

UCH-FC  
Biotecnología  
D542  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**“ESTUDIO DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS  
GENES HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 QUE CODIFICAN  
PUTATIVAS FOSFODIESTERASAS PERTENECIENTES A LA VÍA  
DEL C-DI-GMP EN *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463.”**

POR  
**MAURICIO JAVIER DÍAZ FUENZALIDA**



**SEMINARIO DE TÍTULO ENTREGADO A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN  
CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**JULIO, 2010**

**SANTIAGO - CHILE**

**DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO: DR. NICOLÁS GUILIANI GUERIN**





## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

**“ESTUDIO DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 QUE CODIFICAN PUTATIVAS FOSFODIESTERASAS PERTENECIENTES A LA VÍA DEL C-DI-GMP EN *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463.”**

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

**MAURICIO JAVIER DÍAZ FUENZALIDA**

Dr. Nicolás Guiliani Guerin  
**Director Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación**

Dra. Rosalba Lagos Mónaco  
**Presidente Comisión**

Dr. Sergio Álvarez Armijo  
**Evaluador**

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.



Una firma manuscrita en tinta negra sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Julio de 2010



Dedicado a la memoria de Julio Díaz, mi abuelo.



## Agradecimientos

A mi familia por apoyarme siempre durante mis estudios universitarios y durante el desarrollo de este seminario de título.

Al Dr. Nicolás Guiliani por permitirme realizar mi seminario de título en su laboratorio.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología y del Laboratorio de Comunicación Bacteriana por ayudarme cuando era necesario.

Al Proyecto Fondecyt 1080441 por financiar este seminario de título.

# ÍNDICE GENERAL



<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
1.1. Biolixiviación.	1
1.2. c-di-GMP.	2
1.2.1. Síntesis.	2
1.2.2. Degradación.	3
1.2.3. Regulación del nivel de c-di-GMP intracelular.	4
1.2.3.1.Regulación de la actividad enzimática.	6
1.2.3.1.1. Organización de las proteínas DGC y PDE.	6
1.2.3.1.2. Secuestro de módulos de control de c-di-GMP.	7
1.2.3.2.Regulación a nivel de la expresión génica.	8
1.2.4. Transducción de señales.	9
1.2.4.1.Dominio PilZ.	11
1.2.4.2.PelD.	12
1.2.4.3.FleQ.	12
1.2.4.4.LapD.	13
1.2.4.5.CLP.	13
1.2.4.6.Dominio GEMM.	14

1.2.5. C-di-GMP en microorganismos biomineros.	15
1.3. Hipótesis.	18
1.4. Objetivos.	18
1.4.1. Objetivo general.	18
1.4.2. Objetivos específicos.	18
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
2.1. Condiciones de cultivo de <i>A. thiooxidans</i> .	20
2.2. Análisis bioinformático del genoma de <i>A. thiooxidans</i> .	20
2.3. Purificación de DNA genómico.	21
2.4. Purificación de RNA total de <i>A. thiooxidans</i> .	22
2.5. Síntesis de cDNA.	23
2.6. RT-PCR.	23
2.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.	24
2.8. PCR en Tiempo Real (qPCR).	26
<b>3. RESULTADOS.</b>	<b>28</b>
3.1. Crecimiento de células de <i>A. thiooxidans</i> DSM 9463 en medio azufre o tiosulfato.	28
3.2. Búsqueda bioinformática en el genoma de <i>A. thiooxidans</i> .	29
3.3. Purificación de RNA total de <i>A. thiooxidans</i> .	33
3.4. RT-PCR.	34
3.5. PCR en Tiempo Real.	39
<b>4. DISCUSIÓN.</b>	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	<b>59</b>
<b>6. REFERENCIAS.</b>	<b>61</b>
<b>7. ANEXOS.</b>	<b>68</b>
7.1. Anexo 1. Datos obtenidos mediante qPCR para la cuantificación del número de copias de mRNA de los genes HD 83-19, HD 137-27, EAL 83-31 y DNA 16 S.	68

## ÍNDICE DE FIGURAS



- Figura 1.** Elementos moleculares involucrados en la vía de regulación del segundo mensajero c-di-GMP. 10
- Figura 2.** Crecimiento de *A. thiooxidans* en medio 9K modificado con azufre elemental como fuente energética. 30
- Figura 3.** Crecimiento de *A. thiooxidans* en medio DSMZ-71 con tiosulfato. 30
- Figura 4.** RNA total extraído a partir de células planctónicas cosechadas de *A. thiooxidans* DSM 9463 crecidas en azufre y tiosulfato y utilizados en los experimentos de RT-PCR y qPCR. 35
- Figura 5.** RT-PCR de los tres genes codificantes para PDEs a partir de células crecidas en azufre. 37
- Figura 6.** RT-PCR de los tres genes codificantes para PDEs a partir de células crecidas en tiosulfato. 38
- Figura 7.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen HD 137-27. 40
- Figura 8.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen HD 83-19. 41
- Figura 9.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen EAL 83-31. 42
- Figura 10.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen 16S. 43
- Figura 11.** Análisis de los cambios en la expresión de los tres genes codificando para PDEs determinados por PCR en Tiempo Real. 46



## ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1.</b> Número de genes relacionados al metabolismo del c-di-GMP presentes en diferentes bacterias.	5
<b>Tabla 2.</b> Partidores utilizados durante el desarrollo del seminario de título.	25
<b>Tabla 3.</b> Genes relacionados a la síntesis, degradación y señalización del c-di-GMP identificados en el genoma de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377.	32
<b>Tabla 4.</b> Número relativo de copias de cada transcrito en células cultivadas en azufre.	45
<b>Tabla 5.</b> Número relativo de copias de cada transcrito en células cultivadas en tiosulfato.	45
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para cada gen a lo largo del crecimiento en medio con azufre.	48
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para cada gen a lo largo del crecimiento en medio con tiosulfato.	48
<b>Tabla 8.</b> Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa HD 83-19.	51
<b>Tabla 9.</b> Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa HD 137-27.	51
<b>Tabla 10.</b> Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa EAL 83-31.	51
<b>Tabla 11.</b> Curvas de calibración obtenidas para cada gen mediante qPCR.	68
<b>Tabla 12.</b> Valores de Ct obtenidos para cada gen en células crecidas en azufre elemental.	69
<b>Tabla 13.</b> Valores de Ct obtenidos para cada gen en células crecidas en tiosulfato.	69



## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	Colección americana de microorganismos y cultivos celulares
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
cDNA	DNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGC	Diguanilato ciclasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DS	Dominio sensor
DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Sustancia polimérica extracelular
mRNA	RNA mensajero
PDE	Fosfodiesterasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA (solución tampón)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Trishidroximetilaminometano

## RESUMEN

La biolixiviación es un proceso de solubilización de minerales insolubles utilizado para la obtención de metales valiosos en yacimientos de baja ley que aprovecha el metabolismo energético de bacterias y arqueas, dentro de las cuales se encuentra la bacteria Gram-negativa *Acidithiobacillus thiooxidans*.

*Acidithiobacillus thiooxidans* es una  $\gamma$ -proteobacteria, acidófila y quimiolitotrófica que participa en el consorcio microbiano de biolixiviación de minerales sulfurados. La unión de la bacteria a la superficie del mineral y el desarrollo de una biopelícula es un paso crucial del proceso. En numerosas bacterias Gram-negativas, los procesos de adhesión a superficies y formación de biopelículas se encuentran bajo la regulación del mensajero secundario c-di-GMP. Éste es sintetizado a partir de GTP por proteínas con actividad diguanilato ciclasas (DGCs) y degradado por proteínas fosfodiesterasas (PDEs). Mediante cinco clases de receptores de naturaleza proteica y un dominio receptor conservado río arriba en algunos mRNA (riboswitch) se regulan procesos como motilidad, secreción de factores de adhesión a superficies, formación de biopelículas, respuesta a stress ambiental y virulencia.

Debido a la importancia del c-di-GMP en la formación de biopelículas, se decidió determinar si *Acidithiobacillus thiooxidans* poseía una vía metabólica funcional, al igual que las vías descritas en especies biomineras como *A. ferrooxidans* y *A. caldus*.

En una primera instancia se intentó hacer crecer la cepa de *A. thiooxidans* DSM 14887 (equivalente a la cepa ATCC 19377) para realizar los experimentos, pero no fue posible obtener un cultivo viable, por lo que tuvimos que realizar los experimentos con la cepa DSM 9463.

El análisis bioinformático de la secuencia genómica parcial de la cepa tipo ATCC 19377 de *A. thiooxidans* reveló la presencia de posibles genes que codificarían para proteínas con funciones relacionadas con el metabolismo y señalización del c-di-GMP. Entre los genes identificados figuran 7 proteínas con dominio GGDEF-EAL, 1 proteína con dominio HDOD-EAL, 1 proteína con dominio HDOD-GGDEF, 2 PDEs con dominio HD (HD 83-19 y HD 137-27), 1 PDE con dominio EAL (EAL 83-31) y 8 proteínas con dominio PilZ. Esto sugiere la existencia de una vía metabólica funcional en este microorganismo.

Mediante ensayos de RT-PCR y qPCR se procedió a determinar en forma cuantitativa la expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 en diferentes puntos de la curva de crecimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463 crecidos en diferentes sustratos energéticos.

Los experimentos de RT-PCR mostraron que en células crecidas en azufre elemental, los genes HD 83-19 y HD 137-27 aumentaban su expresión a lo largo de la curva de crecimiento, mientras que el gen EAL 83-31 disminuía su expresión a lo largo

del crecimiento. Por otro lado, en células crecidas en tiosulfato como sustrato se observó una disminución en la expresión para los tres genes durante el crecimiento.

Los experimentos de qPCR revelaron que la expresión del gen HD 83-19 aumentó un máximo de 3 veces a los 9 días, mientras que la expresión del gen HD 137-27 aumentó unas 12 veces a los 12 días de incubación. Por otro lado, la expresión del gen EAL 83-31 en células crecidas en azufre elemental, así como la expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 en células crecidas en tiosulfato, disminuyó 10 veces a lo largo del crecimiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran las primeras evidencias de la existencia de una vía funcional del c-di-GMP en *A. thiooxidans*. Los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 presentan una expresión dependiente del sustrato energético y del tiempo de crecimiento. La comprobación definitiva requerirá de experimentos de extracción de c-di-GMP, clonamiento de putativas DGC y PDE y medición de actividad PDE total.

## ABSTRACT

The bioleaching is an insoluble mineral solubilising process used to obtain various metals in deposits of low-grade that leverages the energy metabolism of Bacteria and Archaea, which is the gram-negative bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*.

*Acidithiobacillus thiooxidans* is an acidophilic and chemolithoautotrophic ( $\gamma$ )-proteobacteria that participates in the microbial consortium bioleaching of sulfide minerals. Union of the bacteria to the surface of the ore and the development of a biofilm is a crucial step in the process. In many gram-negative bacteria, surface attachment and biofilm formation are under the regulation of the secondary messenger c-di-GMP. It is synthesized from GTP by proteins with activity diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by protein phosphodiesterases (PDEs). Using five kinds of receptors of proteic nature and a receptor domain localized upstream in some mRNA (riboswitch) regulate processes as motility, secretion of adherence to surfaces, formation of biofilms, response to environmental stress and virulence factors.

Due to the importance of the c-di-GMP biofilm formation, it was decided to determine if *Acidithiobacillus thiooxidans* had a functional, metabolic pathway along with routes described in biomining species as *A. ferrooxidans* and *A. caldus*.

A first attempt to grow *A. thiooxidans* strain DSM 14887 (equivalent to strain ATCC 19377) to perform the experiments, but it was not possible obtain a viable culture, so we had to perform experiments with the DSM 9463 strain.

The partial genomic sequence of the strain bioinformatics analysis type strain ATCC 19377 of *A. thiooxidans* revealed the presence of possible genes that would codify for proteins with functions related to the c-di-GMP signaling and metabolism. Identified genes include 7 proteins with GGDEF-EAL domain, 1 protein with HDOD-EAL domain, 1 protein with HDOD-GGDEF domain, 2 PDEs with HD domain (HD 83-19 and HD 137-27), 1 PDE with EAL domain (EAL 83-31), and 8 proteins with PilZ domain. This suggests the existence of a functional metabolic pathway in this organism.

RT-PCR and qPCR trials proceeded to determine in quantitative terms the expression of genes HD 83-19, HD 137-27 and EAL 83-31 at different points of the curve in growth *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463 grown on different energy substrates.

RT-PCR experiments showed that in cells grown in elemental sulfur, 83-19 HD and HD 137-27 genes increased expression growth curve while the EAL 83-31 gene decreased expression growth curve. In addition, cells grown in thiosulphate as substrate noted a decrease in the expression for the three genes during growth.

qPCR experiments revealed that the HD 83-19 gene expression increased up to 3 times 9 days, while the HD 137-27 gene expression increased about 12 times 12 days incubation. On the other hand, the expression of the EAL 83-31 gene in cells grown in elemental sulphur as well as the expression of HD 83-19, HD 137-27 and EAL 83-31 genes in cells grown in thiosulphate, decreased 10 times along growth.

The obtain results in this research demonstrated the first evidences of functional c-di-GMP pathway in *A. thiooxidans*. The HD 83-19, HD 137-27 and EAL 83-31 genes have an expression energetic substrate and time of growth dependent. The final probe requires experiments of c-di-GMP extraction, putative DGC and PDE cloning, and total PDE activity measurement.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biolixiviación

Se define como biolixiviación al proceso natural de lixiviación o solubilización de minerales insolubles basado en el metabolismo energético de algunos microorganismos que obtienen la energía necesaria para realizar sus funciones vitales a partir de la oxidación de compuestos azufrados y/o ferrosos, presentes generalmente en los concentrados mineros. Este proceso es aplicado en la minería para la obtención de minerales valiosos como cobre u oro en depósitos de baja ley (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005), contrastando con el proceso de pirometalurgia, proceso en la cual los metales son obtenidos desde el mineral o su concentrado por utilización de calor (Castellanos, 2008), debido a que es menos contaminante.

Entre los diversos microorganismos participantes en el consorcio se encuentran bacterias Gram-negativas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* y *Leptospirillum sp.* (Goebel y Stackebrandt, 1994) y arqueas tales como *Ferroplasma acidiphilum*, *Sulfolobus metallicus* y *Methallosphaera sedula* (Auernik y col., 2008).

La adherencia celular a los sustratos minerales oxidables favorece el proceso de biolixiviación (Sand y col., 2001). Esta adherencia se realiza mediante la secreción de

sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que facilitan la formación de biopelículas (Lui y col., 2003; Kinsler y col., 2003; Harneit y col., 2006; Cotter y Stibitz, 2007). En la mayoría de las bacterias, los procesos de reducción de movilidad, adhesión a diversas superficies, producción de EPS y formación de biopelículas se encuentran regulados por dos vías: el “Quorum Sensing” (Huber y col., 2001; Labbate y col., 2004; Farah y col., 2005; Ruiz y col., 2008) y la vía del segundo mensajero nucleotídico diguanilato monofosfato cíclico o c-di-GMP (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004).

## **1.2. C-di-GMP**

El c-di-GMP, reconocido inicialmente como un activador alostérico de la celulosa sintasa en la bacteria degradadora de fruta *Gluconacetobacter xylinus* (antiguamente *Acetobacter xylinum*) (Weinhouse y col., 1997), es un segundo mensajero utilizado en la transducción de señales por diversos grupos de bacterias (Ryjenkov y col., 2005; Tamayo y col., 2007). Su impacto global sobre procesos fundamentales del desarrollo bacteriano ha sido reconocido en años recientes por análisis bioinformáticos y experimentales (Jonas y col., 2009).

### **1.2.1. Síntesis**

El c-di-GMP se sintetiza a partir de la condensación de 2 moléculas de GTP por una clase de enzimas llamadas diguanilato ciclasas (DGCs) que presentan en su

secuencia primaria el motivo altamente conservado característico GGDEF, cuyos aminoácidos contribuyen a la unión del sustrato y catálisis (Ausmees y col., 2001). Dado que el dominio GGDEF sólo puede unir una molécula de GTP, coordinado con dos  $Mg^{+2}$  (Wassmann y col., 2007), las proteínas DGCs son funcionales como dímeros, aunque también existen DGCs funcionales como trímeros o tetrámeros (Chan y col., 2004; Ryjenkov y col., 2005).

Gran parte de las proteínas con dominio GGDEF funcional presentan además un motivo regulador RXXD en el interior del dominio, relacionado con la regulación alostérica de la actividad DGC, denominado sitio I (Chan y col., 2004). Esto permite una inhibición no-competitiva de la enzima, impidiendo el agotamiento de GTP (Christen y col., 2006).

### **1.2.2. Degradación**

La degradación del c-di-GMP es llevado a cabo por dos clases de enzimas con actividad fosfodiesterasa (PDE) que presentan en su secuencia los motivos EAL o HD-GYP, siendo este último menos conocido, lo cual no significa que sea menos abundante (Römling y Simm, 2009).

Las fosfodiesterasas con dominio EAL hidrolizan el c-di-GMP dejando como producto único diguanilato lineal (pGpG), el cual es degradado a guanilato monofosfato (GMP) por nucleasas celulares. Esta actividad fosfodiesterasa es dependiente de  $Mg^{+2}$  o

Mn<sup>+2</sup> y es inhibida en presencia de Ca<sup>+2</sup> o Zn<sup>+2</sup> (Bobrov y col., 2005; Schmidt y col., 2005).

El dominio HD-GYP, el cual es un subgrupo de la superfamilia de fosfohidrolasas dependientes de metales HD, fue predicho por análisis bioinformáticos como una segunda clase de fosfodiesterasa específica de c-di-GMP, y luego comprobado experimentalmente (Ryan y col., 2006). El dominio HD-GYP, a diferencia del dominio EAL, cataliza la hidrólisis de c-di-GMP directamente a dos moléculas de GMP (Dow y col., 2006; Ryan y col., 2006; Ryan y col., 2009).

