



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Programa de Doctorado en Bioquímica

UNIVERSIDAD DE CHILE

Faculté des Sciences (Aix-Marseille  
Ecole Doctorale des université  
Sciences de la Vie et de la Santé

# CARACTERIZACIÓN DEL REGULÓN QUORUM SENSING EN LA BACTERIA BIOLIXIVIANTE *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

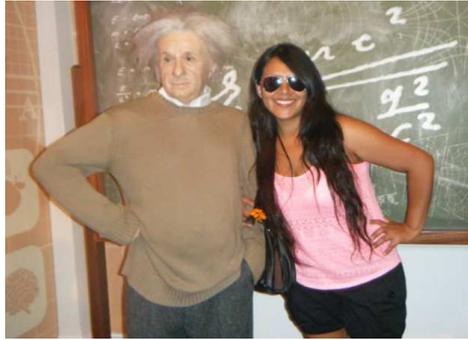
**SIGDE KARINA MAMANI FLORES**

**Director de Tesis: Dr. Nicolas Guiliani Guerin**  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

**Co-Directora de Tesis: Dra. Violaine Bonnefoy**  
CNRS-FRANCE  
Aix-Marseille Université

Santiago-Chile  
2015

*A mi madre, mi padre, mi hermano y mi esposo*



Nací un 12 de enero del año 1984 en Santiago de Chile, soy la menor de dos hermanos y la única hija del matrimonio entre René Mamani y Sonia Flores. Sonia, mi madre, nació en Arica al igual que mi padre, René. Ambos se embarcaron en una aventura y tomaron la decisión de radicarse en la capital. Desde entonces comienza una linda historia de una familia que ha pasado por altos y bajos, pero que siempre ha salido exitosa y se ha basado en los valores y principios inculcados por nuestros ancestros. Mi padre es Ingeniero Químico de la PUC y mi madre es contadora, profesión que le ayudó para ser jefa de hogar mientras mi padre terminaba sus estudios en Santiago. Mi madre es una mujer luchadora, de esas que jamás pierden, no sólo porque tiene siempre la razón, sino porque es una mujer buena, con una humildad que ya no existe en esta sociedad. Mi padre es un hombre valiente, el árbol que nunca se cae, y si lo hace tiene esa capacidad de levantarse una y otra vez. Mi hermano Marcos Mamani es el ejemplo de la familia, tranquilo, inteligente, con la capacidad de resolver cualquier problema serenamente.

Gracias a ellos tres he tomado grandes decisiones en mi vida, siempre recibiendo su apoyo. Cuando decidí dedicarme a la ciencia, siempre tuve claridad de enfocar mis estudios en genética molecular. El año 2003 ingresé a la Pontificia Universidad Católica de Chile a estudiar Biología. Una vez egresada en el año 2008, me di cuenta que aún podía especializarme más, fue entonces cuando ingresé al laboratorio del Dr. Nicolas Guiliani, quién me brindó una oportunidad para hacer un programa de doctorado. El año 2009 ingresé al programa de doctorado de bioquímica de la Universidad de Chile y el año 2010 ingresé al doctorado en microbiología de la Universidad Aix-Marseille en Francia.

De todas las cosas buenas, aprendizajes y experiencias que viví en los casi tres años que viví en Francia, hay una de ellas que marcó mi vida. En los últimos tres meses de mi estadía en Marsella conocí a quién hoy es mi esposo, Firat Cetin, él me ha apoyado y acompañado en esta última etapa de mi tesis en cotutela y le agradezco por su eterna paciencia y por quererme tanto.

Doy gracias a Dios por todo lo que he vivido hasta el momento, las cosas buenas y malas me han enseñado que la vida no es fácil, pero que ser feliz tampoco es tan difícil. Como dijo Albert Einstein *“Si quieres vivir una vida feliz, ácala a una meta y no a una persona o un objeto”*

## AGRADECIMIENTOS

A la beca doctoral de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) que me permitió realizar mis estudios de doctorado en la Universidad de Chile por los primeros 4 años (2009-2012). A las BECAS CHILE, CONICYT por otorgarme la beca de cotutela doctoral para obtener mi título de doctor en la Universidad Aix-Marseille, Marsella-Francia. A CONICYT por otorgarme la beca de apoyo a la realización de tesis doctoral (2012) y la beca de asistencia a congreso en el extranjero (2011).

Al Dr. Nicolas Guiliani, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis bajo su tutoría y por sus valiosas sugerencias durante el doctorado.

A la Dra. Violaine Bonnefoy por sus valiosos comentarios a lo largo de toda mi estadía en Francia y por permitirme usar los equipos de su laboratorio.

A todos los doctores y profesores del programa de Doctorado en Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por sus consejos y su apoyo incondicional para llevar a término de la mejor manera mi doctorado. En especial a los profesores de la comisión evaluadora de la tesis, Dr. Omar Orellana, Dra. María Antonieta Valenzuela y la Dra. Inés Contreras, por sus valiosas críticas y sugerencias.

Al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por su apoyo durante estos años.

A todos los miembros de presentes y ausentes del Laboratorio de Comunicación Bacteriana a cargo del Dr. Guiliani y del Laboratorio de Comunicación Bacteriana a cargo de la Dra. Bonnefoy. Lina Ruiz por sus consejos durante mi primera etapa de tesis y por su gran disposición y apoyo en los últimos meses. Javiera Ortiz, Valentina Abarca, Mauricio Díaz, Pablo Alviz, Alex González, Matías Castro y Paula Anatibia por su compañerismo. Oscar Arriagada por su ayuda técnica, gran apoyo y disposición en momentos experimentales difíciles durante la realización de la tesis.

A los profesores Yves Queneau y Laurent Soulere por recibirme en su laboratorio en el “Laboratoire de Chimie Organique, INSA-LYON” y por amable donación de las moléculas de Acil Homoserinas Lactonas.



