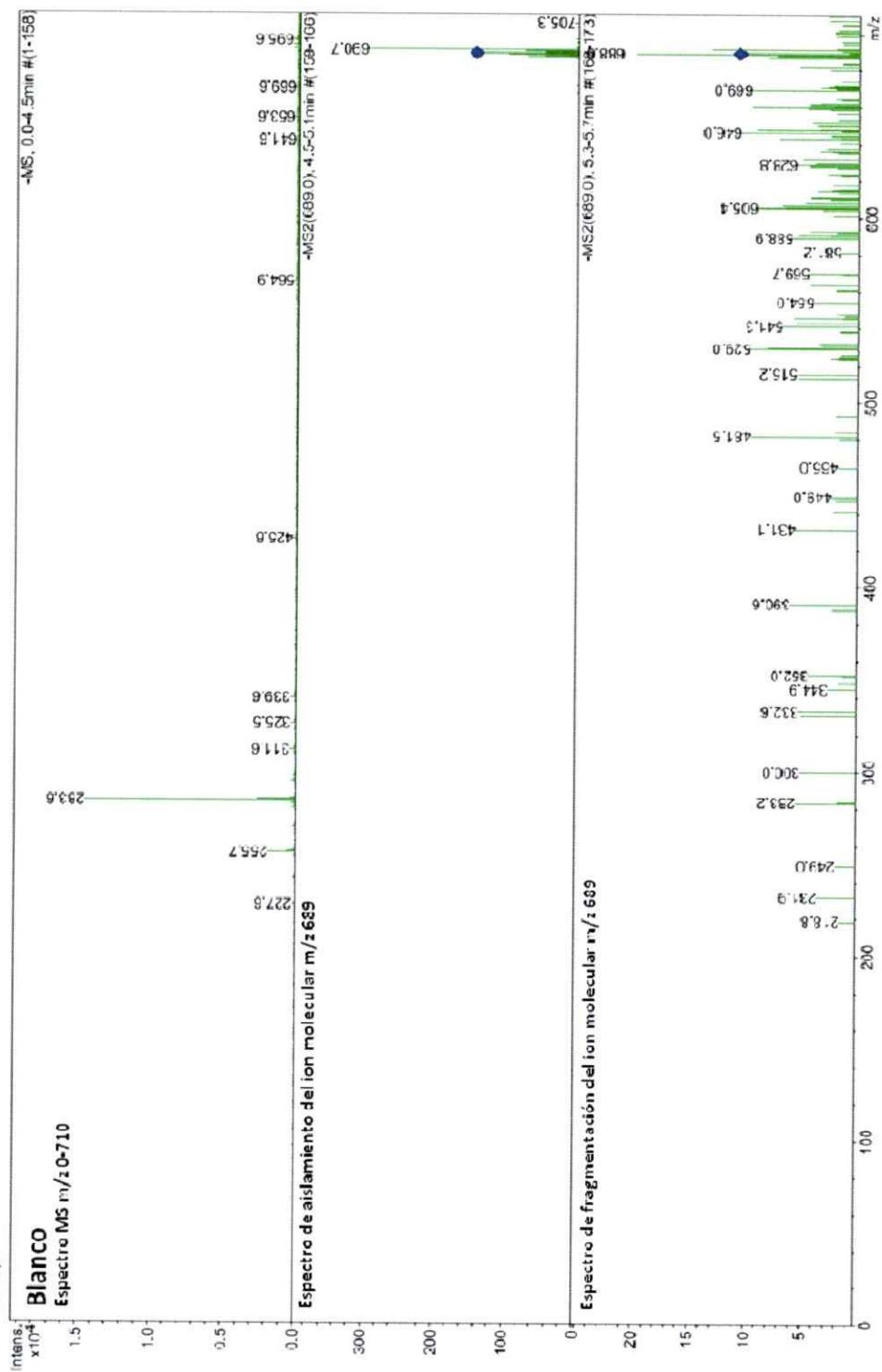
**ANEXO 7.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la cepa *E. coli* BL21(DE3) pET-21b::AFE1373 inducida con IPTG sobreexpresando la proteína AFE1373 con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*. Se señalan las transiciones m/z 344 y m/z 538 (▼).