### **1.2.3. Regulación del nivel de c-di-GMP intracelular**

Dado que se trata de un segundo mensajero, el nivel intracelular total de c-di-GMP se encuentra alta- y dinámicamente regulado, siendo afectado por numerosos factores externos e internos. La regulación se realiza por control en la expresión génica y la modulación de las actividades enzimáticas responsables de su metabolismo, lo cual adquiere relevancia debido al elevado número de genes codificantes para proteínas con dominios DGC o PDE en los genomas. El número de genes es generalmente mayor en bacterias Gram-negativas que en bacterias Gram-positivas, en especial en las  $\gamma$ -proteobacterias, y no existe relación entre el número de genes y la distribución filogenética (Galperin y col., 2001a; Galperin, 2004; Kumar y Chatterji, 2008). En la Tabla 1 se aprecia el número de genes relacionados al metabolismo del c-di-GMP en diferentes tipos de bacterias.

**Tabla 1.** Número de genes relacionados al metabolismo del c-di-GMP presentes en diferentes bacterias. Los símbolos (+) o (-) indican bacteria Gram-positiva o Gram-negativa, respectivamente.

<b>Bacteria</b>	<b>Nº de genes</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (-)	17
<i>Aquifex aeolicus</i> (-)	20
<i>Bacillus halodurans</i> (+)	8
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	7
<i>Borrelia burgdorferi</i> (-)	3
<i>Caulobacter crescentus</i> (-)	14
<i>Deinococcus radiodurans</i> (+)	25
<i>Escherichia coli</i> (-)	36
<i>Mesorhizobium loti</i> (-)	41
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (+)	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	57
<i>Salmonella typhimurium</i> (-)	27
<i>Shigella flexneri</i> (-)	13
<i>Synechocystis</i> sp. (-)	38
<i>Thermotoga maritima</i> (-)	18
<i>Vibrio cholerae</i> (-)	72
<i>Xanthomonas campestris</i> (-)	37

### **1.2.3.1. Regulación a nivel de la actividad enzimática.**

#### **1.2.3.1.1. Organización de las proteínas DGC y PDE.**

Los dominios proteicos relacionados con la síntesis y degradación de c-di-GMP raramente se encuentran como único dominio del polipéptido. Generalmente suelen encontrarse en proteínas con múltiples dominios sensores (DS) que participan en la transducción de señales, ya sean citosólicos o unidos a membrana, en donde la combinación de dominios [DS-DGC-PDE] es común, aunque existen numerosas otras (Römling y col., 2005; Römling y Amikam, 2006; Hengge, 2009; Römling y Simm, 2009).

Algunos de los DS y reguladores identificados en proteínas con actividad DGC o PDE involucran: el dominio PAS asociado a grupos hemo o flavina, que sensa oxígeno o estado redox (Chang y col., 2001); el dominio GAF, que une pequeños ligandos o interactúa con otras proteínas (Hurley, 2003); Bacteriofitocromos que sensan la luz roja y el infrarrojo (Tarutina y col., 2006); el dominio regulador REC, el cual es fosforilado en un residuo aspartato conservado por un receptor de membrana con actividad quinasa, lo que activa al dominio regulador de respuesta, ya sea DGC u otro (Aldridge y col., 2003; Hickman y col., 2005); el dominio asociado a FAD, sensor de luz azul BLUF (Hasegawa y col., 2006); y los dominios transmembrana con ligando desconocido CHASE (Galperin y col., 2001a), MHYT (Galperin y col., 2001b), MASE1 y MASE2 (Nikolskaya y col., 2003).

### 1.2.3.1.2. Secuestro de módulos de control de c-di-GMP.

El secuestro de proteínas GGDEF y EAL significa que no todas estas proteínas se encuentran presentes y activas en el mismo tiempo y lugar, lo que permite la existencia de vías que regulan un proceso determinado. Se proponen dos mecanismos de secuestro de proteínas: temporal y funcional.

El secuestro temporal significa que los niveles de proteínas DGC y PDE, así como sus actividades, cambian en respuesta a alteraciones ambientales o celulares a lo largo del tiempo, lo que limita el número y/o tipo de proteínas DGC y PDE activas bajo condiciones particulares en un momento dado. Además, los grupos cambiantes de proteínas involucran cambios en los dominios sensores que pueden influir en el control del nivel de c-di-GMP (Kirillina y col., 2004; Tamayo y col., 2008).

El mecanismo de secuestro funcional implica que módulos completos de control y señalización de c-di-GMP se encuentran presentes en la célula, pero operan en entidades físicamente separadas o micro-compartimientos, generando “depósitos” de c-di-GMP. (Amikam y Galperin, 2006; Weber y col., 2006). Un ejemplo de control espacial se da durante la división asimétrica de la bacteria *Caulobacter crescentus*, que deja como resultado una célula adherida y una célula mótil. Durante la diferenciación celular, la DGC PleD se localiza en el polo celular en contacto con la superficie, donde se sintetiza el sistema de adhesión (tallo y base), mientras que la PDE TipF se dirige al polo

opuesto, donde estimula la síntesis del aparato flagelar al degradar c-di-GMP (Duerig y col., 2009).

### 1.2.3.2. Regulación a nivel de la expresión génica.

El control del nivel de proteínas DGC o PDE presentes en la célula se realiza tanto a nivel de la transcripción como a nivel de la estabilidad del RNA mensajero (mRNA). Estudios recientes realizados en diversas bacterias, demostraron que diversos reguladores globales de la expresión génica participan en la regulación de la red metabólica del c-di-GMP a múltiples niveles (Jonas y col., 2009). Entre los reguladores globales participantes se encuentran i) el factor sigma S ( $\sigma$ S), el cual es requerido para la expresión de siete proteínas GGDEF/EAL (Weber y col., 2005) y de CsgD, regulador principal en la formación de biopelículas (Brombacher y col., 2006; Simm y col., 2009) que regula la expresión de la DGC AdrA y la PDE YoaD y STM1827 en *E. coli* y *S. typhimurium*, respectivamente, permitiendo el control en la producción de celulosa (Römling y col., 2000; Brombacher y col., 2006); ii) FliA, el cual regula en forma positiva la expresión de la PDE YhjH y YcgR, proteína receptora con dominio PilZ en *E. coli* y *S. typhimurium* (Claret y col., 2007); iii) la proteína de unión a cAMP CRP, la cual unida a cAMP regula la formación de biopelículas en forma positiva *E. coli* (Jackson y col., 2002) o negativa en *Vibrio cholerae* al regular la expresión de proteínas GGDEF, EAL y HD-GYP y reprimir a la DGC CdgA (Fong y Yildiz, 2008); iv) el regulador de Quorum Sensing HapR en *Vibrio cholerae*, el cual reprime la formación de biopelículas al regular en forma directa o indirecta la expresión de 14 proteínas

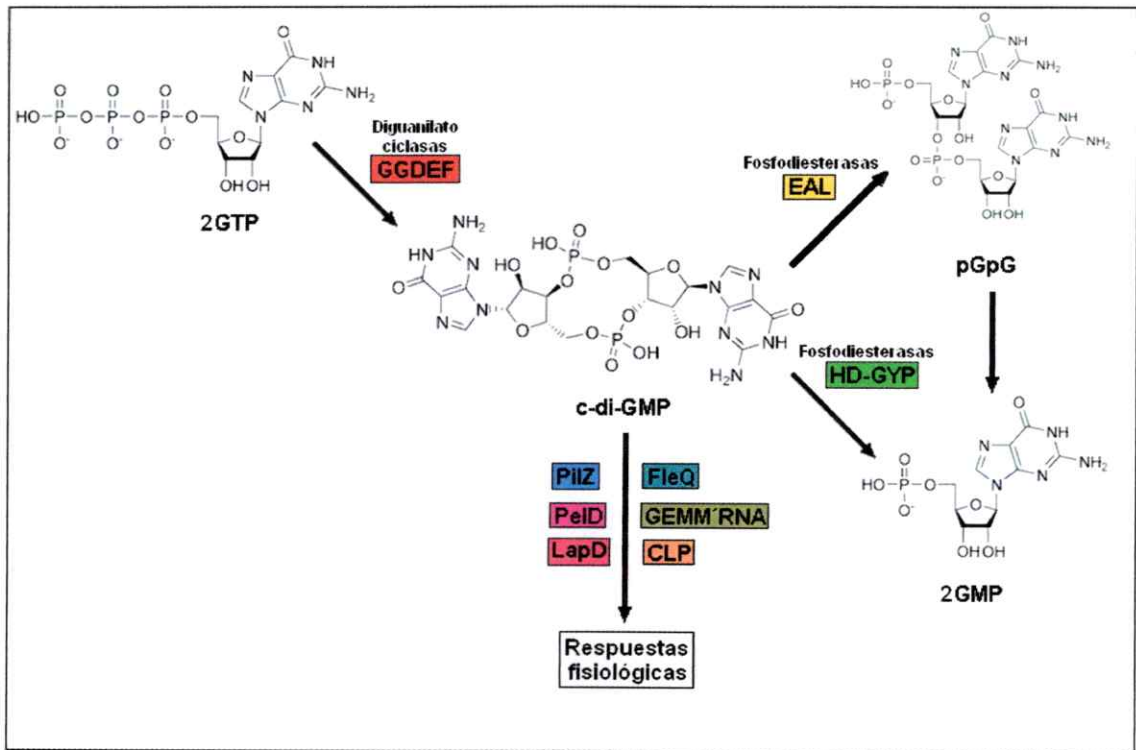


GGDEF/EAL, además de activar la expresión de cuatro proteínas HD-GYP (Hammer y Bassler, 2008; Waters y col., 2008); v) CpxR, parte del sistema de dos componentes CpxAR que induce la transcripción de la proteína DGC YdeH en *E. coli* (Yamamoto e Ishihama, 2005); y vii) la proteína de unión a RNA CsrA, que reprime la expresión de las proteínas DGC YdeH e YcdT en *E. coli* (Jonas y col., 2008).

#### **1.2.4. Transducción de señales**

Actualmente, se conocen dos clases principales de moléculas receptoras que unen c-di-GMP: las familias proteicas PilZ, PelD, FleQ, LapD y CLP y el dominio ribonucleico GEMM, aunque no se descarta la existencia de otros posibles receptores, como dominios GGDEF y EAL degenerados (Duerig y col., 2009; Newell y col., 2009). Estos grupos de receptores regulan positiva o negativamente diversos eventos fisiológicos (Figura 1). La regulación se da a nivel de la transcripción (Hickman y Harwood, 2008), la traducción (Sudarsan y col., 2008) y la post-traducción a nivel de i) la actividad (Ryjenkov y col., 2006; Lee y col., 2007; Merighi y col., 2007), ii) la secreción (Monds y col., 2007) o iii) la estabilidad de la proteína (Duerig y col., 2009).

Entre los diversos fenotipos que se han visto afectados por los niveles de c-di-GMP en diferentes bacterias se encuentran la motilidad (Huber y col., 2001; Simm y col., 2004; Wolfe y Visick, 2008), la secreción de EPS (Ross y col., 1987; Weinhouse y col., 1997; Merighi y col., 2007), la adhesión a superficies (Claret y col., 2007), la



**Figura 1.** Elementos moleculares involucrados en la vía de regulación del segundo mensajero c-di-GMP. El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por el dominio GGDEF presente en DGCs. El dinucleótido puede ser degradado por los dominios EAL o HD-GYP presentes en PDEs. Los dominios proteicos PilZ, PeiD, FleQ, LapD y CLP, y el dominio ribonucleico estructural GEMM son capaces de transducir los cambios de concentración de c-di-GMP en respuestas fisiológicas.

formación de biopelículas (Huber y col., 2001; Thormann y col., 2006; Nakhamchick y col., 2008), la virulencia en diversos patógenos de plantas y animales (Kulasakara y col., 2006; Ryan y col., 2007; Tamayo y col., 2007; McCarthy y col., 2008; Tamayo y col., 2008; Lai y col., 2009), la quimiotaxis en *Pseudomonas putida* (Sarand y col., 2008), la supervivencia a largo plazo en *Mycobacterium smegmatis* (Kumar y Chatterji, 2008), el desarrollo de heterocistos en *Anabaena sp.* (Nuenuebel y Golden, 2008), la progresión y regulación del ciclo celular en *Caulobacter crescentus* (Duerig y col., 2009), la resistencia a antibióticos en *Aeromonas jandaei* (Alksne y Rasmussen, 1997), la respuesta a estrés ambiental en *Pseudomonas aeruginosa* (Klebensberger y col., 2008), la frecuencia de transposición en *E. coli* (Hyde y Tu, 1985) y la fotosíntesis en *Synechococcus elongatus* (Thomas y col., 2004).

#### **1.2.4.1. Dominio PilZ**

El dominio PilZ, descubierto en *Pseudomonas aeruginosa*, fue propuesto a partir de análisis bioinformáticos como posible receptor de c-di-GMP, siendo después comprobado experimentalmente (Amikam y Galperin, 2006; Ramelot y col., 2007). Posee en su secuencia primaria dos motivos altamente conservados RxxxR y D/NxSxxG. Estos están ubicados en los primeros 30 aminoácidos del dominio PilZ (Benach y col., 2007), y participarían en la unión del ligando. Dentro de los procesos regulados por proteínas con dominio PilZ se encuentran procesos como la biosíntesis de alginato (Merighi y col., 2007) y celulosa (Weinhouse y col., 1997), motilidad

(Ryjenkov y col., 2006), virulencia (McCarthy y col., 2008) y formación de biopelículas (Pratt y col., 2007).

#### **1.2.4.2. PelD**

PelD, perteneciente al operón *pel*, es una proteína reguladora cuya función se encuentra relacionada con la regulación positiva de la síntesis de exopolisacáridos de tipo *pel*, ricos en glucano (Friedman y Kolter, 2004). Presenta un motivo RxxD, similar al sitio I presente en proteínas GGDEF, además de cierto grado de similitud estructural (Christen y col., 2006), por lo cual se ha sugerido que el dominio de unión a c-di-GMP de PelD es un dominio GGDEF degenerado (Lee y col., 2007).

#### **1.2.4.3. FleQ**

FleQ, recientemente descubierto en *P. aeruginosa*, es un regulador transcripcional que regula en forma negativa la producción de exopolisacáridos al reprimir la transcripción de los genes codificantes para las proteínas que los sintetizan. Al unir c-di-GMP mediante el dominio AAA, FleQ pierde afinidad por el promotor de los genes codificantes para la síntesis de EPS, permitiendo entonces su transcripción (Hickman y Harwood, 2008).

#### **1.2.4.4. LapD**

LapD, descubierta en *Pseudomonas fluorescens*, es una proteína de membrana interna requerida para la formación de biopelículas y el mantenimiento de la adhesina LapA en la superficie. Posee un dominio periplasmático, un dominio regulador negativo denominado HAMP, un dominio GGDEF degenerado y un dominio EAL degenerado. Cuando LapD une c-di-GMP a través del dominio EAL, el dominio HAMP cambia su conformación y permite la activación del dominio periplasmático, el cual se une a LapA (Newell y col., 2009).

#### **1.2.4.5. CLP**

CLP es un regulador transcripcional que posee identidad de secuencia y similitud estructural con la proteína de unión a cAMP CRP. A diferencia de CRP, CLP se encuentra unido a secuencias promotoras cuando no une c-di-GMP. En *Xanthomonas campestris*, la unión del c-di-GMP a CLP regula en forma negativa procesos relacionados a la virulencia, como síntesis de exopolisacáridos, producción de celulasas extracelulares y síntesis de la poligalacturonato liasa (Tao y col., 2010; Chin y col., 2010).

#### 1.2.4.6. Dominio GEMM

La segunda clase de moléculas receptoras que unen c-di-GMP es de naturaleza ribonucleica. Se denominan riboswitches tipo GEMM (sigla de “genes for the environment, membranes and motility”), los cuales son dominios estructurales ubicados río arriba en la región 5' no codificante de ciertos RNA mensajeros, que regulan en forma positiva o negativa la expresión post-transcripcional en respuesta a la concentración de c-di-GMP. Se componen de dos estructuras: una región de unión a ligando o aptámero y una región efectora o plataforma de expresión (Roth y Breaker, 2009). Análisis experimentales han determinado la estructura cristalina del riboswitch en conjunto con su ligando (Kulshina y col., 2009). La constante de afinidad ( $K_d$ ), cuyo valor es de aproximadamente 10 pM, indica una afinidad mayor por c-di-GMP que cualquiera de las proteínas conocidas que unen c-di-GMP, para las cuales se han descrito  $K_d$  del orden de nM a  $\mu$ M (Smith y col., 2009).

El motivo GEMM es un patrón estructural altamente conservado, encontrado frecuentemente en genes que codifican proteínas con dominios GGDEF o EAL u operones que median fenotipos que son regulados por c-di-GMP, como biosíntesis de flagelo o motilidad (Sudarsan y col., 2008).

### 1.2.5. C-di-GMP en microorganismos biomineros

Los diversos componentes de la vía del c-di-GMP han sido identificados mediante análisis bioinformáticos en genomas de dos bacterias biomineras, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009) y *Acidithiobacillus caldus* (Castro y col., 2009).