## INDICE DE MATERIAS

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
2.1 Quorum sensing.....	14
2.1.1 AHL sintasa I.....	15
2.1.2 Análogos de AHL.....	17
2.1.3 Regulador transcripcional R.....	20
2.1.4 Regulón QS.....	21
2.1.5 QS y biopelículas.....	26
2.2 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	29
2.2.1 Características principales de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	29
2.2.2 Biopelículas de <i>At. ferrooxidans</i> .....	30
2.2.3 <i>At. ferrooxidans</i> y Quorum Sensing.....	32
2.3 Propuesta de esta tesis de investigación.....	35
<b>HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	37
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	37
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
3.1 Cepas y medios de cultivo. ....	39
3.2 AHLs sintéticas y análogos de AHLs.....	40
3.3 Ensayos de adherencia al mineral.....	40
3.4 Protocolo de preparación de cultivos de <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> para la extracción de ARN total.....	42
3.5 Obtención de células planctónicas y adheridas.....	45
3.6 Extracción de ARN total y obtención de ADNc.....	45
3.7 PCR en tiempo real (qRT-PCR).....	46
3.8 Ensayo de expresión global mediante microarreglos de ADN.....	47
3.9 Análisis de microarreglos de ADN.....	49
3.10 Construcción del vector suicida pSM1a.....	51
3.11 Construcción del vector suicida pSM1b.....	53

3.12	Conjugación.....	59
3.13	Construcción de un vector de expresión de AfeR.....	61
3.14	Expresión y purificación de AfeR.....	61
3.15	Ensayo de cambio de movilidad electroforética.....	64
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1	Identificación de análogos sintéticos de AHLs que favorecen la adherencia a sustrato mineral de <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	66
4.2	Estudio del transcriptoma de <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs.....	77
4.2.1	Identificación del tiempo cuando el sistema QS se encuentra estimulado por análogos sintéticos de AHLs mediante el estudio de los niveles de ARNm de <i>afeI</i> dentro de la curva de crecimiento de <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	77
4.2.2	Análisis de la expresión global de los genes de <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs.....	80
4.3	Construcción de un mutante nulo del gen <i>afeI</i> en <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> para analizar su efecto en la adherencia en el mineral.....	127
4.3.1	Construcción de un vector suicida mediante ingeniería genética.....	127
4.3.1.1	Construcción de los vectores suicida pSM1a y pSM1b.....	127
4.3.2	Intento de obtención del mutante <i>afeI</i> en <i>At. ferrooxidans</i> <sup>T</sup> por medio de conjugación.....	131
4.4	Identificación del sitio de unión de AfeR en la región reguladora del gen <i>afeI</i> .....	137
4.4.1	Construcción de un vector de expresión para AfeR.....	137
4.4.2	Expresión y purificación de AfeR.....	137
4.4.3	Identificación mediante un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) de la secuencia de ADN donde se une AfeR.....	139
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>144</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>164</b>

<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>183</b>
-----------------------	------------

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Esquema de la biolixiviación de los sulfuros metálicos por la vía del tiosulfato.....	8
<b>Figura 2.</b> Esquema de la biolixiviación de los sulfuros metálicos por la vía del polisulfuro.....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema del sistema de comunicación Quorum Sensing tipo AI-1.....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de la síntesis y estructura de Acil Homoserinas Lactonas.....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema de la degradación de las moléculas de Acil Homoserinas Lactonas.....	19
<b>Figura 6.</b> Genes regulados por Quorum Sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
<b>Figura 7.</b> Diagrama de Venn de la comparación de los regulones Quorum Sensing de células <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tratadas con distintas moléculas de AHL.....	25
<b>Figura 8.</b> Esquema del locus genético Quorum Sensing de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	34
<b>Figura 9.</b> Acil Homoserinas Lactonas producidas por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	34
<b>Figura 10.</b> AHLs y análogos sintéticos utilizados en cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> ..	41
<b>Figura 11.</b> Esquema de la preparación de cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> para la extracción de muestras de ARN total.....	44
<b>Figura 12.</b> Representación de un microarreglo de ADN de Agilent utilizado para los estudios transcriptómicos del genoma de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	50
<b>Figura 13.</b> Esquema teórico de la inserción del vector suicida pSM1a (pUC18mobΔ <i>afeI</i> Kan) en el ADN genómico de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	52
<b>Figura 14.</b> Esquema de la inserción del gen de kanamicina en el vector pUC18mob.....	52
<b>Figura 15.</b> Esquema general de la construcción del vector suicida pSM1a (pUC18mobΔ <i>afeI</i> Kan).....	54
<b>Figura 16.</b> Esquema teórico de la inserción del vector suicida pSM1b (pBSmobΔ <i>afeI</i> ::Kan) .....	55
<b>Figura 17.</b> Esquema general de la inserción de las regiones N y C en el plásmido BS.....	57
<b>Figura 18.</b> Esquema general de la construcción del vector suicida pSM1b (pBSmobΔ <i>afeI</i> ::Kan)..	58
<b>Figura 19.</b> Esquema general de la construcción del vector de expresión de AfeR.....	62
<b>Figura 20.</b> Esquema general del sitio de unión de AfeR.....	65

<b>Figura 21.</b> Microfotografías de cupones de azufre obtenidas desde cultivos abiótico y bióticos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin AHLs.....	68
<b>Figura 22.</b> Curvas de crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin AHLs.....	69
<b>Figura 23.</b> Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos abiótico y bióticos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin OH-C12-AHL y OH-C14-AHL.....	70
<b>Figura 24.</b> Curvas de crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin imidazolium.....	72
<b>Figura 25.</b> Curvas de crecimiento de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin tetrazol.....	72
<b>Figura 26.</b> Microfotografías de cupones de azufre obtenidas desde cultivos bióticos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con imidazolium.....	73
<b>Figura 27.</b> Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos bióticos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con y sin tetrazol.....	74
<b>Figura 28.</b> Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos bióticos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol y OH-C14-AHL.....	76
<b>Figura 29.</b> Análisis de la expresión diferencial del gen <i>afeI</i> en cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> en presencia y ausencia de OH-C14-AHL.....	79
<b>Figura 30.</b> Análisis de la expresión diferencial de los genes <i>afeI</i> , <i>afeR</i> , <i>zwf</i> , <i>wcaA</i> y AFE_1339 en cultivos de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol.....	81
<b>Figura 31.</b> Esquema de la estrategia experimental de los microarreglos de ADN para las células sésiles y planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol.....	82
<b>Figura 32.</b> Análisis de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con/sin tetrazol.....	85
<b>Figura 33.</b> Clasificación COG de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	86
<b>Figura 34.</b> Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	87
<b>Figura 35.</b> Vías metabólicas involucradas en la síntesis de glucosa-1P y afectadas por la presencia de tetrazol en células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	89
<b>Figura 36.</b> Análisis de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	91
<b>Figura 37.</b> Clasificación COG de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	93