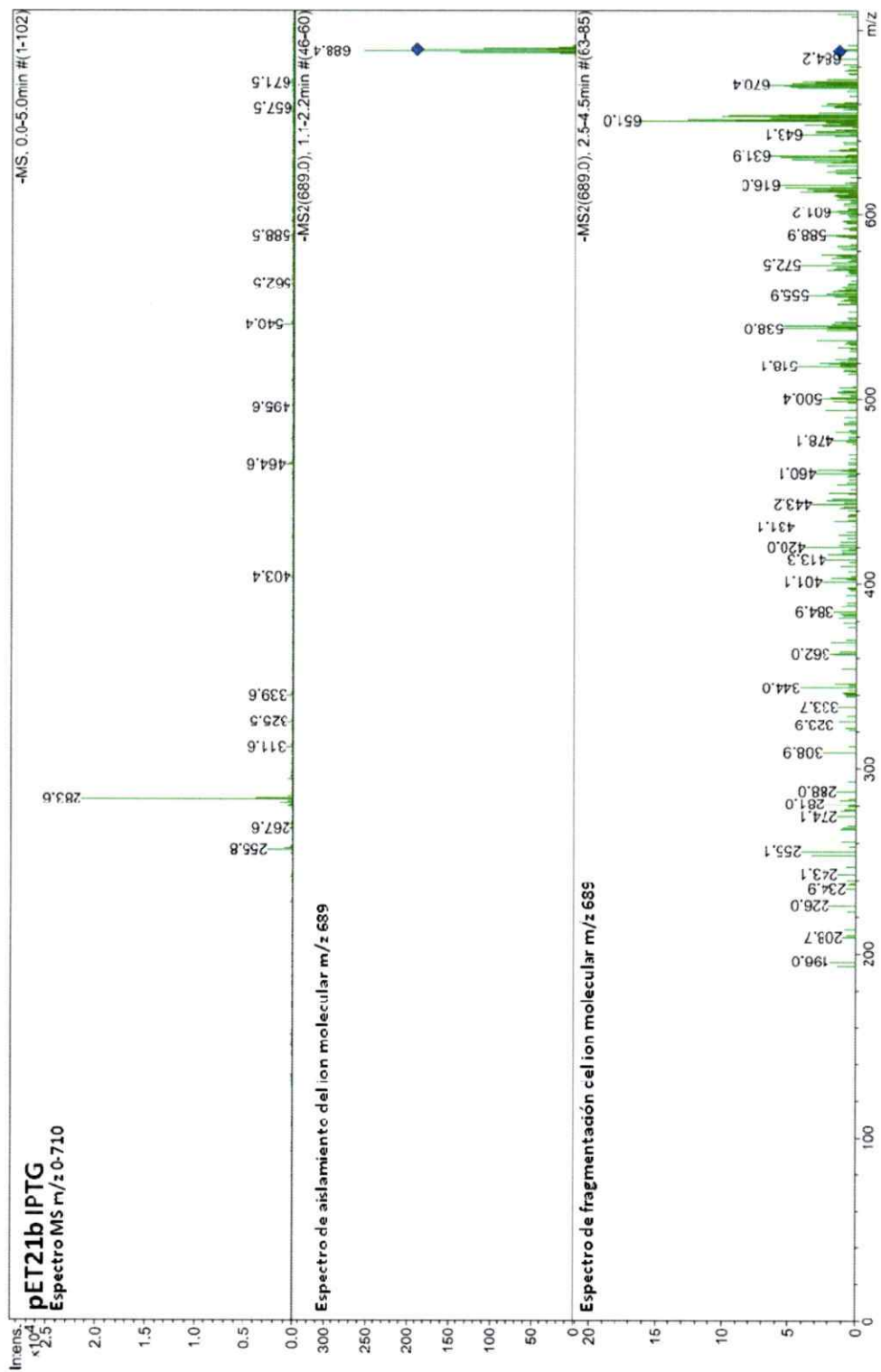
**ANEXO 8.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en extractos nucleotídicos de la *E. coli* TOP10 pBADTOPO::AFE1379 inducida con arabinosa sobreexpresando la proteína AFE1379 con dominios GGDEF y EAL de *A. ferrooxidans*. Se señalan las transiciones m/z 344 y m/z 538 (▼).



**ANEXO 9.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en un control (acetronitrilo 80% v/v y acetato de amonio 20 mM).



**ANEXO 10.** Análisis de la presencia del c-di-GMP en *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el pET-21 e inducida con IPTG.





**ANEXO 11. Análisis de la presencia del c-di-GMP en *E. coli* TOP 10 transformada con el pBADTOPO e inducida con arabinosa**