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (conocido antes como *Thiobacillus ferrooxidans*) es una  $\gamma$ -proteobacteria que puede utilizar como sustrato oxidable azufre elemental, ión ferroso, compuestos reducidos de azufre o minerales sulfurados (Kelly y Wood, 2000). Es el microorganismo del consorcio biominero más estudiado y fue el primer microorganismo extremófilo al que se identificó la existencia de posibles componentes de la vía del c-di-GMP (Ruiz y col., 2007). Los primeros componentes identificados en la cepa tipo ATCC 23270 involucran a 4 genes codificando para proteínas con los dominios GGDEF-EAL, asociados a un dominio transductor de señales del tipo PAS (AFE\_1360 y AFE\_1379) o del tipo GAF (AFE\_0053 y AFE\_1373) y una fosfodiesterasa con dominio EAL (AFE\_1852) (Ruiz y col., 2007). Análisis bioinformáticos posteriores revelaron además la presencia de tres genes codificantes para proteínas con dominio HD (una variante del dominio HD-GYP), un receptor con dominio PilZ y algunos reguladores transcripcionales con el sitio AAA $\sigma^{54}$  de unión a c-di-GMP. Posteriormente, se comprobó mediante experimentos de análisis de transcripción, extracción de c-di-GMP y análisis de actividad PDE que *Acidithiobacillus ferrooxidans* posee una vía funcional de c-di-GMP (Ruiz, 2010).

*Acidithiobacillus caldus* (conocido antes como *Thiobacillus caldus*) es una bacteria termófila moderada que puede utilizar azufre elemental o tetrionato como fuente energética (Kelly y Wood, 2000). En el genoma parcialmente secuenciado de la cepa tipo ATCC 51756 han sido identificados ocho genes codificantes para proteínas con dominio GGDEF, dos proteínas con dominio EAL, tres proteínas con dominio HD, seis proteínas con configuración GGDEF-EAL, una proteína HDOD-GGDEF (HDOD es otra variante del dominio HD-GYP), una proteína EAL-HDOD, así como varias proteínas con dominio PilZ, proteínas tipo PelD y proteínas tipo FleQ. Al igual que en *A. ferrooxidans*, se realizaron ensayos de análisis de transcripción y extracción de c-di-GMP para comprobar la funcionalidad de algunos de estos componentes (Castro y col., 2009) y se encontró que la vía es funcional en esta bacteria.

*Acidithiobacillus thiooxidans* (conocido antes como *Thiobacillus thiooxidans*) es una  $\gamma$ -proteobacteria Gram-negativa, acidófila y quimiolitotrófica que participa en el consorcio microbiano de biolixiviación de minerales. Para generar su energía metabólica *A. thiooxidans* utiliza como sustrato oxidable azufre elemental o compuestos reducidos de azufre. Es incapaz de oxidar pirita a menos que se co-cultive con bacterias como *Leptospirillum ferrooxidans*, un microorganismo hierro-oxidante incapaz de oxidar azufre (Kelly y Wood, 2000). Existen diversos estudios en *A. thiooxidans* acerca del metabolismo (Ramírez y col., 2009), la lixiviación de minerales (Xia y col., 2010), la capacidad de disolución de cationes metálicos en suelos contaminados (Wang y col.,



2007) y análisis bioquímicos de enzimas relacionadas al metabolismo de compuestos reducidos de azufre (Nakamura y col., 2001).

Sin embargo, a diferencia de *A. ferrooxidans* y *A. caldus*, no existen estudios sobre la vía del c-di-GMP en *A. thiooxidans*, por lo que en el presente trabajo se propuso analizar la posible existencia de componentes de esta vía metabólica mediante un análisis bioinformático y luego determinar mediante experimentos de RT-PCR y qPCR si algunos de los genes identificados por este análisis se expresan. Este trabajo se enfocó en estudiar la expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31, los cuales codificarían para proteínas con actividad PDE, en función del tiempo de crecimiento, sea en células crecidas en azufre elemental o células crecidas en tiosulfato como sustratos energéticos.

### **1.3. Hipótesis**

*Acidithiobacillus thiooxidans* posee los elementos moleculares que conforman la vía del c-di-GMP.

Tal como se ha observado en otras bacterias, esta vía podría estar relacionada con la formación de biopelículas en esta bacteria.

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Caracterizar la vía del mensajero secundario c-di-GMP en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

**1.4.2.1.** Realizar una búsqueda bioinformática de posibles genes involucrados en la vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus thiooxidans*.

**1.4.2.2.** Analizar la expresión transcripcional de los genes codificantes para proteínas con dominio PDE solos en células crecidas en azufre o tiosulfato.

- 1.4.2.2.1. Diseñar partidores para los genes seleccionados mediante los programas de diseño AmpliX 1.4 y Light Cycler Probe Design Software 2.0.
- 1.4.2.2.2. Extraer el RNA total desde células de *A. thiooxidans* crecidas en tiosulfato o azufre mediante el protocolo de extracción con Trizol para bacterias acidófilas.
- 1.4.2.2.3. Analizar la expresión transcripcional en forma cualitativa o cuantitativa mediante la técnica de RT-PCR o qPCR, respectivamente.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Condiciones de cultivo de *A. thiooxidans*

Las células de la cepa DSM 9463 de *A. thiooxidans* fueron crecidas aeróbicamente por un período máximo de doce días en medio DSMZ 71 con tiosulfato como fuente energética ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,25 g/L,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  5 g/L, pH 4,4-4,7) (Ramírez y col., 2004) o medio 9K modificado con azufre como fuente energética ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0,04 g/L,  $\text{S}^0$  en perlas 50 g/L, pH 2,5 ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado) (Amaro y col., 1991; Guiliani y Jerez, 2000; Ruiz y col., 2008) a una temperatura de 30°C con agitación recíproca a 70 rpm, a una razón líquido/volumen total de 1/5. La concentración inicial de células utilizada para todos los cultivos fue aproximadamente  $10^7$  células/ml. Para seguir el crecimiento de los cultivos bacterianos en diferentes condiciones de cultivo se realizó el conteo de bacterias totales en una cámara de conteo Petroff-Hausser.

### 2.2. Análisis bioinformático del genoma de *A. thiooxidans*

Las secuencias parciales de genoma de la cepa tipo ATCC 19377 fueron proveídas por el Centro de Bioinformática y Biología del Genoma, Universidad Andrés Bello, dirigido por el Dr. Holmes. Utilizando el programa de anotación Artemis (The Sanger Centre, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) y el algoritmo BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se procedió a caracterizar los ORFs que

codificarían proteínas relacionadas con la vía del c-di-GMP, ya sean DGCs, PDEs o proteínas receptoras de c-di-GMP.

### **2.3. Purificación de DNA genómico**

A partir de células de *A. thiooxidans* cosechadas por centrifugación se procedió a realizar la extracción del DNA genómico mediante el protocolo de extracción para bacterias Gram-negativas del Kit Wizard de purificación de DNA genómico (Promega®). El paso de preparación de las células fue modificado y adaptado para bacterias acidófilas de la siguiente manera: 200 ml de cultivo en fase estacionaria se centrifugaron a 6000 g durante 10 min. El sedimento celular obtenido se lavó tres veces con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 1,8) con el objetivo de eliminar el exceso de sales e iones presentes en el cultivo, centrifugando a 6000 g durante 3 minutos. Posteriormente, el protocolo de extracción se utilizó sin modificación, exceptuando el último paso en que se resuspendió el precipitado de DNA en 100 µl de agua nanopura estéril. Finalmente se sometió el DNA obtenido a diálisis contra agua nanopura sobre un filtro de nitrocelulosa durante 40 minutos. La concentración de DNA obtenido se determinó espectrofotométricamente mediante el sistema Nanodrop. El DNA genómico obtenido se diluyó a una concentración de 100 ng/µl como solución basal para la preparación de soluciones de 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> ng/µl de DNA genómico para la calibración del PCR en Tiempo Real.

#### **2.4. Purificación de RNA total de *A. thiooxidans***

En distintos puntos de la curva de crecimiento (3, 9 y 12 días de cultivo) se procedió a realizar la extracción del RNA total de células de *A. thiooxidans* crecidas en medio tiosulfato y/o azufre mediante un protocolo modificado de extracción mediante Trizol® (Invitrogen®), en base al método de extracción de RNA con fenol caliente (Farah y col., 2005; Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009), adaptado para bacterias acidófilas: 250 ml (3 días), 200 ml (9 días) o 150 ml (12 días) de cultivo celular se centrifugaron a 6000 g durante 20 minutos. Las células se lavaron tres veces con solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 1,8) y una vez con citrato trisódico 10 mM (pH 7,0), centrifugando a 6000 g durante 3 minutos y luego se determinó la masa húmeda del sedimento celular. Se distribuyeron aproximadamente 10 mg de células por tubo. Las células se trataron con solución de lisis (Acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,5%, pH 5,5) previo a la adición de Trizol. La precipitación del RNA se realizó con 1/10 de volumen de Acetato de sodio 3 M pH 5,5 y 2 volúmenes de Etanol 100% durante 8 horas a -20°C, seguido de una centrifugación a 16000 g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado de RNA se lavó dos veces con Etanol 70%, centrifugando a 14000 g durante 20 minutos a 4°C. El RNA se resuspendió en un volumen final de 20-30 µl de agua DEPC. El RNA obtenido se trató mediante digestión con DNasa I recombinante de Roche®, según instrucciones del proveedor. La concentración de RNA total obtenido se determinó mediante el sistema de espectrofotometría Nanodrop, midiendo antes y después del tratamiento con DNasa.

## 2.5. Síntesis de cDNA

El RNA extraído fue utilizado para la producción de cDNA mediante la técnica de Transcripción Reversa con la enzima Improm II (Promega®). Se preparó una solución con 500 ng de hexámeros aleatorios como partidores y 800 ng de RNA purificado en agua libre de nucleasas. La solución se calentó a 70°C durante 5 minutos para denaturar el RNA y después fue incubado en hielo. La solución de RNA se añadió a una mezcla de reacción que contiene agua libre de nucleasas, solución amortiguadora de reacción, dNTPs 0,5 mM c/u, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 20 U de inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin® y la enzima transcriptasa reversa o agua libre de nucleasas para los controles negativos, con el objetivo de verificar la ausencia de DNA genómico contaminante en las preparaciones de RNA. Se incubó a 25 °C durante 5 minutos y posteriormente a 42°C durante 1 hora. La enzima se inactivó incubando la solución de reacción a 70 °C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se utilizó para análisis de expresión cualitativo y cuantitativo mediante RT-PCR y qPCR, respectivamente.

## 2.6. RT-PCR

Los partidores utilizados en las reacciones de PCR se diseñaron mediante el programa AmpliX 1.4, en base a la secuencia parcial del genoma de *A. thiooxidans* DSM 14887 introducida en formato compatible mediante el programa Artemis, con excepción de los partidores utilizados para cuantificación de la expresión del rRNA 16S (Tabla 2). Se utilizó como templado 100 ng de DNA genómico de la cepa DSM 9463 o 1 µl de

cada solución de cDNA sintetizado a partir de RNA purificado (diluido 1/20) en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 175 ng de cada partidor, dNTPs 80 µM cada uno, DMSO 5% v/v, solución amortiguadora de reacción con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Fermentas®, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM y 0,5 U de Taq DNA polimerasa recombinante Fermentas®. Se preparó en forma separada una mezcla que contenía los partidores, dNTPs, DMSO y DNA templado, y otra mezcla con la solución amortiguadora de reacción, MgCl<sub>2</sub> y la enzima. Se procedió a realizar el programa de reacción con la mezcla que poseía el DNA templado, mientras que la mezcla que contenía la enzima se añadió a la reacción después del paso de denaturación inicial. El programa de la reacción fue el siguiente: 3 min a 95 °C, seguido por 38 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 62 °C, 30 s a 72 °C y una extensión final de 3 min a 72 °C, realizado en un termociclador Boeco TC-PRO.

## **2.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa**

Para visualizar el DNA cromosómico, el RNA extraído y los productos de PCR, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa ultra pura 1-2% p/V, según se requiriera, en amortiguador TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0). Las muestras de ácidos nucleicos se mezclaron con amortiguador de carga 6X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 60 mM, Glicerol 60 %, Azul de Bromofenol 0,25 %, pH 7,6). La corrida se realizó a 100 V durante 30 minutos.



**Tabla 2.** Partidores utilizados durante el desarrollo de este seminario de título.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>HD 83-19 Fw</b>	5'-CAACGCGCGCTTTATAAGTTGC-3'	Este estudio
<b>HD 83-19 Rev</b>	5'-TGAGTACAGACATCCGGGTTTC-3'	Este estudio
<b>HD 137-27 Fw</b>	5'-TGGCCGATGAAATCGCCTA-3'	Este estudio
<b>HD 137-27 Rev</b>	5'-GGCAATGCTGGTGATATGATTAC-3'	Este estudio
<b>EAL 83-31 Fw</b>	5'-TTCGGCACGCAAAATGTTGGAC-3'	Este estudio
<b>EAL 83-31 Rev</b>	5'-CTTCCAGCATATCGGCTTTGGGTT-3'	Este estudio
<b>ATT_F (16S)</b>	5'-GGGTGCTAATANCGCCTGCG-3'	Remonsellez y col. (2009)
<b>907R (16S)</b>	5'-CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT-3'	Casamayor y col. (2002)

La tinción de los geles se realizó durante 15-30 min, en una solución de TAE 0,5X con bromuro de etidio (BrEt) 0,63 nM. Las bandas de DNA se visualizaron por la emisión de fluorescencia al irradiar con luz ultravioleta.

## 2.8. PCR en Tiempo Real (qPCR)

Para la determinación de la cuantificación relativa de la expresión de los genes a estudiar, se utilizó la técnica de qRT-PCR usando como sistema reportero la molécula fluorescente SYBR Green mediante el kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche®. Para la calibración se utilizaron soluciones de DNA genómico de concentración conocida considerando que el tamaño del genoma de *A. thiooxidans* DSM 9463 es de 3,03 Mb y su peso molecular es  $2,00 \times 10^9$  g/mol y que un genoma pesa  $3,32 \times 10^{-15}$  g/mol. Se preparó una mezcla de reacción en que se utilizaron como templado 2  $\mu$ l de una solución de DNA genómico de concentración conocida, 2  $\mu$ l de una solución 1/25 de cDNA sintetizado a partir de RNA purificado o 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O para el control negativo. El volumen final de reacción fue de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción contenía MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, partidores específicos del gen a analizar 0,4  $\mu$ M para cada uno, DNA templado y “mix” de PCR “LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I”, el cual contiene la enzima Taq polimerasa, la sonda fluorescente SYBR Green, dNTPs y solución amortiguadora de reacción. La normalización de los resultados se realizó mediante la determinación del número de copias del cDNA obtenido a partir del rRNA 16S. Se empleó el termociclador Rotor-Gene 6000 de Corbett. La reacción empezó con una pre-incubación a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de denaturación a

95°C durante 10 segundos, alineamiento por 5-10 segundos a 57- 60°C, dependiente del gen a analizar y amplificación a 72°C durante 12 segundos para los genes a analizar y 20 segundos para el gen ribosomal. Finalmente, se analizó la especificidad mediante un análisis de denaturación desde la temperatura de alineamiento hasta 95°C.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Crecimiento de células de *A. thiooxidans* DSM 9463 en medio azufre o tiosulfato.

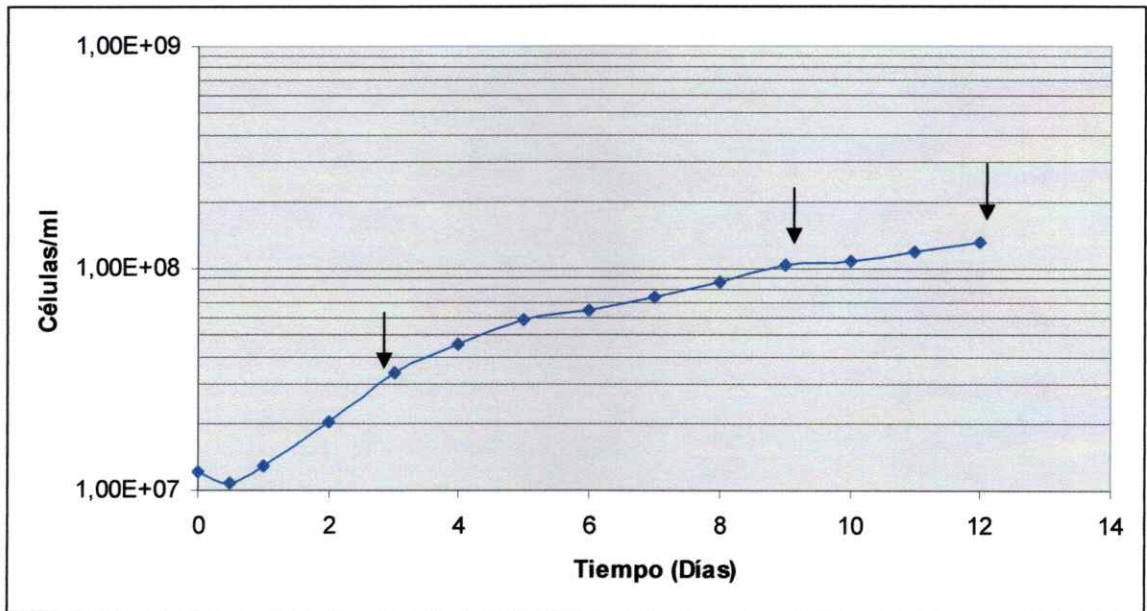
En primer lugar se decidió intentar crecer la cepa tipo DSM 14887 (equivalente a la cepa ATCC 19377) comprada a la colección alemana DSMZ, mediante cultivos a menor escala en el medio de cultivo recomendado, pero no fue posible obtener crecimiento celular debido al estado metabólico de las bacterias y al bajo número celular que venía en la muestra enviada desde Alemania, por lo que tuvimos que utilizar la cepa DSM 9463, la cual nunca había sido crecida en el laboratorio, con excepción de cultivos de mantención. Para la obtención de células desde los diferentes medios de cultivo fue necesario optimizar la metodología de cultivo de este microorganismo acidófilo. Las bacterias deben ser lavadas varias veces para asegurar de mantener las mismas condiciones iniciales de cultivo y obtener resultados reproducibles. En la preparación de los cultivos en tiosulfato, el lavado adquiere una mayor importancia ya que la adición de una solución de bacterias muy ácida causa la precipitación del tiosulfato. El cultivo de estos microorganismos toma varios días, a diferencia de bacterias como *E. coli* que demora unas pocas horas, debido a su lento crecimiento.