<b>Figura 38.</b> Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	94
<b>Figura 39.</b> Esquema de la participación del gen <i>afeI</i> en el sistema Quorum Sensing.....	94
<b>Figura 40.</b> Vías metabólicas donde participan los genes con expresión diferencial en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	95
<b>Figura 41.</b> Análisis de la expresión diferencial de los genes de células sésiles con el ARN total de células versus células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	97
<b>Figura 42.</b> Clasificación en base a la función biológica predicha de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	99
<b>Figura 43.</b> Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados al comparar la transcripción global de células sésiles contra la transcripción global de células planctónicas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> ambas con tetrazol.....	100
<b>Figura 44.</b> Vías metabólicas donde participan los genes sobre-expresados en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	104
<b>Figura 45.</b> Vías metabólicas donde participan los genes reprimidos en células sésiles de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> con tetrazol.....	105
<b>Figura 46.</b> Vías metabólicas involucradas en el metabolismo de la glucosa-1P.....	107
<b>Figura 47.</b> Resultado del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I y III.....	110
<b>Figura 48.</b> Clasificación COG de los genes relacionados con la formación de biopelículas y regulados por el sistema Quorum Sensing en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	112
<b>Figura 49.</b> Clasificación KEGG de los genes relacionados con la formación de biopelículas y regulados por el sistema Quorum Sensing de los grupos I y II.....	113
<b>Figura 50.</b> Genes regulados por el sistema Quorum Sensing involucrados con la síntesis de glucosa-1P y precursores de exopolisacáridos.....	119
<b>Figura 51.</b> Resultado del análisis de la transcripción global de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I y III.....	120
<b>Figura 52.</b> Descripción de la participación de los genes <i>gfa</i> y AFE_0697 en la formación de biopelículas.....	123
<b>Figura 53.</b> Resultado del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos II y III.....	125
<b>Figura 54.</b> Resultado del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I, II y III.....	125

<b>Figura 55.</b> Verificación de la presencia de la región <i>mob</i> en el vector pUC18 (2.6 kb).....	128
<b>Figura 56.</b> Obtención del gen de resistencia a kanamicina desde el plásmido pUC4KISS.....	128
<b>Figura 57.</b> Verificación de la inserción del gen de resistencia a kanamicina en el vector pUC18 <i>mob</i> .....	129
<b>Figura 58.</b> Verificación y obtención del gen trunco <i>afeI</i> desde el vector pCR-Blunt-TOPO.....	129
<b>Figura 59.</b> Verificación de la construcción del vector suicida pSM1a (pUC18 <i>mob</i> $\Delta$ <i>afeI</i> Kan)....	130
<b>Figura 60.</b> Verificación de la inserción de la región N y C en el plásmido BS.....	132
<b>Figura 61.</b> Verificación de la construcción del gen trunco $\Delta$ <i>afeI</i> (región N-C) en el plásmido BS.....	133
<b>Figura 62.</b> Verificación de la construcción del vector suicida pSM1b (Bluescript <i>mob</i> $\Delta$ <i>afeI</i> ::Kan) .....	134
<b>Figura 63.</b> Verificación de la correcta inserción del gen <i>afeR</i> en el plásmido pET21.....	138
<b>Figura 64.</b> SDS-PAGE de la purificación parcial de AfeR.....	140
<b>Figura 65.</b> Secuencia de ADN de la región reguladora del gen <i>afeI</i> utilizada en los ensayos de “Electrophoretic Mobility Shift Assay” .....	142
<b>Figura 66.</b> Unión de AfeR a la región reguladora del gen <i>afeI</i> .....	143
<b>Figura 67.</b> Electrophoretic Mobility Shift Assay para verificar la especificidad de unión de AfeR en la región reguladora del gen <i>afeI</i> de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> .....	143

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Algunos microorganismos procariontes involucrados en la disolución de sulfuros metálicos.....	10
<b>Tabla 2.</b> Algunas bacterias Gram-negativas que utilizan el sistema Quorum Sensing en la regulación de la formación de biopelículas.....	28
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados para los experimentos de qRT-PCR.....	48
<b>Tabla 4.</b> Descripción de las 16 hibridaciones realizadas en las 2 láminas de microarreglos de ADN .....	50
<b>Tabla 5.</b> Partidores utilizados para la obtención del gen $\Delta afeI$ (regiones N y C).....	54
<b>Tabla 6.</b> Diferentes condiciones experimentales realizadas en los ensayos de conjugación.....	60
<b>Tabla 7.</b> Partidores utilizados para la amplificación del gen <i>afeR</i> y para corroborar su correcta inserción y orientación en el vector de expresión.....	62
<b>Tabla 8.</b> Partidores utilizados para obtener el fragmento de ADN de la región regulatoria del gen <i>afeI</i> de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <sup>T</sup> y el gen <i>rrs</i> de <i>Thiomonas arsenitoxydans</i> .....	65
<b>Tabla 9.</b> Genes regulados por el sistema Quorum Sensing que participan en la formación de biopelículas y presentan una función biológica descrita y están sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol en los grupos I y II.....	114
<b>Tabla 10.</b> Genes regulados por el sistema Quorum Sensing que participan en la formación de biopelículas y presentan una función biológica descrita y están reprimidos en células planctónicas con tetrazol en los grupos I y II.....	115
<b>Tabla 11.</b> Genes que presentan una expresión diferencial al comparar los grupos I y III.....	121
<b>Tabla 12.</b> Resultados de los experimentos de conjugación con el vector pSM1b.....	136

## ABREVIATURAS

<b>acil-ACP</b>	Proteína cargadora de grupos acilos
<b>AHLs</b>	Acil homoserina lactonas
<b>AI</b>	Autoinductor
<b>AI-1</b>	Autoinductor tipo 1
<b>AI2</b>	Autoinductor tipo 2
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>C8-AHL</b>	<i>N</i> -octanoil-L-homoserina lactona
<b>C10-AHL</b>	<i>N</i> -decanoil-L-homoserina lactona
<b>C12-AHL</b>	<i>N</i> -dodecanoil-L-homoserina lactona
<b>C3</b>	Carbono 3
<b>CNRS</b>	Centre National de la Recherche Scientifique
<b>COG</b>	Clusters of Orthologous Groups
<b>CTP</b>	Citidina trifosfato
<b>DAPI</b>	Diamidino-2-phenylindole
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>dNTPs</b>	Deoxyribonucleotide triphosphates
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EMSA</b>	Ensayos de cambio de movilidad electroforética
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>FeS<sub>2</sub></b>	Pirita
<b>FOI</b>	Frecuencia de incorporación
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HPP</b>	Histidinol-fosfato fosfatasa
<b>H<sup>+</sup></b>	Hidrógeno
<b>INSA</b>	Institut National des Sciences Appliquées
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tio-galactósido
<b>JPEG</b>	Grupo Conjunto de Expertos en Fotografía
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<b>LB</b>	Luria-Bertani Broth
<b>MEME</b>	Multiple Em for Motif Elicitation
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>OH</b>	Grupo hidroxilo