Una vez perfeccionada la metodología de obtención de cultivos celulares de *A. thiooxidans* en azufre y tiosulfato como sustrato energético fue posible determinar un patrón de crecimiento. En células crecidas en azufre elemental se observó la existencia

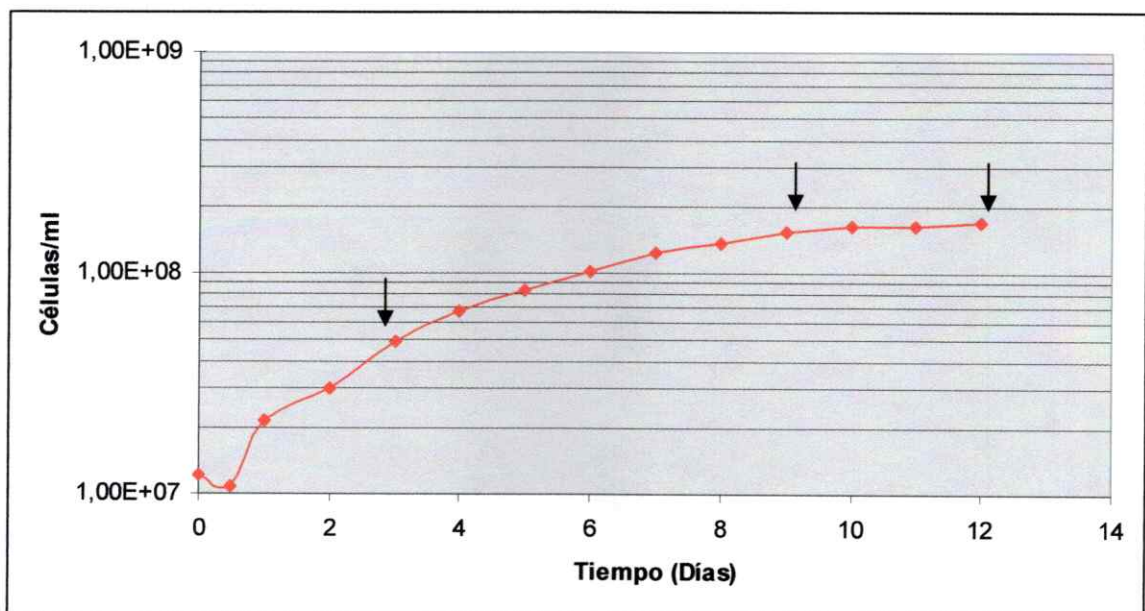
de una fase de latencia de alrededor de un día con una transición de dos días a la fase exponencial (Figura 2). En células crecidas en tiosulfato la fase de latencia parece ser muy corta, por lo que las células entran rápidamente a la fase exponencial de crecimiento a partir del segundo día de incubación. Alrededor del noveno día se observa un cambio en el crecimiento que indicaría la entrada a la fase estacionaria (Figura 3).

### **3.2. Búsqueda bioinformática de genes pertenecientes al metabolismo y señalización del c-di-GMP en el genoma de *A. thiooxidans*.**

La determinación de la posible existencia de una vía metabólica puede realizarse mediante un análisis bioinformático de la secuencia genómica con el fin de identificar marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para posibles proteínas que participan en la vía. Debido a que el genoma de *A. thiooxidans* DSM 9463 no está secuenciado, en colaboración con el laboratorio del Dr. Holmes (Centro de Bioinformática y Biología del Genoma, Universidad Andrés Bello), realizamos los análisis a partir de la secuencia del genoma de la cepa tipo ATCC 19377 de *A. thiooxidans*, suponiendo que si los genes candidatos existen en esta cepa, podrían estar también en la cepa DSM 9463.



**Figura 2.** Crecimiento de *A. thiooxidans* en medio 9K modificado, con azufre elemental como fuente energética. Las células fueron crecidas durante 12 días. Las flechas indican los puntos de extracción de RNA.



**Figura 3.** Crecimiento de *A. thiooxidans* en medio DSMZ-71 con tiosulfato. Las células fueron crecidas durante 12 días. Las flechas indican los puntos de extracción de RNA.

Los análisis bioinformáticos revelaron en primera instancia la existencia de varios genes relacionados con el metabolismo y señalización del c-di-GMP (Tabla 3): a lo menos siete genes que codificarían para proteínas con dominios [GGDEF-EAL], una PDE con dominio EAL, dos PDEs con dominio HD, una proteína con dominios [HDOD-GGDEF], una proteína con dominios [EAL-HDOD]. Además, se identificaron ocho posibles receptores con dominio PilZ, aunque solamente 3 presentan un “e-value” significativo. Debido a que la secuencia genómica no está completa, existe la posibilidad de que otras proteínas con dominio GGDEF, EAL o HD, así como proteínas con dominio PilZ, tipo PelD o tipo FleQ estén codificadas en el genoma de *A. thiooxidans*.

En base al número de posibles proteínas relacionadas con el metabolismo y señalización del c-di-GMP identificados en *A. thiooxidans*, este microorganismo posee una mayor semejanza con el genoma de *A. caldus* que con el genoma de *A. ferrooxidans*.

El análisis de los genes identificados mediante el uso del algoritmo Blast (Tabla 3) indica que las proteínas con organización GGDEF-EAL y EAL poseen una gran similitud con proteínas con dominios GGDEF y/o EAL funcionales presentes en la base de datos. Los genes de las fosfodiesterasas HD poseen una mayor semejanza con proteínas con actividad fosfohidrolasa. Cinco de los ocho genes que codificarían para proteínas con dominios PilZ muestran un “e-value” muy bajo, sólo se rescata el hecho de que dos de los genes codificarían para una proteína con actividad celulosa sintasa y una

**Tabla 3.** Genes relacionados al metabolismo y señalización del c-di-GMP identificados en el genoma de *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377.

<b>Dominio (e-value)</b>	<b>Contig</b>	<b>ORF</b>	<b>Blast hit (e-value)</b>
GGDEF(2e-041)-EAL(7e-050)	58	114	Putative diguanylate cyclase/phosphodiesterase (3e-070)
GGDEF(1e-039)-EAL(4e-066)	115	15	sensory box/GGDEF/GAF/EAL domain (2e-089)
GGDEF(1e-037)-EAL(2e-052)	40	113	dyguanylate cyclase/phosphodiesterase (9e-066)
GGDEF(5e-037)-EAL(3e-044)	3	3	conserved hypothetical signaling (2e-061)
GGDEF(1e-036)-EAL (3e-045)	24	7	sensory box/GGDEF/GAF/EAL (1e-81)
GGDEF(2e-035)-EAL(2e-050)	24	3	sensory box/GGDEF/GAF/EAL (2e-72)
GGDEF(9e-017)-EAL(5e-048)	3	2	diguanylate cyclase/phosphodiesterase (7e-044)
<b>*EAL (3e-047)</b>	<b>83</b>	<b>31</b>	<b>phosphodiesterase (EAL) domain protein (1e-057)</b>
<b>*HD (1e-006)</b>	<b>137</b>	<b>27</b>	<b>Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase (1e-125)</b>
<b>*HD (0.007)</b>	<b>83</b>	<b>19</b>	<b>metal dependent phosphohydrolase (1e-148)</b>
HDOD(7e-033)-GGDEF(6e-042)	83	34	Putative diguanylate cyclase (3e-072)
EAL(2e-007)-HDOD(3e-006)	83	33	diguanylate phosphodiesterase (2e-051)
PilZ (2e-012)	86	8	type IV pilus assembly PilZ (1e-016)
PilZ (2e-006)	83	30	hypothetical protein (2e-006)
PilZ (6e-005)	84	35	hypothetical protein (0.012)
PilZ (0.001)	24	9	hypothetical protein (2e-88)
PilZ (0.006)	52	9	Cellulose synthase (1e-161)
PilZ (0.010)	13	20	hypothetical protein (0.006)
PilZ (0.060)	115	12	type IV pilus assembly PilZ (0.41)
PilZ (0.066)	46	124	Glycosyltransferase (1.4)

\*Genes seleccionados en este estudio



proteína con actividad glicosiltransferasa, las cuales formarían parte de la maquinaria de síntesis de EPS y serían regulada en forma positiva por c-di-GMP. Entre las proteínas PilZ con “e-value” significativo, dos son proteínas hipotéticas y la tercera es una proteína de ensamble del pili tipo IV que se relacionaría con posibles fenotipos de adhesión o motilidad.

Este seminario de título se centró en analizar los cambios en los niveles de transcripción de los tres genes que codificarían putativas PDEs que presentan un solo dominio relacionado al metabolismo del c-di-GMP (Tabla 3). Los genes fueron seleccionados para este estudio por el motivo de que son los únicos genes que codifican para proteínas que poseen un sólo dominio relacionado al metabolismo del c-di-GMP en la proteína, lo que teóricamente los vuelve más fáciles de analizar desde el punto de vista funcional. A lo largo de este trabajo, los genes serán designados por un código en base al dominio que poseen relacionado al metabolismo del c-di-GMP, el “contig” en que se ubican y su marco de lectura: HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31.

### **3.3. Purificación de RNA total de *A. thiooxidans*.**

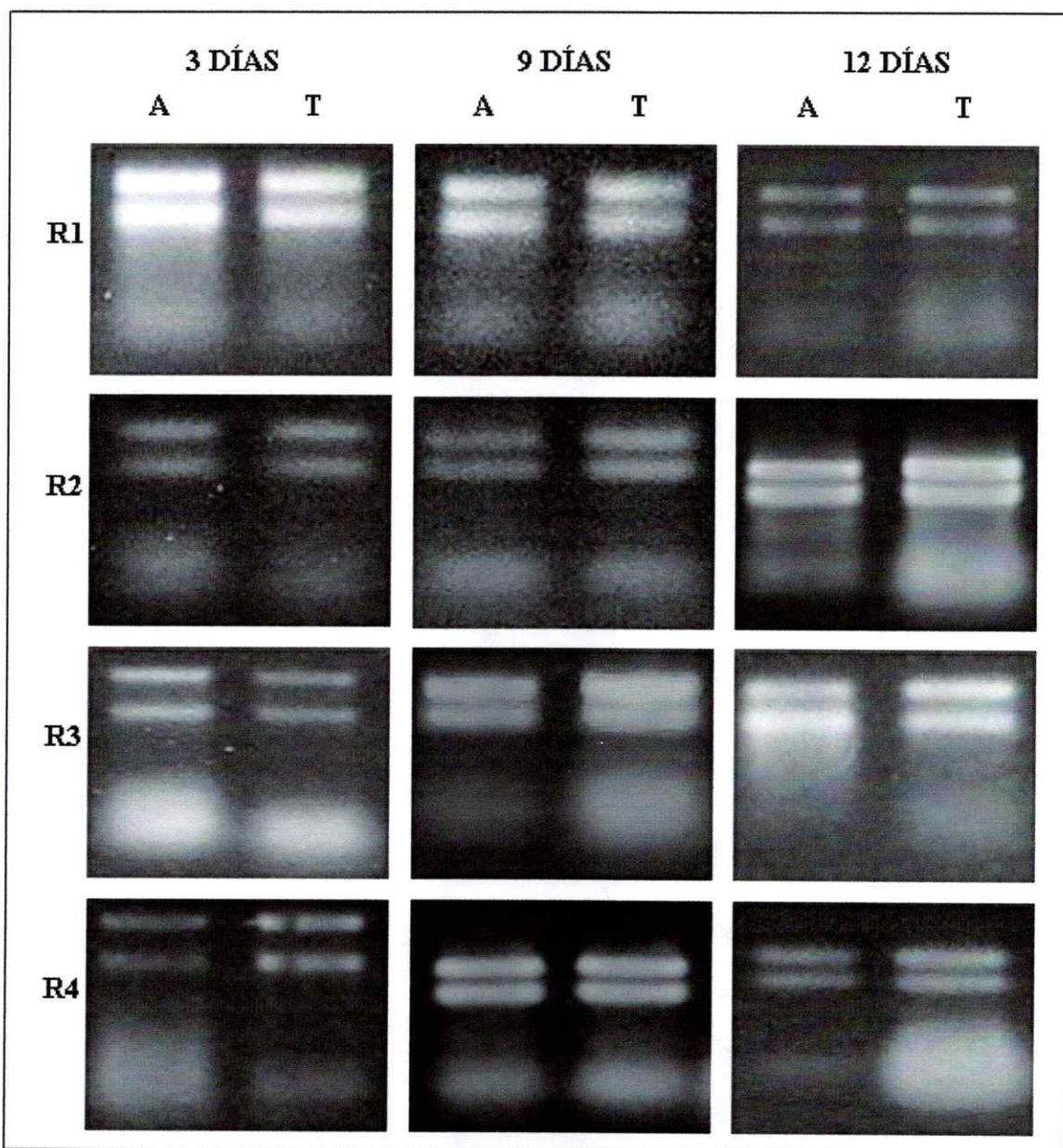
En forma muy breve, el procedimiento de extracción de RNA total se inició con una lisis celular y luego una separación de fases con el uso del reactivo comercial de extracción Trizol®. Las propiedades de la membrana de las especies del género *Acidithiobacillus* las vuelven muy resistentes a la lisis por métodos tradicionales de extracción diseñados para bacterias mesófilas, lo que involucra que muchas extracciones

permiten extraer cantidades muy bajas de ácidos ribonucleicos. La pérdida de una extracción en cualquiera de sus etapas involucra la realización de un nuevo cultivo y una espera de 12 días para la obtención de los tres puntos de la curva de crecimiento. Este problema se dio con mayor frecuencia en los cultivos con azufre elemental debido al menor número de células sedimentadas y la menor eficiencia en la lisis celular, la causa más probable es la existencia de azufre coloidal que se desprende a partir de las perlas.

Se obtuvo RNA total en las diferentes etapas de crecimiento en los dos sustratos energéticos (Figura 4). En las extracciones de células crecidas en tiosulfato en período de fase estacionaria, a los 9 y 12 días de incubación se observó la presencia de una gran cantidad del RNA 5S. Este fenómeno no se observó en las extracciones de cultivos crecidos en azufre en este período de tiempo, pero sí a los 3 días de cultivo (Figura 4). En las extracciones a partir de tiosulfato se obtuvo una mayor cantidad de RNA total, debido a que se conseguía colectar un mayor número de células.

### **3.4. RT-PCR**

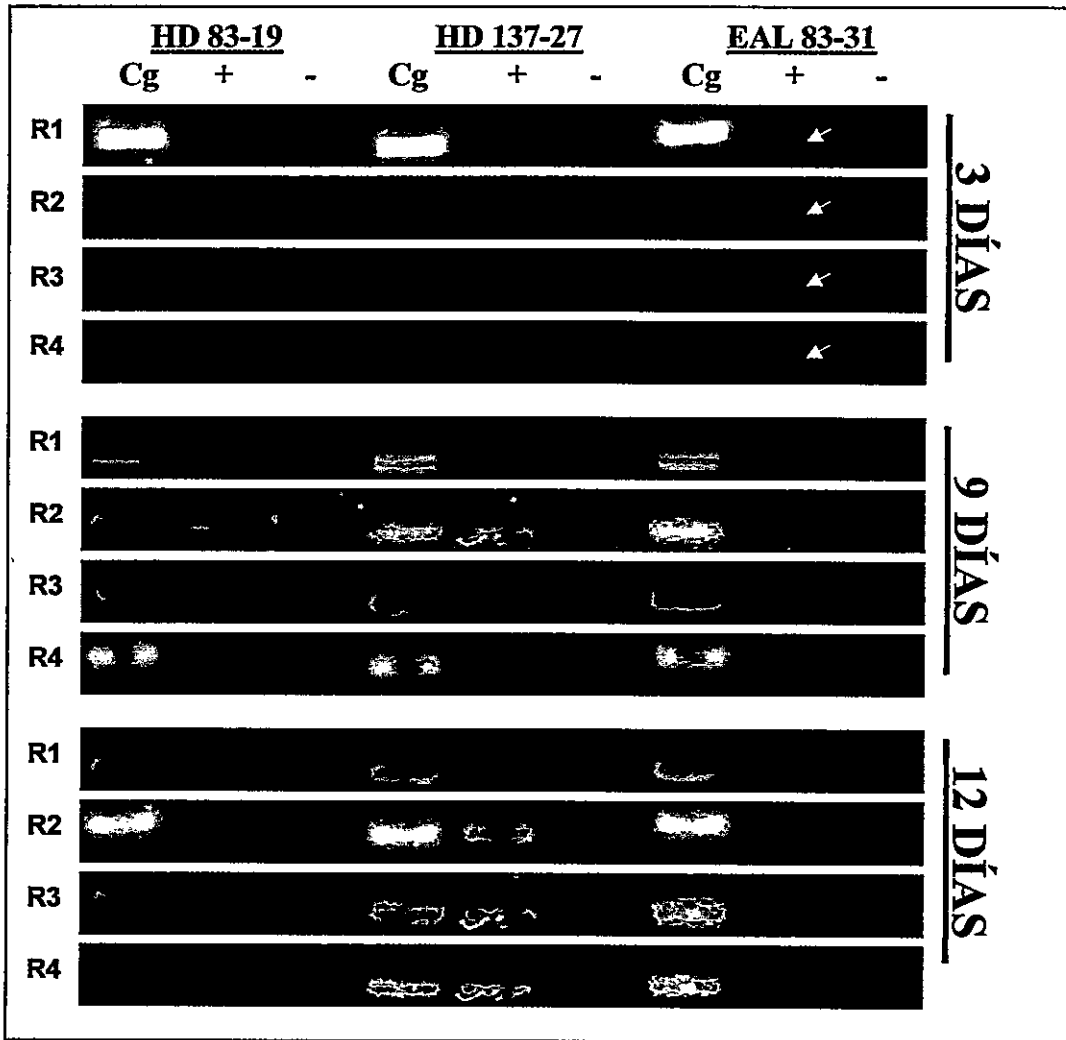
Los partidores utilizados en los experimentos de PCR fueron diseñados a partir de secuencias del genoma de la cepa ATCC 19377 y probados en contra del DNA de la cepa DSM 9463 para determinar la existencia de los fragmentos esperados, obteniéndose resultados positivos en la determinación de la posible existencia de los 3 genes que



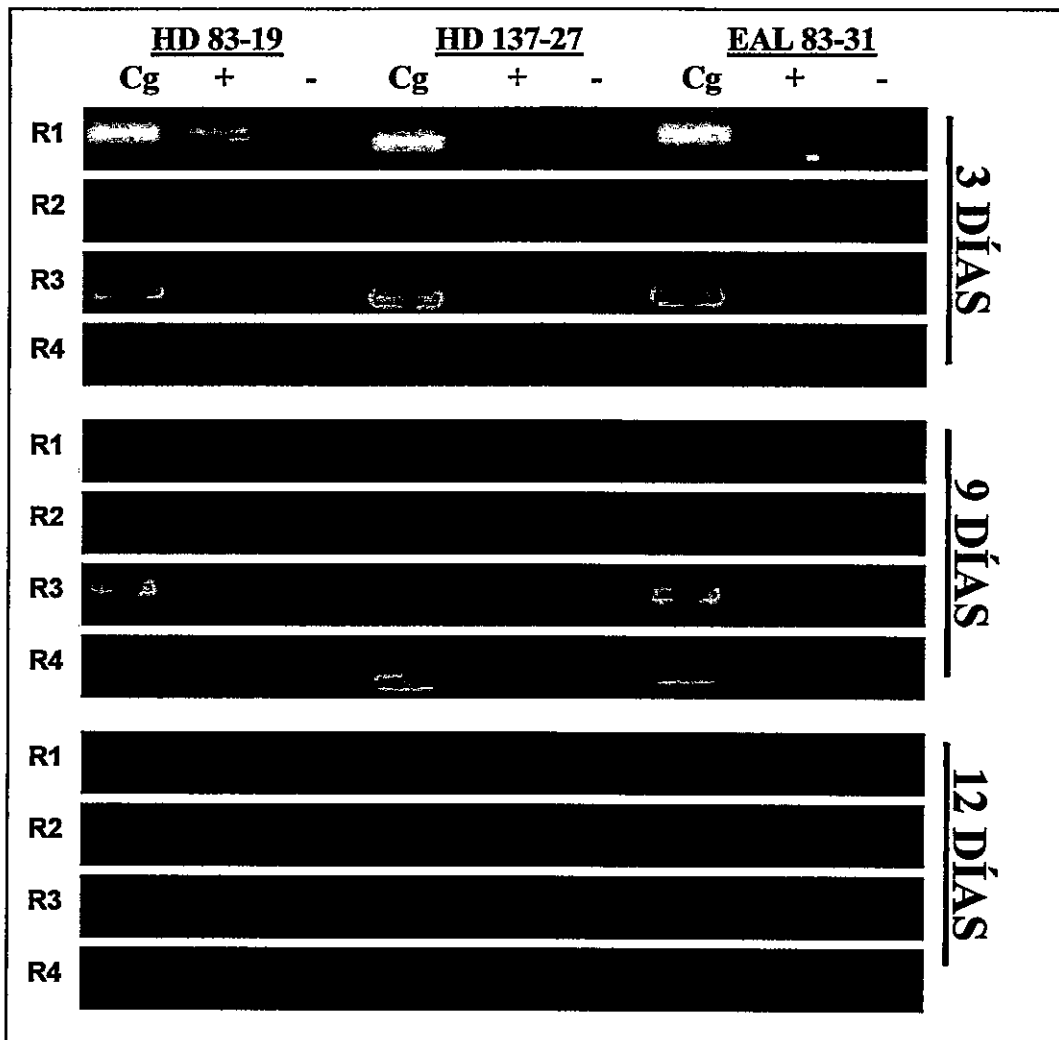
**Figura 4.** RNA total extraído a partir de células planctónicas cosechadas de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463 crecidas en azufre (A) o tiosulfato (T) y utilizados en los experimentos de RT-PCR y qPCR. Se muestran RNA extraídos de cuatro réplicas biológicas (R1-R4) en distintos momentos de la curva de crecimiento y tratados con DNasa. Banda superior: rRNA 23S; Banda media: rRNA 16S; Banda inferior: rRNA 5S.

codificarían proteínas con dominios PDE únicos (Tabla 3). Posteriormente se realizaron experimentos de RT-PCR para analizar cualitativamente la expresión de estos tres genes en función del tiempo de crecimiento y del sustrato energético. El proceso de síntesis de cDNA es una etapa crítica en la realización de los experimentos, debido a que existe posibilidad de degradación del RNA, baja síntesis de cDNA o presencia de fragmentos de DNA genómico que den un falso positivo. También es necesario considerar problemas en la reacción de PCR que den como resultado un falso negativo.

Los resultados muestran que en células crecidas en azufre (Figura 5) se observó la expresión de los genes HD 83-19 y HD 137-27 a los 9 días. A los 12 días se observó una disminución de la expresión del gen HD 83-19, mientras que la expresión del gen HD 137-27 se mantuvo constante. En el caso del gen EAL 83-31, codificante para la posible fosfodiesterasa con dominio EAL, se observó expresión sólo a los tres días de crecimiento (Figura 5). En células crecidas en tiosulfato se pudo observar expresión de los tres genes seleccionados solamente a los tres días de crecimiento (Figura 6). Por lo tanto, mediante esta primera aproximación los resultados indican que existe una expresión diferencial de los 3 genes seleccionados, la cual es dependiente del tiempo de crecimiento y del sustrato energético.



**Figura 5.** RT-PCR de los tres genes codificantes para PDEs a partir de células crecidas en azufre. Para determinar la expresión cualitativa de los genes se realizó RT-PCR a cada cDNA obtenido a partir del RNA extraído a diferentes días de crecimiento en azufre. Cg: control PCR con DNA genómico, +: PCR con cDNA sintetizado con transcriptasa reversa, -: control PCR sin transcriptasa reversa. R1, R2, R3, R4 representan la réplica biológica.



**Figura 6.** RT-PCR de los tres genes codificantes para PDEs a partir de células crecidas en tiosulfato. Para determinar la expresión cualitativa de los genes se realizó RT-PCR a cada cDNA obtenido a partir del RNA extraído a diferentes días de crecimiento en tiosulfato. Cg: control PCR con DNA genómico, +: PCR con cDNA sintetizado con transcriptasa reversa, -: control PCR sin transcriptasa reversa. R1, R2, R3, R4 representan la réplica biológica.

### 3.5. PCR en Tiempo Real

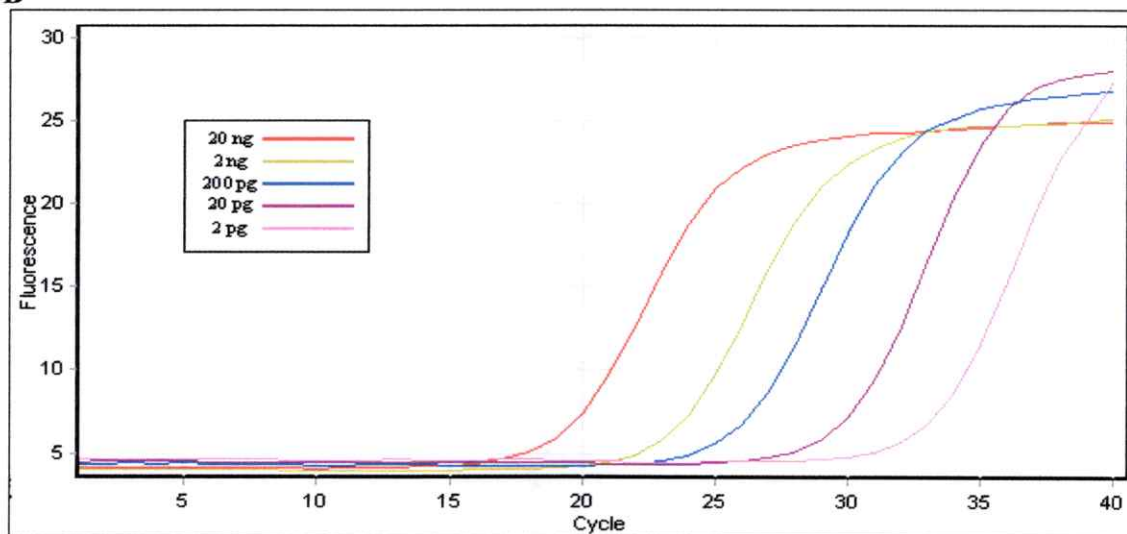
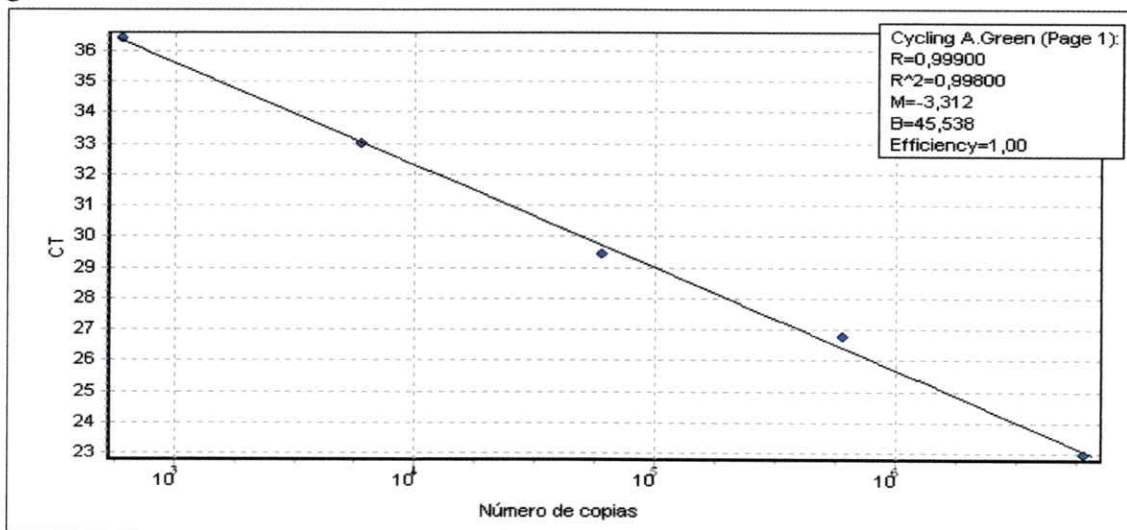
Para determinar en forma cuantitativa los cambios en los niveles de transcripción de los genes analizados a lo largo de la curva de crecimiento en diferentes sustratos energéticos, se procedió a determinar el número de copias de mRNA presentes mediante PCR en Tiempo Real (qPCR).

El primer paso para el desarrollo de los experimentos de qRT-PCR fue la construcción de una curva de calibración para cada uno de estos genes utilizando una masa conocida de DNA genómico de *A. thiooxidans* y considerando que el peso molecular del genoma es aproximadamente  $2,00 \times 10^9$  g/mol. Dado que los genes HD 137-27 (Figura 7), HD 83-19 (Figura 8) y EAL 83-31 (Figura 9) se encuentran en una sola copia en el genoma, el número de copias medidas del gen es idéntico al número de genomas presentes en la reacción.

La interpolación de la curva de calibración obtenida a partir de los diferentes Ct, ciclo en el cual la amplificación del DNA entra a la fase exponencial, permite determinar el número de copias de los transcritos en las muestras de RNA extraído. Para comparar se realizó una normalización en base a un gen no relacionado con la vía del c-di-GMP. En este caso se utilizó el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S. La curva de calibración se hizo considerando que existen dos copias por genoma (Figura 10).

**A**

Masa DNA	Nº Copias obtenido /reacción	Nº Copias teórico /reacción
20 ng	$6,59 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^6$
2 ng	$4,69 \cdot 10^5$	$6,02 \cdot 10^5$
200 pg	$7,24 \cdot 10^4$	$6,02 \cdot 10^4$
20 pg	$6,14 \cdot 10^3$	$6,02 \cdot 10^3$
2 pg	$5,76 \cdot 10^2$	$6,02 \cdot 10^2$

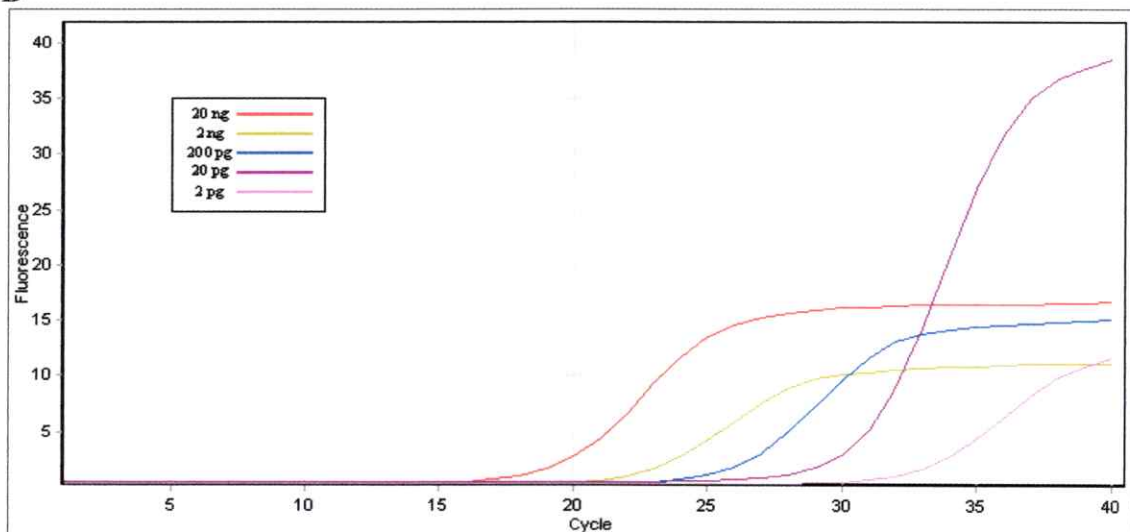
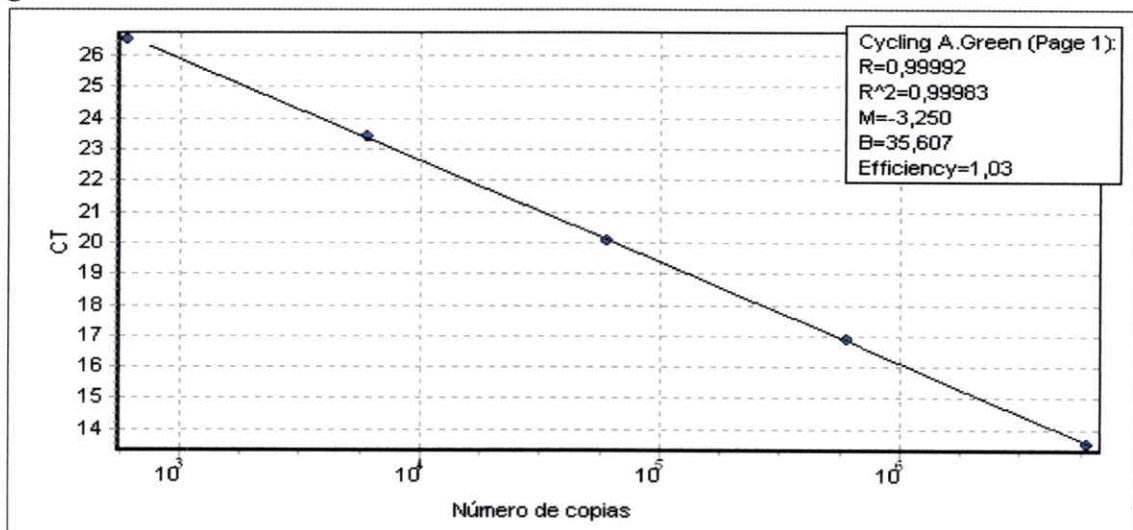
**B****C**

**Figura 7.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen HD 137-27. **A.** Determinación del número de copias para cada masa de DNA genómico utilizada, considerando que existe una copia del gen en el genoma de *A. thiooxidans*. **B.** Curvas de amplificación obtenidas para las muestras de DNA genómico. **C.** Regresión lineal para el gráfico entre el Ct v/s la concentración de DNA genómico en escala logarítmica.