<b>OH-C8-AHL</b>	<i>N</i> -(3-hidroxiocetanoil)-L-homoserina lactona
<b>OH-C10-AHL</b>	<i>N</i> -(3-hidroxiodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>OH-C12-AHL</b>	<i>N</i> -(3-hidroxidodecanoil)-L-homoserina lactona
<b>OH-C14-AHL</b>	<i>N</i> -(3-hidroxitetradecanoil)-L-homoserina lactona
<b>oxo-C12-AHL</b>	<i>N</i> -(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PQS</b>	Señal quinolona de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PS1</b>	Secuencia palindrómica 1
<b>PS2</b>	Secuencia palindrómica 2
<b>PUC</b>	Pontificia Universidad Católica de Chile
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativo de transcripción reversa
<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>RISCs</b>	Compuestos inorgánicos reducidos de azufre
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación del RNA
<b>SAM</b>	<i>S</i> -adenosilmetionina
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>SPE</b>	Sustancias Poliméricas Extracelulares
<b>UTP</b>	Uridina trifosfato

## 1. RESUMEN

El Quorum Sensing (QS) es un sistema de comunicación bacteriana capaz de regular varios procesos celulares dependientes de la densidad de la población microbiana. En bacterias Gram-negativas esto ocurre mediante la producción, por parte de las bacterias, de moléculas señal autoinducidas (AI) de tipo acil homoserina lactonas (AHLs). La liberación de AHLs hacia el exterior de la célula provoca un aumento de su concentración, lo que es detectado por la población bacteriana generando como respuesta una regulación de la expresión de ciertos genes (regulón QS).

Nuestro laboratorio ha estudiado e identificado un sistema QS funcional en la cepa ATCC 23270<sup>T</sup> de *Acidithiobacillus (At.) ferrooxidans*. Este sistema QS está compuesto principalmente por dos elementos: AfeI, una proteína AHL sintasa codificada por el gen *afeI* y AfeR, un regulador transcripcional de la familia LuxR codificado por el gen *afeR*. Además, mediante el uso de análogos sintéticos de AHLs revelamos que las moléculas de QS de tipo AHLs (OH-C14-AHL, OH-C12-AHL y tetrazol) modulan la adherencia a mineral, como pirita y cupones de azufre, de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.

En esta investigación nos planteamos identificar los genes que son regulados por QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, y en particular definir aquellos que están relacionados con la formación de biopelículas. Nuestra hipótesis postula que los análogos sintéticos de AHL inducen el sistema QS. Así, nosotros proponemos modular la adherencia sobre el sustrato mineral de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> a través del uso de estas moléculas. La utilización de ellas permitirá caracterizar el regulón QS en esta cepa bacteriana mediante análisis transcriptómicos.

La identificación de análogos sintéticos de AHLs que favorecen la adherencia a cupones de azufre de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> nos permitió estudiar el transcriptoma de este microorganismo en condiciones donde el regulón QS se encuentra estimulado. El análisis del transcriptoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> mediante la técnica de microarreglos de ADN en

presencia o ausencia de un análogo sintético de AHLs nos permitió identificar el regulón QS y determinar aquellos genes relacionados con la formación de biopelículas.

Este es el primer estudio de la expresión global de los genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> utilizando análogos sintéticos de AHLs como activadores del sistema QS. Esto permitió generar valiosa información respecto de la respuesta de estos microorganismos a estas señales de comunicación.

Por consiguiente, la presente tesis respecto al estudio y caracterización del regulón QS, y en particular aquellos genes relacionados con la formación de biopelículas es el inicio de una serie de líneas de investigación, las cuales podrían ayudar a contribuir en la comprensión de cuáles y cómo son las condiciones fisiológicas de este microorganismo que favorecen el proceso de biolixiviación.

## ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a bacterial communication system capable of controlling several cellular processes dependent on the density of the microbial population. In Gram-negative bacteria, it occurs mainly through the production by bacteria of small diffusible signaling molecules, termed autoinducers (AI), of the acyl homoserine lactones type (AHLs). The release of AHLs outside the cell causes an increase in their concentration, which is detected by the bacterial population generating the regulation of the expression of several genes (regulon QS).

Our laboratory has studied and identified a functional QS system in the *Acidithiobacillus (At.) ferrooxidans* ATCC 23270<sup>T</sup> type strain. The QS system is mainly composed of two elements: AfeI, an AHL synthase encoded by the *afeI* gene and AfeR, a transcriptional regulator of the LuxR family encoded by the *afeR* gene. Besides, by using synthetic analogs of AHLs (OH-C14-AHL, OH-C12-AHL and tetrazol), we have shown that AHL-type QS molecule analogs modulate adhesion of *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> to minerals, such as pyrite, and sulfur coupons.

In this research, we propose to identify the genes that are regulated by QS in *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, particularly those that are associated with biofilm formation. For this, we propose to modulate the adhesion of *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> to mineral substrate through the use of a synthetic AHL analog. Our working hypothesis postulates that AHLs molecules induce the QS system, and that their use will allow the characterization of the QS regulon of this bacterial strain by transcriptomic analysis.

The identification of synthetic AHLs improving adherence of *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> on sulfur coupons allowed us to study the transcriptome of this organism in conditions in which QS regulon is stimulated. Transcriptome analysis of *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> by the technique of DNA microarrays in the presence or absence of one of these AHLs synthetic analogues allowed us to identify the QS regulon and to determine genes involved in biofilm formation.

This is the first study of global gene expression of *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> using AHLs synthetic analogues as activators of the QS system. This allowed us to obtain valuable informations regarding the response of this organism to this communication signal.