**A**

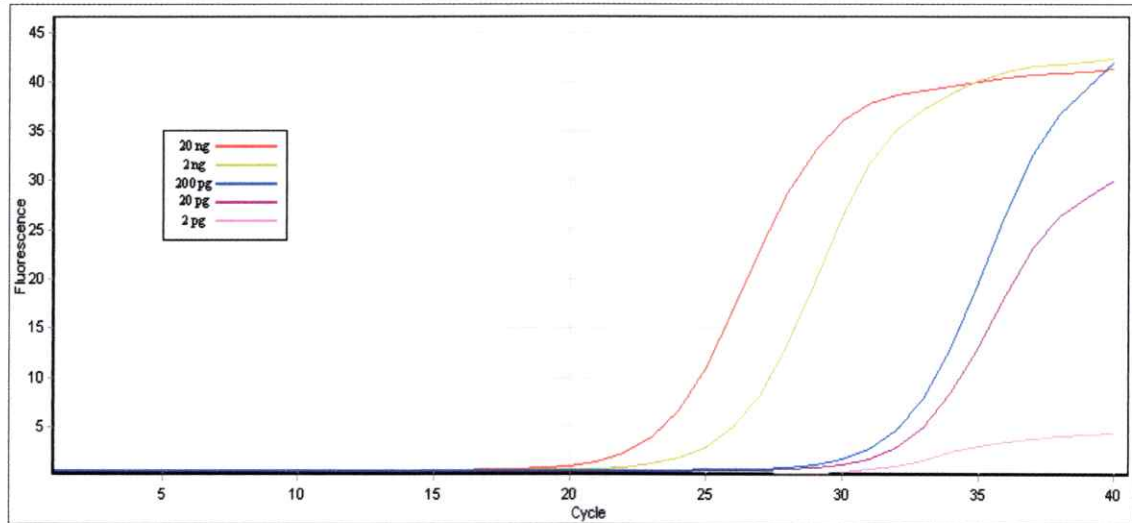
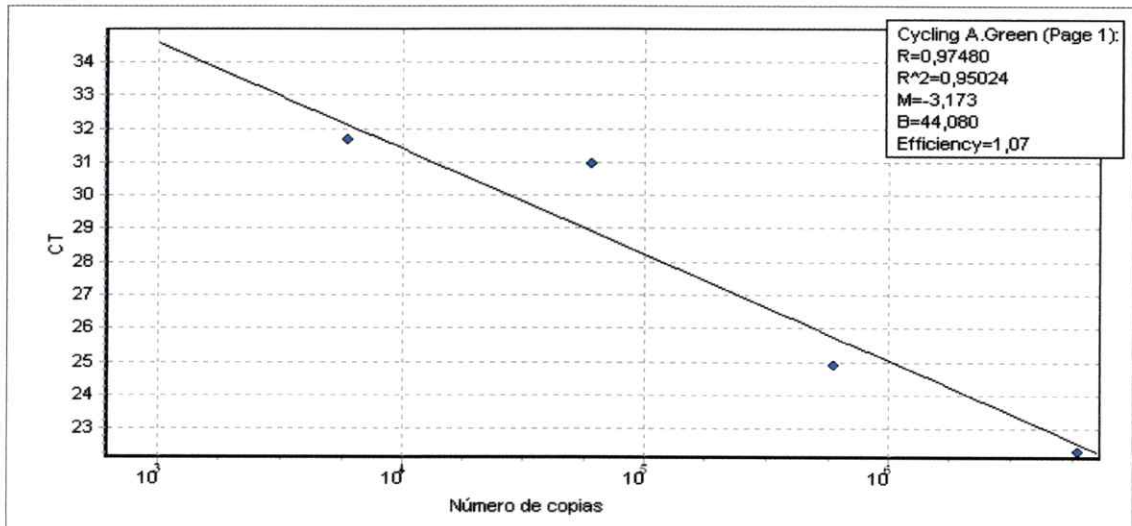
Masa DNA	Nº Copias obtenido /reacción	Nº Copias teórico /reacción
20 ng	$6,23 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^6$
2 ng	$5,74 \cdot 10^5$	$6,02 \cdot 10^5$
200 pg	$6,21 \cdot 10^4$	$6,02 \cdot 10^4$
20 pg	$5,70 \cdot 10^3$	$6,02 \cdot 10^3$
2 pg	$6,25 \cdot 10^2$	$6,02 \cdot 10^2$

**B****C**

**Figura 8.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen HD 83-19. **A.** Determinación del número de copias para cada masa de DNA genómico utilizada, considerando que existe una copia del gen en el genoma de *A. thiooxidans*. **B.** Curvas de amplificación obtenidas para las muestras de DNA genómico. **C.** Regresión lineal para el gráfico entre el Ct v/s la concentración de DNA genómico en escala logarítmica.

**A**

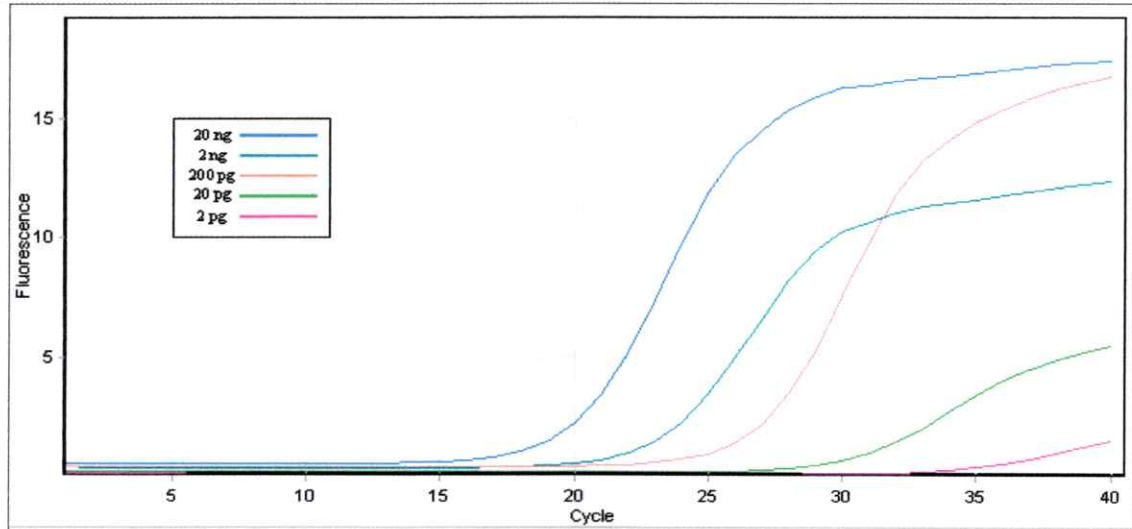
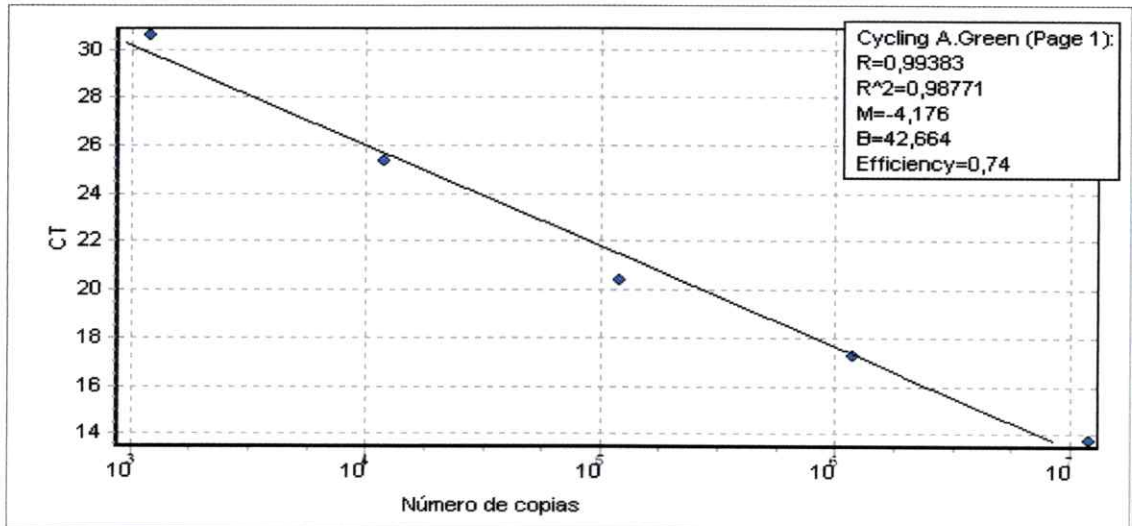
Masa DNA	N° Copias obtenido /reacción	N° Copias teórico /reacción
20 ng	$7,28 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^6$
2 ng	$1,11 \cdot 10^6$	$6,02 \cdot 10^5$
200 pg	$1,39 \cdot 10^4$	$6,02 \cdot 10^4$
20 pg	$8,35 \cdot 10^3$	$6,02 \cdot 10^3$
2 pg	$8,40 \cdot 10^2$	$6,02 \cdot 10^2$

**B****C**

**Figura 9.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen EAL 83-31. **A.** Determinación del número de copias para cada masa de DNA genómico utilizada, considerando que existe una copia del gen en el genoma de *A. thiooxidans*. **B.** Curvas de amplificación obtenidas para las muestras de DNA genómico. **C.** Regresión lineal para el gráfico entre el Ct v/s la concentración de DNA genómico en escala logarítmica.

**A**

Masa DNA	N° Copias obtenido /reacción	N° Copias teórico /reacción
20 ng	$8,56 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^7$
2 ng	$1,21 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$
200 pg	$2,14 \cdot 10^5$	$1,20 \cdot 10^5$
20 pg	$1,43 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^4$
2 pg	$7,86 \cdot 10^2$	$1,20 \cdot 10^3$

**B****C**

**Figura 10.** Construcción de la curva de calibración para los experimentos de PCR en tiempo real del gen 16S. **A.** Determinación del número de copias para cada masa de DNA genómico utilizada, considerando que existen dos copias del gen en el genoma de *A. thiooxidans*. **B.** Curvas de amplificación obtenidas para las muestras de DNA genómico. **C.** Regresión lineal para el gráfico entre el Ct v/s la concentración de DNA genómico en escala logarítmica.

El uso de las curvas de calibración permitió la determinación del número de copias relativo que poseen cada uno de los genes estudiados durante la curva de crecimiento en cultivos con azufre elemental (Tabla 4) o tiosulfato (Tabla 5). El número promedio obtenido de copias de transcrito para cada gen es relativamente bajo en todas las circunstancias analizadas comparado con el número de copias de transcrito del gen ribosomal 16S. Como gen normalizador, el gen DNA 16S no presentó cambios en su expresión en ninguna de las condiciones analizadas.

La cuantificación de la expresión de los genes y el posterior análisis muestra que los patrones de transcripción presentan un comportamiento similar al observado mediante RT-PCR en las condiciones estudiadas para tiosulfato (Figura 6). Los genes HD 137-27 y EAL 83-31 en células crecidas en azufre presentaron algunas diferencias entre los resultados de qPCR y RT-PCR, lo cual puede deberse a la sensibilidad de las técnicas. El gen HD 137-27 presentó diferencias entre los 9 y 12 días de incubación, en donde la técnica de qPCR detectó un aumento en la expresión a los 12 días de incubación, mientras que por la metodología de RT-PCR mostró un nivel constante de expresión.

Los resultados normalizados de PCR en tiempo real a partir del RNA extraído de células crecidas en azufre (Figura 11A-C) muestran que el gen HD 83-19 presentó un

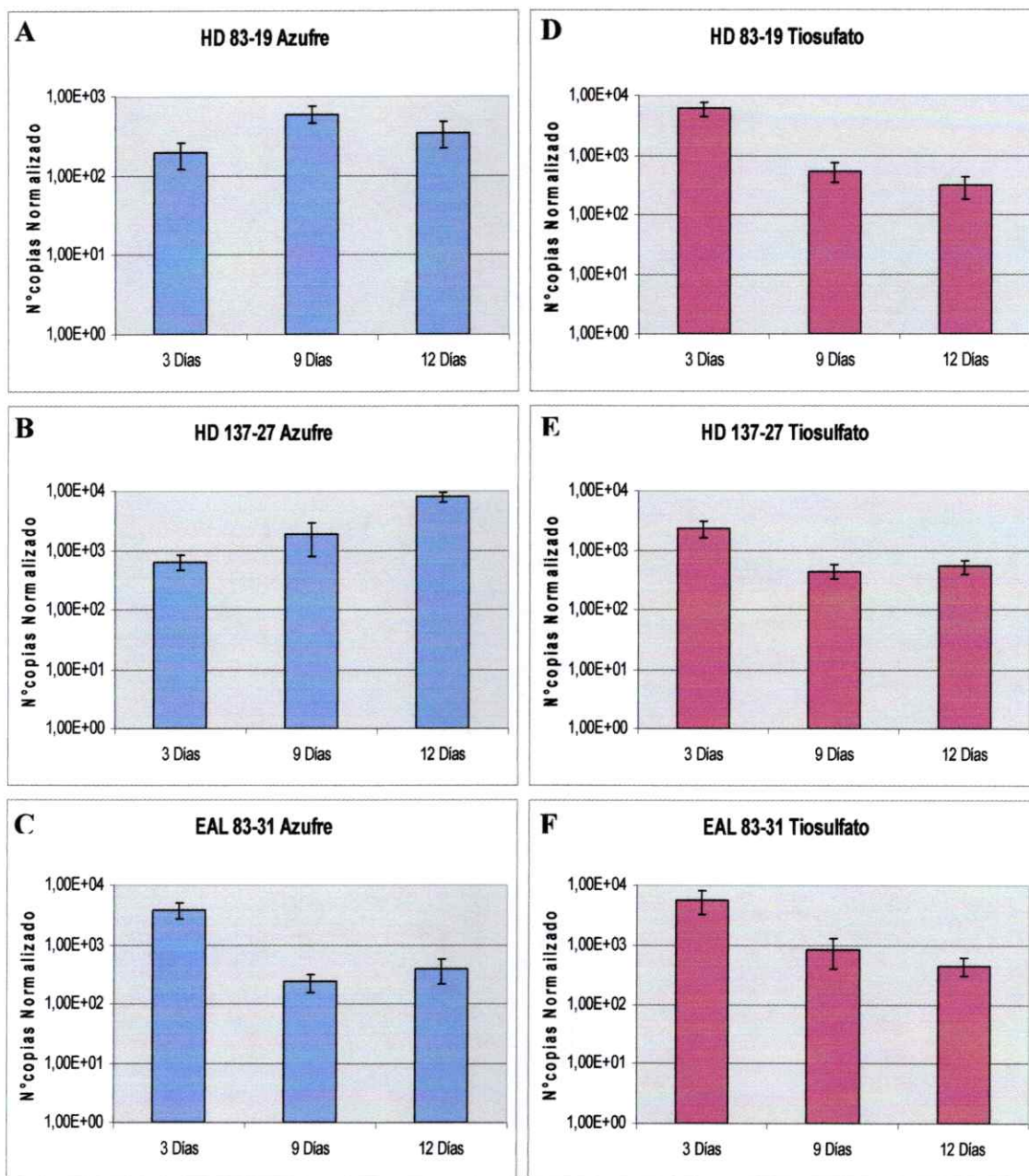
**Tabla 4.** Número promedio relativo (4 réplicas biológicas) de copias de cada transcrito en células cultivadas en azufre a partir de los valores de Ct determinados (ver Anexo 1).

Gen	3 Días	9 Días	12 Días
	Nº copias	Nº copias	Nº copias
HD 83-19	$1,68 \times 10^3 \pm 0,62 \times 10^3$	$4,79 \times 10^3 \pm 1,16 \times 10^3$	$2,56 \times 10^3 \pm 0,94 \times 10^3$
HD 137-27	$5,54 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$	$1,47 \times 10^4 \pm 0,84 \times 10^4$	$5,81 \times 10^4 \pm 1,08 \times 10^4$
EAL 83-31	$3,35 \times 10^4 \pm 1,02 \times 10^4$	$1,85 \times 10^3 \pm 0,62 \times 10^3$	$2,85 \times 10^3 \pm 1,28 \times 10^3$
rRNA 16S	$8,69 \times 10^8 \pm 1,05 \times 10^8$	$7,99 \times 10^8 \pm 1,85 \times 10^8$	$7,40 \times 10^8 \pm 1,36 \times 10^8$

**Tabla 5.** Número promedio relativo (4 réplicas biológicas) de copias de cada transcrito en células cultivadas en tiosulfato a partir de los valores de Ct determinados (ver Anexo 1).

Gen	3 Días	9 Días	12 Días
	Nº copias	Nº copias	Nº copias
HD 83-19	$4,74 \times 10^4 \pm 1,24 \times 10^4$	$3,42 \times 10^3 \pm 1,28 \times 10^3$	$2,40 \times 10^3 \pm 0,96 \times 10^3$
HD 137-27	$1,79 \times 10^4 \pm 0,56 \times 10^4$	$2,73 \times 10^3 \pm 0,72 \times 10^3$	$4,16 \times 10^3 \pm 1,09 \times 10^3$
EAL 83-31	$4,36 \times 10^4 \pm 1,88 \times 10^4$	$5,24 \times 10^3 \pm 2,84 \times 10^3$	$3,53 \times 10^3 \pm 1,21 \times 10^3$
rRNA 16S	$7,76 \times 10^8 \pm 1,60 \times 10^8$	$6,22 \times 10^8 \pm 1,27 \times 10^8$	$7,85 \times 10^8 \pm 1,22 \times 10^8$





**Figura 11.** Resultados normalizados del análisis de los cambios en la expresión de los tres genes codificando para PDEs determinados por PCR en Tiempo Real. **A-C**, células crecidas en azufre. **D-F**, células crecidas en tiosulfato. Las columnas muestran los promedios de las cuatro réplicas biológicas.

aumento de la expresión a los nueve días, la cual disminuyó a los doce días, aunque el nivel de expresión a los doce días es mayor que a los tres de incubación (Figura 11A). El gen HD 137-27 presentó un aumento en su expresión a lo largo de la curva de crecimiento, siendo la expresión mucho mayor a los doce días (Figura 11B). El gen EAL 83-31 presentó una disminución en los niveles de expresión transcripcional considerable a los nueve días, cuyo nivel aumentó a los doce días (Figura 11C).

En células crecidas en tiosulfato (Figura 11D-F) se observó una disminución en los niveles de expresión durante el crecimiento para todos los genes, pero a diferentes grados. El gen HD 83-19 presentó una disminución de un orden de magnitud en su nivel de transcripción a los nueve días, que se acentuó a los doce días de incubación (Figura 11D). El gen HD 137-27 presentó una disminución de un factor de 5 en sus niveles de expresión a los nueve días con respecto a los otros genes, manteniéndose este nuevo nivel de expresión a los doce días (Figura 11E). El gen EAL 83-31 presentó una disminución menos marcada en los niveles de expresión que el gen HD 83-19, pero mantiene la misma tendencia de disminuir su expresión a los nueve y a los doce días de incubación (Figura 11F).

Un análisis inicial del número de copias de cada transcrito indica cambios en la expresión durante el crecimiento en ambos sustratos energéticos (Tablas 6-7). Para percibir mejor los cambios en la expresión transcripcional durante el crecimiento, se procedió a determinar en forma cuantitativa las razones entre el número normalizado de

**Tabla 6.** Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para cada gen durante el crecimiento en medio con azufre.

Gen	Razón N° copias		
	3 días/3 días	9 días/3 días	12 días/3 días
HD 83-19	1,00 ± 0,37	3,10 ± 0,75	1,79 ± 0,66
HD 137-27	1,00 ± 0,27	2,89 ± 1,65	12,32 ± 2,28
EAL 83-31	1,00 ± 0,30	0,06 ± 0,02	0,10 ± 0,08

**Tabla 7.** Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para cada gen durante el crecimiento en medio con tiosulfato.

Gen	Razón N° copias		
	3 días/3 días	9 días/3 días	12 días/3 días
HD 83-19	1,00 ± 0,26	0,09 ± 0,06	0,05 ± 0,02
HD 137-27	1,00 ± 0,31	0,19 ± 0,05	0,23 ± 0,06
EAL 83-31	1,00 ± 0,43	0,15 ± 0,11	0,08 ± 0,05



copias de transcrito para cada gen, tomando en cuenta la expresión de cada gen a los tres días como línea basal de expresión.

En los cultivos en azufre elemental (Tabla 6) se apreció un aumento en la expresión transcripcional de los genes HD 83-19 y HD 137-27. La expresión del gen HD 83-19 presentó un aumento de 3 veces a los nueve días, mientras que a los doce días sólo presentaba aproximadamente 2 veces el nivel basal, mientras que la expresión del gen HD 137-27 presentó un aumento de aproximadamente 3 veces el nivel basal a los nueve días y de unas 12 veces el nivel basal a los doce días. Por otro lado, la expresión de la PDE EAL 83-31 presentó una disminución de alrededor de 17 veces a los nueve días y de alrededor de 10 veces a los doce días.

En cultivos en tiosulfato (Tabla 7) se apreció una disminución considerable en los niveles de transcrito de todas las fosfodiesterasas analizadas. La expresión del gen HD 83-19 presentó una disminución de aproximadamente 10 veces en el número de transcritos a los nueve días y de 20 veces a los 12 días con respecto al nivel basal. La expresión del gen HD 137-27 presentó una disminución de aproximadamente 5 veces en el número de transcritos a los nueve días de incubación, nivel que permaneció a los doce días de incubación. La expresión del gen EAL 83-31 presentó una disminución de aproximadamente 7 veces en el número de transcritos a los nueve días y de 12 veces a los doce días respecto del nivel basal.

El número de copias obtenido para cada transcrito indica la existencia de expresión transcripcional diferencial de estos genes dependiendo si el sustrato energético es azufre elemental o tiosulfato. Para apreciar estas diferencias ligadas al sustrato energético se procedió a obtener la razón entre el número normalizado de copias de los transcritos presentes en bacterias crecidas en tiosulfato con respecto al número normalizado de copias de transcritos presentes en células crecidas en azufre (Razón  $\text{Tiosulfato/Azufre}$ ) (Tablas 8-10). Se compararon los niveles de transcrito por sustrato entre el mismo número de días de crecimiento.

La expresión del gen HD 83-19 en células crecidas en tiosulfato durante 3 días es 30 veces mayor que la expresión del mismo gen en células crecidas en azufre durante 3 días. Los niveles de expresión entre ambos sustratos energéticos a los 9 y 12 días son iguales, debido a que baja el nivel de transcripción en tiosulfato (Tabla 8).

La expresión del gen HD 137-27 en células crecidas en tiosulfato a los 3 días es 11,24 veces mayor que la expresión en células crecidas en azufre durante el mismo período de tiempo. A medida que avanza el crecimiento, aumenta la expresión en azufre, mientras que disminuye la expresión en tiosulfato. Así, la expresión en células crecidas en azufre a los 9 días es 4 veces mayor ( $1/\text{Razón}$ ) que la expresión en células crecidas en tiosulfato, mientras que a los 12 días la expresión en azufre es 14 veces mayor que la expresión en tiosulfato (Tabla 9).

**Tabla 8.** Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa HD 83-19. La normalización se realizó mediante el uso de los transcritos 16S.

	<b>Azufre</b>	<b>Tiosulfato</b>	<b>Razón T/A</b>
3 DÍAS	$(1,68 \pm 0,62) \times 10^3$	$(4,74 \pm 1,24) \times 10^4$	$31,6 \pm 3,35$
9 DÍAS	$(4,79 \pm 1,16) \times 10^3$	$(3,42 \pm 1,28) \times 10^3$	$0,92 \pm 0,12$
12 DÍAS	$(2,56 \pm 0,94) \times 10^3$	$(2,40 \pm 0,96) \times 10^3$	$0,88 \pm 0,03$

**Tabla 9.** Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa HD 137-27. La normalización se realizó mediante el uso de los transcritos 16S.

	<b>Azufre</b>	<b>Tiosulfato</b>	<b>Razón T/A</b>
3 DÍAS	$(5,54 \pm 1,50) \times 10^3$	$(1,79 \pm 0,56) \times 10^4$	$11,24 \pm 0,15$
9 DÍAS	$(1,47 \pm 0,84) \times 10^4$	$(2,73 \pm 0,72) \times 10^3$	$0,24 \pm 0,07$
12 DÍAS	$(5,81 \pm 1,08) \times 10^4$	$(4,16 \pm 1,09) \times 10^3$	$0,07 \pm 0,01$

**Tabla 10.** Razón normalizada de expresión entre tiosulfato y azufre para el gen de la fosfodiesterasa EAL 83-31. La normalización se realizó mediante el uso de los transcritos 16S.

	<b>Azufre</b>	<b>Tiosulfato</b>	<b>Razón T/A</b>
3 DÍAS	$(3,35 \pm 1,02) \times 10^4$	$(4,36 \pm 1,88) \times 10^4$	$1,46 \pm 0,19$
9 DÍAS	$(1,85 \pm 0,62) \times 10^3$	$(5,24 \pm 2,84) \times 10^3$	$3,64 \pm 0,78$
12 DÍAS	$(2,85 \pm 1,28) \times 10^3$	$(3,53 \pm 1,21) \times 10^3$	$1,17 \pm 0,12$

La expresión del gen EAL 83-31 disminuye a lo largo de la curva de crecimiento en ambos sustratos energéticos. La expresión en tiosulfato a los 3 días de incubación es aproximadamente 2 veces mayor que la expresión en células crecidas en azufre por 3 días. A los 9 días de incubación la expresión en medio con tiosulfato es 4 veces mayor que la expresión en azufre elemental. La expresión en células crecidas en tiosulfato a los 12 días es 1,2 veces mayor que la expresión en azufre a los 12 días (Tabla 10).

Los resultados obtenidos mediante la técnica de qPCR, en conjunto con los resultados de los análisis bioinformáticos y los experimentos de RT-PCR, sugieren que *A. thiooxidans* posee una vía del c-di-GMP funcional. El análisis bioinformático identificó ORFs que codificarían proteínas con actividad DGC, proteínas con actividad PDE y proteínas receptoras de c-di-GMP con dominio PilZ. Los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 fueron seleccionados para el desarrollo de este trabajo debido a que son más fáciles de estudiar desde un punto de vista funcional. Los 3 genes presentaron una expresión transcripcional dependiente del sustrato energético, así como del tiempo de crecimiento. La expresión inicial en tiosulfato fue mayor que en azufre.

Para comprobar en forma definitiva la existencia de una vía del c-di-GMP funcional en *A. thiooxidans* es necesario complementar los resultados obtenidos con experimentos de medición de c-di-GMP a partir de extractos nucleotídicos de células crecidas en azufre o tiosulfato, medición de actividad PDE desde extractos celulares crudos de células crecidas en azufre o tiosulfato y clonar los genes que codifican putativas DGC y PDE, determinando si su función se expresa en un sistema heterólogo.

## 4. DISCUSIÓN

Las bacterias participantes en el consorcio biominero son capaces de adherirse a sustrato mineral (Sand y col., 2001) mediante el desarrollo de matrices exopoliméricas que favorecen la obtención de energía metabólica a partir de la oxidación del mineral (Lui y col., 2003; Kinsler y col., 2003; Harneit y col., 2006; Cotter y Stibitz, 2007). En diversas bacterias Gram-negativas los procesos de adhesión a superficies, síntesis de EPS y formación de biopelículas se encuentran regulados por las vías del “Quorum Sensing” (Huber y col., 2001; Labbate y col., 2004; Farah y col., 2005; Ruiz y col., 2008) y la vía del segundo mensajero c-di-GMP (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004). Los genes que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo o señalización del c-di-GMP han sido identificados en dos bacterias del consorcio biominero, *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009) y *A. caldus* (Castro y col., 2009). En este trabajo nos propusimos estudiar la existencia de una posible vía del c-di-GMP en la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*, un microorganismo también muy relevante en el proceso de biolixiviación en el cual no existen estudios sobre esta vía metabólica.

El análisis bioinformático del genoma parcialmente secuenciado de la cepa tipo ATCC 19377 reveló la existencia de 12 ORFs que codifican proteínas relacionadas al metabolismo y 8 ORFs que codifican proteínas relacionadas con la vía de señalización del c-di-GMP (Tabla 3, página 32). En 7 de los 12 ORFs relacionados al metabolismo

del c-di-GMP, se encontraron los dominios GGDEF y EAL, 1 tenía los dominios HDOD y GGDEF, y 1 poseía los dominios HDOD y EAL. El hecho de que posean más de un dominio dificulta el análisis funcional desde un punto de vista metabólico. Los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31, que codifican para tres posibles PDEs, fueron seleccionados para este estudio por el motivo principal de que son los únicos genes que codifican para proteínas que poseen un sólo dominio relacionado al metabolismo del c-di-GMP en la proteína, lo que teóricamente los vuelve más fáciles de analizar.

Para comprobar la existencia de la vía del c-di-GMP en *A. thiooxidans*, es necesario demostrar que los genes identificados se transcriban. Por eso se analizaron los niveles transcripción de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 mediante experimentos de RT-PCR y qPCR. Antes de la realización de estos experimentos fue necesario superar dos pasos críticos: a) la obtención de una metodología para realizar cultivos de rápido crecimiento en azufre o tiosulfato y b) la extracción eficiente de RNA a partir de células cosechadas desde cultivos crecidos en azufre o tiosulfato.

Después de la obtención de una metodología para el cultivo activo de la cepa DSM 9463, el crecimiento de las bacterias en ambos medios mostró un aumento exponencial a partir de los 2 días de incubación. Se utilizó la cepa DSM 9463 por la razón de que no fue posible hacer crecer la cepa tipo ATCC 19377. El crecimiento celular planctónico fue más pronunciado en el medio tiosulfato (Figura 3, página 30) que en el medio con azufre (Figura 2, página 30). El azufre es un sustrato oxidable sólido en el que las bacterias deben adherirse para iniciar el proceso metabólico activo de obtención de

energía y posterior crecimiento (Harnett y col., 2006). El hecho de que las bacterias necesitan adherirse al azufre elemental antes de iniciar el crecimiento celular resultó en un mayor esfuerzo en la obtención de una metodología de crecimiento “rápido”.

Se realizó la extracción del RNA total para determinar la expresión transcripcional de los 3 genes estudiados en este seminario de título. Todas las extracciones de RNA se hicieron a partir de células planctónicas. La extracción de RNA en las diferentes condiciones seleccionadas se realizó mediante la metodología modificada de extracción mediante Trizol®. En ésta se realiza una lisis previa al uso del reactivo Trizol®, permitiendo la extracción eficiente de ácidos nucleicos tanto en azufre como en tiosulfato. Este protocolo modificado es necesario debido a las propiedades de la membrana de estos microorganismos acidófilos, que originan en una lisis poco eficiente por métodos tradicionales. Las extracciones de ácidos ribonucleicos totales fueron mayores en cultivos con tiosulfato como fuente energética, aunque en las extracciones realizadas en etapas tardías se observó una gran concentración de fragmentos a la altura del RNA 5S (Figura 4, página 35). El hecho de que sólo aparece en estas condiciones, indicaría que existe un componente fisiológico que afectaría la proporción de este RNA.

Los experimentos de RT-PCR mostraron que la expresión a lo largo de la curva de crecimiento de los 3 genes presenta cambios que son dependientes del sustrato energético. En las muestras derivadas de tiosulfato, se observó una disminución de la expresión de todos los genes en las etapas más tardías de 9 y 12 días de crecimiento (Figura 6, página 38). Esta disminución podría estar acompañada con un aumento de los

niveles intracelulares de c-di-GMP, lo que sería concordante con lo reportado en la literatura de que el nivel de c-di-GMP aumenta en la fase estacionaria (Kumar y Chatterji, 2008). En el caso de los RNA extraídos desde cultivos con azufre, se observó un aumento en la expresión de los genes HD 83-19 y HD 137-27, mientras que la expresión del gen EAL 83-31 disminuyó a lo largo del crecimiento (Figura 5, página 37). El aumento de la expresión de los genes HD 83-19 y HD 137-27 podría deberse a que las bacterias se encuentran en una etapa de biopelícula madura, en la que se movilizan para colonizar nuevos sustratos. Debido a que existen múltiples señales internas y externas en una biopelícula madura, existe mucha diversidad fenotípica que permite el desarrollo de bacterias móviles con un bajo nivel de c-di-GMP intracelular (Klausen y col., 2003; Jonas y col., 2009).

Al comparar mediante qPCR los niveles de expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 en células de *A. thiooxidans* crecidas en un sustrato energético sólido con aquellas células de *A. thiooxidans* crecidas en un sustrato energético soluble se evidencia que existen diferencias (Tablas 8-10, página 51). El número de copias de transcrito de los tres genes en células crecidas en tiosulfato es inicialmente alrededor de un orden de magnitud mayor con respecto a la expresión en células crecidas en azufre. Esto podría deberse a la existencia de un sustrato sólido al cual las células deben adherirse. El nivel menor de expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31, que codificarían proteínas con actividad PDE, en células crecidas en azufre debería estar acompañado por un nivel más alto de c-di-GMP intracelular. Un nivel de c-di-GMP intracelular más alto en células crecidas en sustratos oxidables sólidos, sugeriría



que el c-di-GMP juega un papel en la formación de biopelículas en *A. thiooxidans*, al igual que lo descrito en la literatura para otras bacterias (Huber y col., 2001; Thormann y col., 2006; Nakhamchick y col., 2008).

Al comparar la expresión de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 a lo largo del crecimiento, ya sea en un sustrato sólido o soluble, se observaron diferencias significativas en el número de transcritos. En células crecidas en tiosulfato (Tabla 7; página 48), el número normalizado de transcritos de los tres genes estudiados disminuyó a medida que el cultivo pasaba a la fase estacionaria de crecimiento. Esta disminución en el nivel de expresión de proteínas PDE estaría acompañada con un aumento del nivel intracelular de c-di-GMP, lo cual sería concordante con lo reportado en otras bacterias que aumentan los niveles de c-di-GMP en fase estacionaria (Kumar y Chatterji, 2008). En el caso de células crecidas en azufre elemental (Tabla 6; página 47), tal como se describió en la discusión sobre los resultados de RT-PCR, la disminución de la expresión normalizada del gen EAL 83-31, así como el aumento de la expresión de los genes HD 83-19 y HD 137-27, se debería al desarrollo de una biopelículas madura sobre el sustrato sólido.

Al comparar resultados obtenidos mediante las técnicas de RT-PCR y qPCR se apreciaron diferencias entre la determinación de cambios en los niveles de transcripción de los genes HD 137-27 y EAL 83-31. La técnica de qPCR detectó cambios en los niveles de los transcritos en circunstancias donde la técnica de RT-PCR no fue capaz de detectar, debido a la sensibilidad de las técnicas. La técnica de qPCR es más sensible

que la técnica de RT-PCR debido a que el qPCR utiliza fluoróforos que permiten detectar DNA en bajo número de copias a lo largo de la reacción, mientras que la técnica de RT-PCR, detecta la cantidad total de amplificado después de la reacción. La técnica de RT-PCR posee la desventaja de no poder detectar bajo número de copias de amplificado, así como el hecho de que la detección mediante BrEt-UV es saturable. Esta diferencia es especialmente notable con el gen EAL 83-31, en donde la baja sensibilidad de la detección por BrEt, se suma al posible hecho de que las condiciones de PCR no eran las óptimas.

Los resultados obtenidos durante este trabajo entregan las primeras evidencias de la existencia de una vía funcional del c-di-GMP en *A. thiooxidans*. La comprobación definitiva de la existencia de esta vía metabólica requerirá de realización de experimentos que permitan determinar i) la existencia de c-di-GMP en *A. thiooxidans* crecido en azufre o tiosulfato; ii) medición de actividad PDE total a partir de extractos celulares crudos; iii) clonar las putativas DGC y PDE y determinar si expresan su función en un sistema heterólogo; y iv) estudiar la expresión de los genes estudiados mediante estudios proteómicos.