Therefore, this thesis on the study and characterization of the QS regulon, in particular those genes related to biofilm formation, is the beginning of a series of research lines, which could help to understand the *At. ferrooxidans* physiological conditions that improve bioleaching processes.

## 2. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la minería en Chile se basa en la extracción de cobre mediante procesos como la pirometalurgia y biolixiviación. Esta última es una de las aplicaciones dentro de la hidrometalurgia en la cual son utilizados varios métodos para la recuperación de metales. La biolixiviación es un procedimiento capaz de generar un menor impacto ambiental, permite obtener un mayor porcentaje de recuperación del metal a partir de minerales de baja ley y es más económico que los procesos normalmente utilizados, razón que lo hace muy relevante para la obtención de cobre (Brierley, 1984).

El proceso de biolixiviación comprende un conjunto de reacciones químicas que tienen como resultado la disolución de minerales por parte de los microorganismos que obtienen energía a expensas de sustancias inorgánicas, liberando de paso metales como el cobre con mayor eficiencia que con los métodos convencionales (Rossi, 1990). La biolixiviación de minerales como los sulfuros metálicos se basa esencialmente en la oxidación de estos últimos a través de un ataque químico mediado por iones  $\text{Fe}^{3+}$  y/o protones como ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) que provocan la separación de los metales y el sulfuro del mineral. Este proceso se relaciona directamente con los microorganismos presentes en el ambiente, puesto que ellos poseen la capacidad de regenerar los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . De esta forma, el contacto directo o indirecto de los microorganismos con el mineral y la vía de reacción (ataque químico) que ocurre en la disolución de los sulfuros metálicos, son factores que influyen directamente en el proceso de biolixiviación.

La disolución de los sulfuros metálicos debido a la actividad microbiana puede ocurrir por “contacto” y “sin contacto” con el mineral. La vía sin contacto entre la célula y el mineral asume que los microorganismos oxidan iones  $\text{Fe}^{2+}$  y reducen compuestos de azufre como tiosulfato disueltos en el medio, generando iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que son capaces de atacar químicamente a los sulfuros metálicos del mineral. En cambio, en la vía por contacto, la célula se adhiere a la superficie del mineral principalmente por las interacciones electrostáticas entre las células cargadas positivamente -debido a que las

sustancias poliméricas extracelulares de los microorganismos se encuentran cargadas de iones  $\text{Fe}^{3+}$  y el mineral cargado negativamente (Sand y Gehrke, 2006). En estas condiciones la célula es capaz de oxidar a los sulfuros metálicos de la superficie mineral mediante procesos electroquímicos mediado por iones  $\text{Fe}^{3+}$  de igual manera que el mecanismo sin contacto, pero con mayor eficiencia por la cercanía entre la célula y la superficie mineral. De esta forma, la primera función de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  en la vía por contacto es la mediación de la adherencia de la célula a la superficie mineral, mientras que su segunda función es la disolución oxidativa de los sulfuros metálicos (Sand y col., 2001; Rawlings, 2002; Rohwerder y col., 2003).

En cuanto a las vías de reacción, existen sólo dos que controlan la disolución de los sulfuros metálicos; la vía del tiosulfato y la vía del polisulfuro (Schippers y Sand, 1999; Rohwerder y col., 2003). La vía de reacción es determinada de acuerdo a la especie del mineral, es decir, si corresponden a sulfuros metálicos ácido-insolubles o ácido-solubles. Los minerales ácido-insolubles, cuya disolución ocurre por la vía del tiosulfato, poseen una configuración electrónica donde la valencia es derivada únicamente del orbital del átomo metálico, lo cual restringe al ataque químico sólo a través de iones  $\text{Fe}^{3+}$ . En contraste, los minerales ácido-solubles son disueltos por la vía del polisulfuro, puesto que poseen una configuración electrónica donde la valencia deriva tanto de los orbitales del metal como de la parte sulfurada del mineral, por lo que el ataque químico puede ocurrir a través de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y protones ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

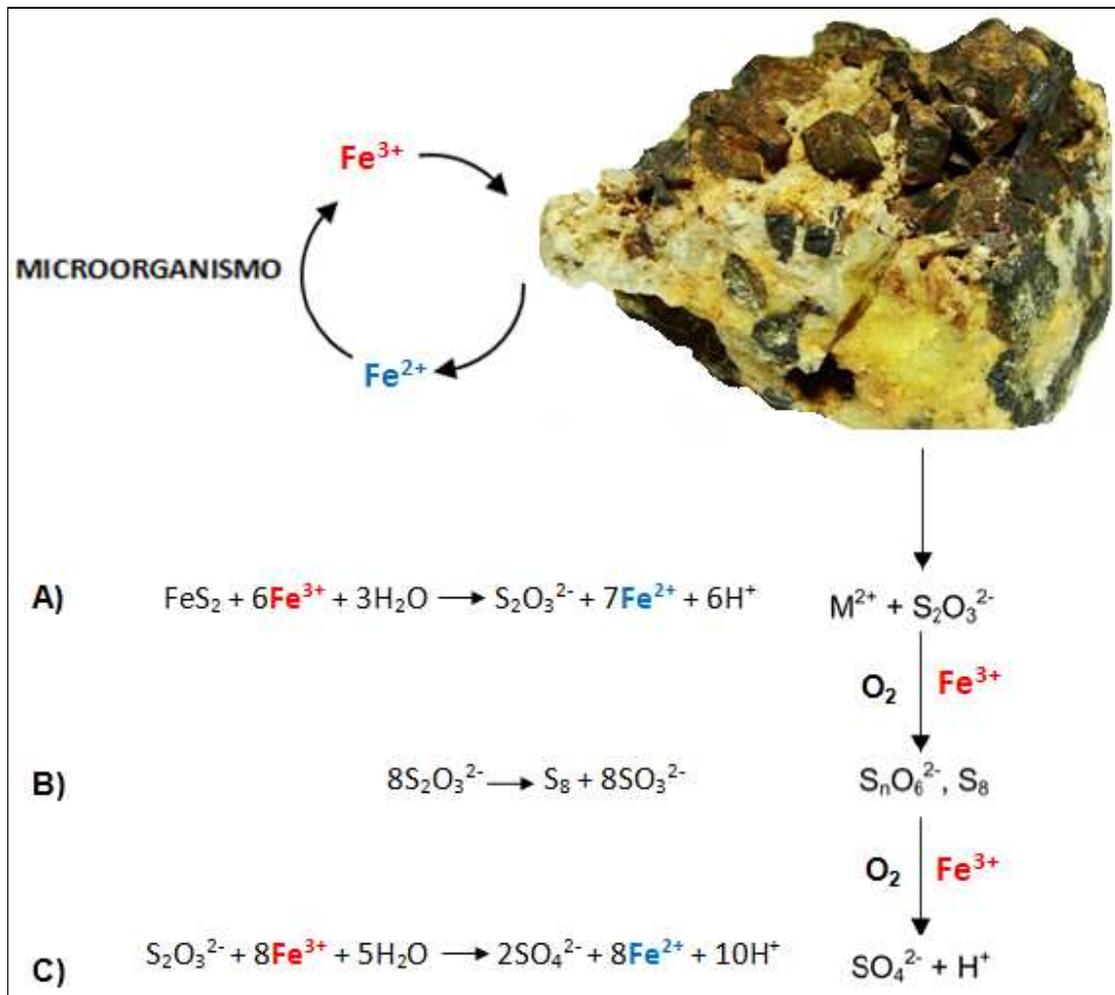
Minerales ácido-insolubles como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ) y tungstenita ( $\text{WS}_2$ ) son oxidados a través de la extracción de electrones mediante iones  $\text{Fe}^{3+}$ , generando la ruptura de los enlaces entre el azufre y el metal formando grupos disulfuros que son oxidados a grupos tiosulfatos. Los productos de esta reacción son los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y el tiosulfato (Schippers y col., 1996). El tiosulfato es inestable a pH ácido y es oxidado por los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y por los microorganismos oxidadores de azufre vía tetrionato y otros compuestos de azufre hasta sulfato. Por otra parte, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  no son oxidados en tasas significativas a pH ácido, son los microorganismos los encargados de oxidarlos y regenerar

los iones  $\text{Fe}^{3+}$ , los cuales pueden volver a oxidar el mineral y entrar nuevamente al ciclo de oxidación (Fig. 1).

Los minerales ácido-solubles como la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y hauerita ( $\text{MnS}_2$ ) son disueltos por la acción combinada de extracción de electrones por parte de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y por el ataque de protones. Esto provoca la oxidación del azufre y posterior ruptura del enlace químico entre este último y el metal. Dos protones se unen al azufre, liberándose como sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) o catión de sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}^+$ ), el cual puede espontáneamente dimerizar y generar disulfuro ( $\text{H}_2\text{S}_2$ ). Simultáneamente, los iones  $\text{Fe}^{3+}$  pueden oxidar la parte sulfurada, provocando una serie de reordenamientos y oxidaciones vía polisulfuros hasta azufre elemental (Steudel, 1996). En presencia de microorganismos azufre oxidadores, el azufre elemental puede ser removido mediante su oxidación hasta ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), regenerando los protones consumidos previamente por la disolución del sulfuro metálico (Schippers y Sand, 1999, Fig. 2).

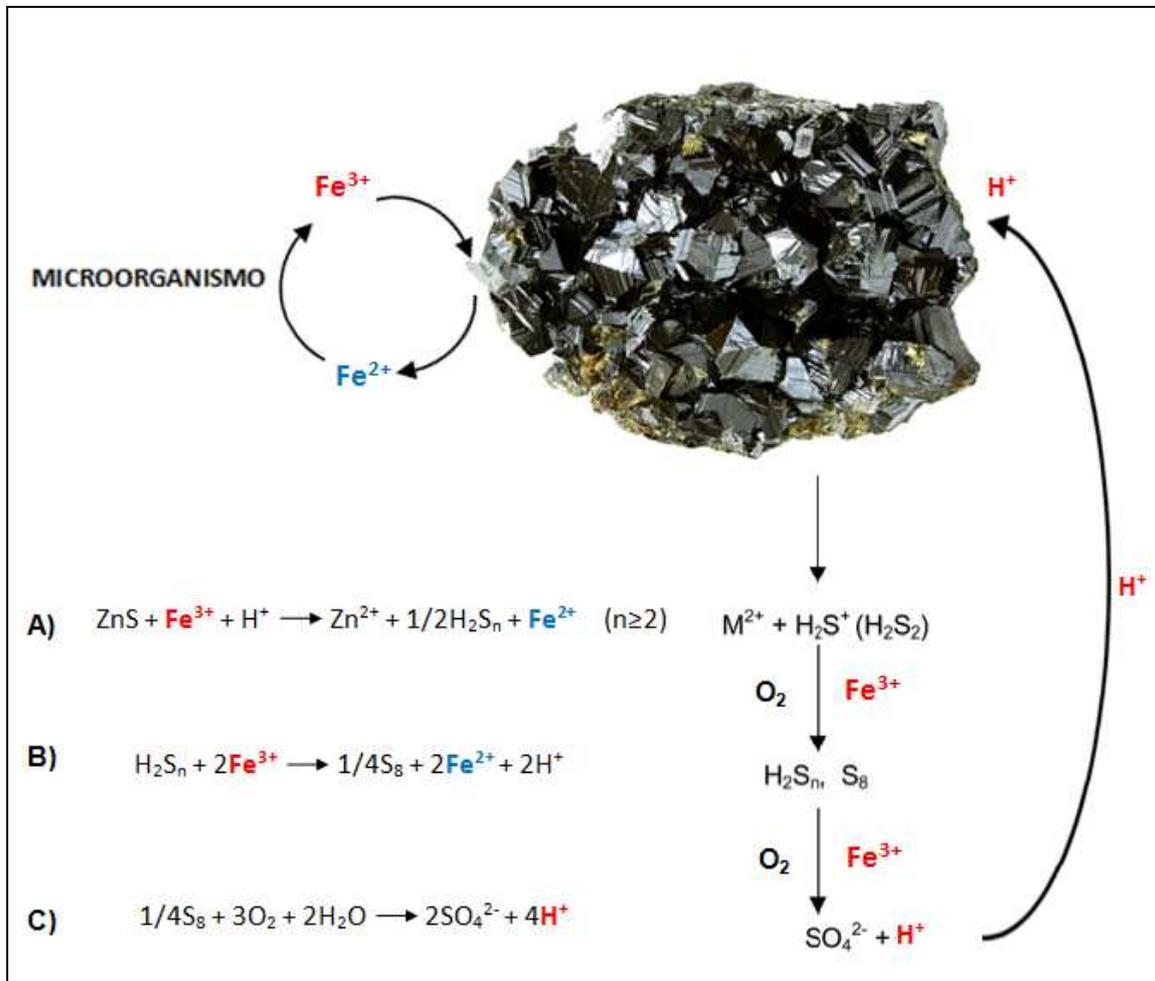
Dentro del consorcio de microorganismos biomineros existen diversos grupos procariontes. Un estudio sugiere que hay al menos 11 divisiones procariotas que pueden estar presentes en el proceso de biolixiviación (Tabla 1, Baker y Banfield, 2003). Entre estas divisiones, la mayor parte pertenecen al dominio Bacteria, siendo el filo proteobacteria el más estudiado. Sin embargo, existen representantes del dominio Archaea de gran importancia en el nicho biominero, puesto que algunas de éstas son hipertermófilas, es decir, son capaces de prosperar sólo a altas temperaturas (45-120°C) (Tabla 1, Valdés y col., 2010).