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de los diversos experimentos realizados durante este trabajo es posible emitir las siguientes conclusiones:

- *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463 es capaz de crecer relativamente rápido en azufre elemental o tiosulfato como fuente energética. El cultivo en tiosulfato alcanzó la fase estacionaria mucho antes que el cultivo en azufre.
- Se ha diseñado un protocolo experimental que permite la extracción eficiente de RNA desde células de *A. thiooxidans* mediante una lisis alcalina previa al uso de un reactivo comercial para extracción.
- Los análisis bioinformáticos del genoma parcialmente secuenciado indican que *Acidithiobacillus thiooxidans* posee los componentes necesarios para la vía metabólica y de señalización del c-di-GMP.
- Bajo las variables de sustrato energético y días de crecimiento, existen cambios en los niveles de expresión transcripcional de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31, codificantes para posibles fosfodiesterasas. Esto podría deberse al hecho de que para oxidar el azufre elemental es necesario la adhesión de las células al sustrato sólido y la posterior formación de una biopelícula.
- A medida que avanza el crecimiento en tiosulfato, disminuyen los niveles de transcripción de estas posibles fosfodiesterasas, mientras que en azufre elemental, los genes que codifican fosfodiesterasas HD aumentan su expresión transcripcional.

- En células crecidas en azufre, el gen codificante para la PDE EAL 83-31 presentó un mayor nivel de expresión transcripcional inicial que los genes que codifican para fosfodiesterasas con dominio HD.
- En ambos sustratos energéticos, el gen EAL 83-31 bajó su expresión transcripcional a medida que avanzaba el crecimiento. Debido a que la literatura indica que el c-di-GMP aumenta a medida que se acerca a la fase estacionaria, esta fosfodiesterasa podría ser la principal enzima participante en la degradación de c-di-GMP.

## 6. REFERENCIAS

- Aldridge P., Paul R., Goymer P., Rainey P., Jenal U (2003).** Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology* 47: 1695-1708.
- Alksne LE, Rasmussen BA (1997).** Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *Journal of Bacteriology* 179: 2006-2013.
- Amaro A., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I., Jerez CA (1991).** Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 173: 910-915.
- Amikam D., Galperin MY (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22:3-6.
- Auernick KS, Maezato Y., Blum PH, Kelly RM (2008).** The Genome Sequence of the Metal-Mobilizing, Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Metallosphaera sedula* Provides Insights into Bioleaching-Associated Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 74: 682-692.
- Ausmees N., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Lindberg M (2001).** Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiology Letters* 204:163-167.
- Benach J., Swaminathan SS, Tamayo R., Handelman SK, Folta-Stogniew E., Ramos JE, Forouhar F., Neely H., Seetharaman J., Camilli A., Hunt JF (2007).** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *The European Molecular Biology Organization Journal* 26: 5153-5166.
- Bobrov AG, Kirillina O., Perry RD (2005).** The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiology Letters* 247: 123-130.
- Brombacher E., Baratto A., Dorel C., Landini P (2006).** Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of Bacteriology* 188: 2027-2037.
- Casamayor EO, Schäfer H., Bañeras L., Pedrós-Alió C., Muyzer G (2002).** Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 499-508.
- Castellanos P (2008).** "Biolixiviación, las expectativas y desafíos del proceso"; *Minería Chilena*; 327: 109-121.
- Castro M., Ruiz LM, Barriga A., Jerez CA, Holmes DS, Guilianni N (2009).** C-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria. *Advances Materials Research Volumes 71-73: 223-226.* In *International Biohydrometallurgy Symposium*. Bariloche, Argentina (2009).
- Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot NC, Giese B., Jenal U., Schirmer T (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings National Academy Sciences USA* 101: 17084-17089.
- Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Gilles-Gonzalez MA (2001).** Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry* 40: 34420-34426.

- Chin KH, Lee YC, Tu ZL, Chen CH, Tseng YH, Yang JM, Ryan RP, McCarthy Y., Dow JM, Wang AH, Chou SH (2010).** The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Molecular Biology* 396: 646-662.
- Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., Folcher M., Jenoe P (2006).** Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 32015-32024.
- Claret L., Miquel S., Vieille N., Ryjenkov DA, Gomelsky M., Darfeuille-Michaud A (2007).** The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 16; 282:33275-33283.
- Cotter PA, Stibitz S (2007).** C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion Microbiology* 10:17-23. Review.
- D'Argenio DA, Miller SI (2004).** Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150:2497-2502.
- Dow JM, Fouhy Y., Lucey JF, Ryan RP (2006).** The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1378-1384. Review.
- Duerig A., Abel S., Folcher M., Nicollier M., Schewede T., Amiot N., Giese B., Jenal U (2009).** Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes and Development* 23: 93-104.
- Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez CA, Guiliani N (2005).** Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7033-7040.
- Friedman L., Kolter R (2004).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology* 186: 4457-4465.
- Fong JC, Yildiz FH (2008).** Interplay between cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein and cyclic-di-GMP signaling in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 190: 6646-6659.
- Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV (2001a).** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letter* 203: 11-21.
- Galperin MY, Gaidenko TA, Mulkidjanian AY, Nakano M., Price CW (2001b).** MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiology Letters* 205:17-23.
- Galperin MY (2004).** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology* 6: 552-567.
- Guiliani N., Jerez CA (2000).** Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2318-2324.
- Hammer BK, Bassler BL. (2008).** Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate c-di-GMP levels to control biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 191: 169-177.
- Harneit K., Göksel A., Kock J., Klock J.H., Gehrke T., Sand W (2006).** Adhesion to sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83: 245-254.
- Hasegawa K., Masuda S., Ono TA (2006).** Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF (Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF). *Biochemistry* 45: 3785-3793.

- Hengge R (2009).** Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 7:263-273. Review.
- Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS (2005).** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings National Academy Sciences USA* 102: 14422-14427.
- Hickman JW, Harwood CS (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology* 69:376-389.
- Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S., Eberl L (2001).** The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147: 2517-2528.
- Hurley JH (2003).** GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Science STKE* 164, pe1.
- Hyde DR, Tu CP (1985).** *tnpM*: a novel regulatory gene that enhances Tn21 transposition and suppresses cointegrate resolution. *Cell* 42: 629-638.
- Jackson DW, Simecka JW, Romeo T (2002).** Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 184: 3406-3410.
- Jenal U., Malone J (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Reviews of Genetic* 40:385-407. Review.
- Jonas K., Edwards AN, Simm R., Romeo T., Römling U., Melefors O (2008).** The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology* 70: 236-257.
- Jonas K., Melefors O., Römling U (2009).** Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiology* 4: 341-358.
- Kelly DP, Wood AP (2000).** Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 511-516.
- Kirillina O., Fetherstone JD, Bobrov AG, Abney J., Perry RD (2004).** HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hsm-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Molecular Microbiology* 54: 75-78.
- Kinzler K., Gehrke T., Telegdi J., Sand W (2003).** Bioleaching-a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71: 83-88.
- Klausen M., Aaes-Jorgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T (2003).** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50: 61-68.
- Klebensberger J., Lautenschlager K., Bressler D., Wingender J., Philipp B (2008).** Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptative survival strategy. *Environmental Microbiology* 9: 2942-2955.
- Kulasakara H., Lee V., Brencic A., Liberati N., Urbach J., Miyata S., Lee DG, Neely AN, Hyodo M., Hayakawa Y., Ausubel FM, Lory S (2006).** Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings National Academy Sciences USA* 103(8):2839-2844.
- Kulshina N., Baird NJ, Ferré-D'Amaré AR (2009).** Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nature Structural & Molecular Biology* 16: 1212-1217.
- Kumar M., Chatterji D (2008).** Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 154: 2942-2955.

- Labbate M., Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M., Kjelleberg S (2004).** Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology* 186: 692-698.
- Lai TH, Kumagai Y., Hyodo M., Hayakawa Y., Rikihisa Y (2009).** The *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. *Journal of Bacteriology* 191: 693-700.
- Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007).** A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology* 65:1474-1484.
- Lui HL, Chen BY, Lan YW, Cheng YC (2003).** SEM and AFM images of pyrite surfaces after bioleaching by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 414-420.
- McCarthy Y., Ryan RP, O'Donovan K., He YQ, Jiang BL, Feng JX, Tang JL, Dow JM (2008).** The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology* 9: 819-824.
- Merighi M., Lee VT, Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007).** The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 65:876-895.
- Monds RD, Newell PD, Gross RH, O'Toole GA (2007).** Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesine LapA. *Molecular Microbiology* 63: 656-679.
- Nakamura K., Nakamura M., Yoshikawa H., Amano Y (2001).** Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65:102-108.
- Nakhmchick A., Wilde C., Rowe-Magnus DA (2008).** Cyclic-di-GMP Regulates Extracellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation, and Rugose Colony Development by *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:4199-4209.
- Neunuebel MR, Golden JW (2008).** The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene *all2874* encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions. *Journal of Bacteriology* 190: 6829-6836.
- Newell PD, Monds RD, O'Toole GA (2009).** LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings National Academy Sciences USA* 106: 3461-3466.
- Nikolskaya AN, Mulkidjanian AY, Beech IB, Galperin MY (2003).** MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 5:11-16.
- Pratt JT, Tamayo R., Tischler AD, Camilli A (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry* 282:12860-12870.
- Ramelot TA, et al. (2007).** NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* 66:266-271.
- Ramirez R., Guilliani N., Valenzuela L., Beard S., Jerez CA (2004).** Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4491-4498.



- Ramirez M., Gómez JM, Cantero D., Páca J., Halecký M., Kozliak EI, Sobotka M (2009).** Hydrogen sulfide removal from air by *Acidithiobacillus thiooxidans* in a trickle bed reactor. *Folia Microbiol (Praha)* 54:409-414.
- Rawlings DE, Dew D., du Plessis C (2003).** Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* 21:38-44.
- Rawlings DE (2005).** Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4:13.
- Remonsellez F., Galleguillos F., Moreno-Paz M., Parro V., Acosta M., Demergasso C (2009).** Dynamic of active microorganisms inhabiting a bioleaching industrial heap of low-grade copper sulfide ore monitored by real-time PCR and oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray. *Microbial Biotechnology* 2: 613-624.
- Römling U., Rohde M., Olsen A., Normark S., Reinkoster J (2000).** AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella Typhimurium* at least two independent pathways. *Molecular Microbiology* 36: 10-23.
- Römling U., Gomelsky M., Galperin MY (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology* 57: 629-639.
- Römling U., Amikam D (2006).** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion Microbiology* 9:218-228. Review.
- Römling U., Simm R (2009).** Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. *Contributions to microbiology*; 16: 161-181.
- Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel GA, van Boom JH et al (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325:279-281.
- Roth A., & Breaker RR (2009).** The structural and functional diversity of metabolite binding riboswitches. *Annual Reviews of Biochemistry*. 78, 305-334.
- Ruiz LM, Sand W., Jerez CA, Guilianni N (2007).** C-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: analysis of putative diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) bifunctional proteins. *Advances Materials Research Vol.20:551-555.*
- Ruiz LM, Valenzuela S., Castro M., Gonzalez A., Frezza M., Soulère L., Rohwerder T., Queneau Y., Doutheau A., Sand W., Jerez CA, Guilianni N (2008).** AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 94: 133-137.
- Ruiz LM (2010).** Papel del Quorum Sensing y de la vía c-di-GMP en la regulación del desarrollo de biopelícula en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado en Ciencias con Mención en Microbiología. Departamento de biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Ryan RP, Fouhy Y., Lucey JF, Crossman LC, Spiro S., He YW, Zhang LH, Heeb S., Camara M., Williams P., Dow JM (2006).** Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings National Academy Sciences USA*. 103: 6712-6717.
- Ryan RP, Fouhy Y., Lucey JF, Jiang BL, He YQ, Feng JX, Tang JL, Dow JM (2007).** Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* 63:429-442.
- Ryan RP, Lucey J., O'Donovan K., McCarthy Y., Yang L., Tolker-Nielsen T., Dow JM (2009).** HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 11: 1126-1136.

- Ryjenkov DA, Tarutina M., Moskvina OV, Gomelsky M (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of Bacteriology* 187: 1792-1798.
- Ryjenkov DA, Simm R., Römling U., Gomelsky M (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 281:30310-30314.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P., Schippers A (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59:159-175.
- Sarand I., Osterberg S., Holmqvist S., Holmfeldt P., Skarfstad E., Parales RE, Shingler V (2008). Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* 10: 1320-1334.
- Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology* 187:4774-4781.
- Simm R., Morr M., Kader A., Nitz M., Römling U (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology* 53:1123-1134.
- Simm R., Remminghorst U., Ahmad I., Zakikhany K., Römling U (2009). A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression and motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 191:3928-3937.
- Smith KD, Lipchock SV, Ames TD, Wang J., Breaker RR, Strobel SA (2009). Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nature Structural & Molecular Biology* 16: 1218-1223.
- Sudarsan N., Lee ER, Weinberg Z., Moy RH, Kim JN, Link KH, Breaker RR (2008). Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science* 321: 411-413.
- Tamayo R., Pratt JT, Camilli A (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Reviews of Microbiology* 61:131-148. Review.
- Tamayo R., Schild S., Pratt JT, Camilli A (2008). Role of cyclic di-GMP during el tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the in vivo-induced cyclic di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infections and Immunity* 76:1617-1627.
- Tao F., He YW, Wu DH, Swarup S., Zhang LH (2010). The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of Bacteriology* 192: 1020-1029.
- Tarutina M., Ryjenkov DA, Gomelsky M (2006). An unorthodox bacteriophycocrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *The Journal of Biological Chemistry* 281:34751-34758.
- Thomas C., Andersson CR, Canales SR, Golden SS (2004). PsfR, a factor that stimulates *psbAI* expression in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology* 150: 1031-1040.
- Thormann KM, Duttler S., Saville RM, Hyodo M., Shukla S., Hayakawa Y., Spormann AM (2006). Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology* 188: 2681-2691.
- Wassmann P., Chan C., Paul R., Beck A., Heerklott H., Jenal U., Schirmer T (2007). Structure of BeF3-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* 15: 915-927.

- Wang YS, Pan ZY, Lang JM, Xu JM, Zheng YG (2007).** Bioleaching of chromium from tannery sludge by indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Journal of Hazard Materials* 147:319-324.
- Waters CM, Lu W., Rabinowitz JD, Bassler BL (2008).** Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *Journal of Bacteriology* 190: 2527-2536.
- Weber H., Polen T., Heuveling J., Wendisch VF, Hengge R (2005).** Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma$ S-dependent genes, promoters, and  $\sigma$  factor selectivity. *Journal of Bacteriology* 187: 1591-1603.
- Weber H., Pesavento C., Possling A., Tischendorf G., Hengge R (2006).** Cyclic-di-GMP-mediated signaling within the  $\sigma^S$  network of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 62: 1014-1034.
- Weinhouse H., Sapir S., Amikam D., Shilo Y., Volman G., Ohana P., Benziman M (1997).** c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Letters* 416:207-211.
- Wolfe AJ, Visick KL (2008).** Get the Message Out: Cyclic-Di-GMP Regulates Multiple Levels of Flagellum-Based Motility. *Journal of Bacteriology* 190: 463-475.
- Xia L., Yin C., Dai S., Qiu G., Chen X., Liu J (2010).** Bioleaching of chalcopyrite concentrate using *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in a continuous bubble column reactor. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 37: 289-295.
- Yamamoto K., Ishihama A (2005).** Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology* 56: 215-227.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo 1. Datos obtenidos mediante qPCR para la cuantificación del número de copias de mRNA de los genes HD 83-19, HD 137-27, EAL 83-31 y DNA 16 S.

La cuantificación de los niveles de transcritos correspondientes a los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31 se utilizó con el método de determinación de la abundancia relativa de cada transcrito con respecto al nivel de rRNA 16S. Mediante el uso de la ecuación obtenida para cada curva de calibración se puede obtener el número de copias y la eficiencia por cada reacción de qPCR (Tabla 11). El número de copias de cada transcrito es calculado a partir de los datos de Ct obtenidos a partir de muestras extraídas de células crecidas en azufre elemental o tiosulfato (Tablas 12-13).

**Tabla 11.** Curvas de calibración obtenidas para cada gen mediante qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Ecuación obtenida</b>	<b>Eficiencia*</b>
HD 83-19	$Ct = -3,250 \log (N^{\circ} \text{copias}) + 35,607$	1,03
HD 137-27	$Ct = -3,312 \log (N^{\circ} \text{copias}) + 45,538$	1,00
EAL 83-31	$Ct = -3,173 \log (N^{\circ} \text{copias}) + 44,080$	1,07
rRNA 16 S	$Ct = -4,176 \log (N^{\circ} \text{copias}) + 42,664$	0,74

\*Para el cálculo de la eficiencia (E) se utilizó la función  $E = 10^{-1/s} - 1$ , donde s es la pendiente de la recta obtenida al graficar Ct v/s log N° copias.

**Tabla 12.** Valores de Ct obtenidos para cada gen en células crecidas en azufre elemental. Se presenta el promedio de 4 réplicas biológicas.

	3 Días	9 Días	12 Días
Gen	Ct	Ct	Ct
HD 83-19	25,12 ± 0,44	23,65 ± 0,29	24,53 ± 0,44
HD 137-27	33,14 ± 0,35	31,73 ± 0,64	29,76 ± 0,25
EAL 83-31	29,72 ± 0,36	33,71 ± 0,45	33,12 ± 0,51
rRNA 16 S	5,33 ± 0,20	5,49 ± 0,38	5,63 ± 0,31

**Tabla 13.** Valores de Ct obtenidos para cada gen en células crecidas en tiosulfato. Se presenta el promedio de 4 réplicas biológicas.

	3 Días	9 Días	12 Días
Gen	Ct	Ct	Ct
HD 83-19	20,41 ± 0,33	24,12 ± 0,72	24,62 ± 0,47
HD 137-27	31,45 ± 0,39	34,16 ± 0,34	33,53 ± 0,33
EAL 83-31	29,35 ± 0,50	32,28 ± 0,21	32,82 ± 0,41
rRNA 16 S	5,54 ± 0,34	5,94 ± 0,34	5,52 ± 0,26