Entre las bacterias comúnmente presentes dentro del consorcio biolixivante se encuentran las que pertenecen al género *Acidithiobacillus* donde se destacan *Acidithiobacillus albertensis*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*,



**Figura 1. Esquema de la biolixiviación de los sulfuros metálicos por la vía del tiosulfato.**

**A)** Los iones  $\text{Fe}^{3+}$  atacan los sulfuros metálicos, como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), a través de la extracción de electrones provocando su reducción y liberación de cationes metálicos ( $\text{M}^{2+}$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). **B)** En ausencia de los microorganismos la producción de azufre elemental de la oxidación de tiosulfato puede ser significativa (10-20%). Sin embargo, la presencia de éstos ayuda a la oxidación de los iones  $\text{Fe}^{2+}$ , regenerando los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y favoreciendo la oxidación de los sulfuros metálicos. **C)** El tiosulfato es oxidado químicamente o por los microorganismos vía tetrionato y otros politionatos hasta sulfato.



**Figura 2. Esquema de la biolixiviación de los sulfuros metálicos por la vía del polisulfuro.** A) Los sulfuros metálicos, como la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), pueden ser atacados químicamente por los iones  $\text{Fe}^{3+}$  o protones, provocando la extracción de electrones y la unión de dos protones para formar sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) o cationes de este que pueden dimerizar y generar disulfuro ( $\text{H}_2\text{S}_2$ ). B) En ausencia de los microorganismos la producción de azufre elemental ( $\text{S}$ ) puede ser significativa (90%) mediante reacciones químicas con iones  $\text{Fe}^{3+}$ . C) Sin embargo, la presencia de estos microorganismos oxidadores de azufre favorecen la oxidación del azufre elemental hasta ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), permitiendo a su vez a la regeneración de los protones consumidos previamente por la disolución de los sulfuros metálicos.

**Tabla 1.** Algunos microorganismos procariontes involucrados en la disolución de sulfuros metálicos (Castro, 2013).

Microorganismo	Filo	Sustrato	Temperatura	Referencia
<b>BACTERIA</b>				
<i>Acidiphilium acidophilum</i>		Azufre	30°C	Hiraishi y col. (1998)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>		Azufre	28-30°C	Kelly y Wood (2000); Waksman y Joffe (1922)
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>		Azufre	28-30°C	Bryant y col. (1983)
<i>Acidithiobacillus caldus</i>		Azufre	45°C	Hallberg y Lindstrom (1994); Kelly y Wood (2000)
“ <i>Acidihalobacter prosperus</i> ”	Proteobacteria	Hierro* y azufre	23-41°C	Huber y Stetter (1989)
<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i>		Hierro y azufre	38°C	Hallberg y col. (2011)
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>		Hierro y azufre	4-37°C	Hallberg y col. (2010)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		Hierro y azufre	30-35°C	Kelly y Wood (2000); Leathen y Braley (1954).
<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>		Hierro y azufre	10-37°C	Hedrich y Johnson (2013)
“ <i>Ferrovum myxofaciens</i> ”		Hierro*	20-30°C	Johnson y col. (2014)
<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>		Hierro y azufre	10-30°C	Falagan y Johnson (2015)
<i>Acidiphilium cryptum</i>		Hierro**	30°C	Kusel y col. (1999)
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria	Hierro**	30°C	Kishimoto y col. (1991)
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Actinobacteria	Hierro	48°C	Clark y Norris (1996)
“ <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> ”		Hierro	25-35°C	Johnson y col. (2009)
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Nitrospira	Hierro*	30-37°C	Coram y Rawlings (2002)
“ <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> ”		Hierro*	30-42°C	Tyson y col. (2005)
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>		Hierro*	28-30°C	Breed y col. (1999); Hippe (2000)

<i>Alicyclobacillus ferrooxydans</i>		Hierro*	17-40°C	Jiang y col. (2008)
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	Firmicutes	Hierro y azufre	35°C	Dufresne y col. (1996)
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>		Hierro y azufre	45-48°C	Golovacheva (1979); Karavajko y col. (1990)
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>		Hierro y azufre	45-50°C	Norris y col. (1996)
<b>ARCHAEA</b>				
<i>Acidianus infernus</i>		Hierro y azufre	80-95°C	Segerer y col. (1986)
<i>Sulfolobus tokodaii</i>		Hierro* y azufre	80°C	Suzuki y col (2002)
<i>Metallosphaera sedula</i>		Hierro* y azufre	75°C	Huber y col. (1989)
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Crenarchaeota	Hierro* y azufre	75°C	Huber y Stetter (1991)
<i>Metallosphaera prunae</i>		Hierro* y azufre	75°C	Fuchs y col. (1995)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>		Azufre	80-85°C	Brock y col. (1972); Grogan (1989)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		Azufre	80-85°C	Brock y col. (1972); Grogan (1989)
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>		Hierro	23-46°C	Baumler y col. (2005); Dopson y col. (2004)
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Euryarchaeota	Hierro	15-45°C	Golyshina y col. (2000)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>		Azufre	45-62°C	Darland y col. (1970); Ruepp y col. (2000)

RISCs: Reduced inorganic sulfur compounds. (\*) Solo oxidador de hierro. (\*\*) Solo reduce el hierro.

*Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferridurans*, *Acidithiobacillus ferriphilus* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Todas estas bacterias son Gram-negativas, acidófilas, quimiolitautótrofas obligadas, capaces de oxidar sulfuros metálicos, mientras que las tres últimas poseen además la capacidad de oxidar y reducir el hierro (Espejo y Romero 1997; Kelly y Wood, 2000; Hallberg y col., 2010). Además, ha sido descrito que desarrollan biopelículas sobre sustratos energéticos sólidos, lo cual favorece la catálisis microbiana (Rawlings, 2005; Sand y Gehrke 2006).

La adherencia de los microorganismos a la superficie mineral ocurre mediante la formación extracelular de una matriz adhesiva y protectora llamada **biopelícula**, compuesta principalmente por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) generadas por las mismas células procariotas (Gehrke y col., 1998; Vu y col., 2009). Las SPE representan de un 50 a 90% de la materia orgánica total de la biopelícula, y forman una estructura tridimensional con canales acuosos que permiten el transporte de nutrientes y la exportación de sustancias de desecho (Prigent-Combaret y col., 1999; Davey y O'Toole, 2000; Cramton y Gotz, 2004).

Las SPE permiten el contacto entre la célula y la superficie del mineral, cumpliendo un rol importante en la formación de biopelículas mediante las interacciones célula-sustrato (Gehrke y col., 1998). Dentro de las funciones de las SPE, hay al menos dos que son importantes para favorecer el proceso biolixiviador; i) permiten concentrar iones  $\text{Fe}^{3+}$  facilitando las interacciones electrostáticas entre las células cargadas positivamente y el mineral cargado negativamente y el ataque oxidativo contra los sulfuros del mineral y ii) son responsables de la adherencia de la célula a la superficie mineral, lo que favorece espacialmente la oxidación de los sulfuros metálicos. De acuerdo a este último punto, un estudio en *Sulfolobus metallicus* reveló que la tasa de biolixiviación por parte de las células adheridas al mineral es el doble que la alcanzada por las células planctónicas (Gautier y col., 2008). Todo esto realza la disolución de sulfuros metálicos, lo que resulta en una aceleración del proceso biolixivante de 20 a 100 veces sobre el proceso de lixiviación química (Sand y Gehrke, 2006).

En una biopelícula, cada microorganismo ocupa un microambiente específico, donde el establecimiento de gradientes químicos puede conducir a la diversidad fisiológica de la comunidad microbiana. Efectivamente, la estructura de la biopelícula es fuertemente influenciada por la distribución del oxígeno y el transporte de nutrientes en su interior (Costerton y col., 1995; Prigent-Combaret y col., 1999; Davey y O'Toole, 2000; Watnick y Kolter, 2000). Por otro lado, el asentamiento de comunidades microbianas mixtas sobre la superficie del mineral -donde las células están conectadas físicamente entre sí- favorece las interacciones sociales entre ellas. Estas interacciones incluyen la competencia y la cooperación entre las células procariontas que conforman la biopelícula (Costerton y col., 1995).

Todo lo anterior hace evidente que la formación de biopelículas es un proceso complejo que puede ser regulado en diferentes niveles a través de diversos mecanismos moleculares. Esta regulación puede ser altamente específica dependiendo del nicho ecológico en el cual se desarrolla (Johnson y col., 2005).

Uno de los factores que influyen en la formación y desarrollo de una biopelícula es la densidad de la población microbiana. Dependiendo de esta última, los microorganismos pueden modular varios fenotipos, entre ellos su capacidad de adherirse, crecer y colonizar una superficie, desarrollando como resultado la formación de una biopelícula (Davies y col., 1998; Ray and Visick, 2012). Los microorganismos son capaces de censar la densidad de la población microbiana a través de un sistema de señalización mediado por moléculas que difunden al espacio extracelular (Salmond y col., 1995; McLean y col., 1997; Parsek y Greenberg, 2000). Un primer estudio en *Vibrio fischeri* demostró que el fenotipo de bioluminiscencia es causado por la síntesis de una enzima llamada luciferasa, la cual es regulada a nivel transcripcional por un fenómeno de "autoinducción" (Nealson y col., 1970). Otros estudios en esta bacteria indican que este fenómeno de autoinducción es mediado por moléculas de acil homoserina lactona que difunden al espacio extracelular y actúan como señal, permitiendo a la célula bacteriana censar la densidad celular y modular fenotipos como la bioluminiscencia (Blunt y col., 1997). Este sistema de señalización

dependiente de la densidad de la población microbiana es llamado “Quorum Sensing” (QS) (Whitehead y col., 2001). Estudios en *Pseudomonas aeruginosa* han demostrado que el proceso de formación del biopelículas está regulado por QS (Davies y col., 1998; De Kievit y Iglewski, 1999).

## 2.1 QUORUM SENSING

El QS es un sistema de comunicación bacteriana que permite la señalización célula-célula mediante una molécula difusible autoinductora (AI) permitiendo la regulación de diferentes procesos celulares que son dependientes de la densidad de la población microbiana (Miller y Bassler, 2001). Esta comunicación química implica por un lado la producción y liberación de AI, y por otro lado la detección y la generación de una respuesta al AI (Waters y Bassler, 2005). En base a esto, esta comunicación permite que la bacteria detecte cambios en la densidad de la población, lo cual puede generar variaciones en la concentración de nutrientes, oxígeno, moléculas inorgánicas (ej: iones  $\text{Fe}^{2+}$ , fosfato), pH y osmolaridad en el medio extracelular (O’Toole y Kolter, 1998; Karatan y Watnick, 2009). De esta forma, un aumento en la población bacteriana provoca la acumulación de la molécula AI en el medio, lo cual al ser detectado por la bacteria genera cambios en la expresión de varios genes blanco con el objetivo de regular a su favor fenotipos como adherencia, virulencia y bioluminiscencia entre otros (Engebrecht y Silverman, 1984; Winson y col., 1995; Winzer y Williams, 2001; Ray and Visick, 2012). Usualmente, los procesos que son regulados por el sistema QS son beneficiosos para el conjunto bacteriano. Un ejemplo de esto ocurre al invadir a un hospedero exitosamente; una sola bacteria que expresa sus genes de virulencia podría ser detectada y eliminada por la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, un ataque coordinado por una población bacteriana puede agobiar al hospedero antes de que pueda defenderse (Winzer y Williams, 2001).

Este sistema de comunicación bacteriana se encuentra presente tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, las cuales utilizan señales de autoinducción de

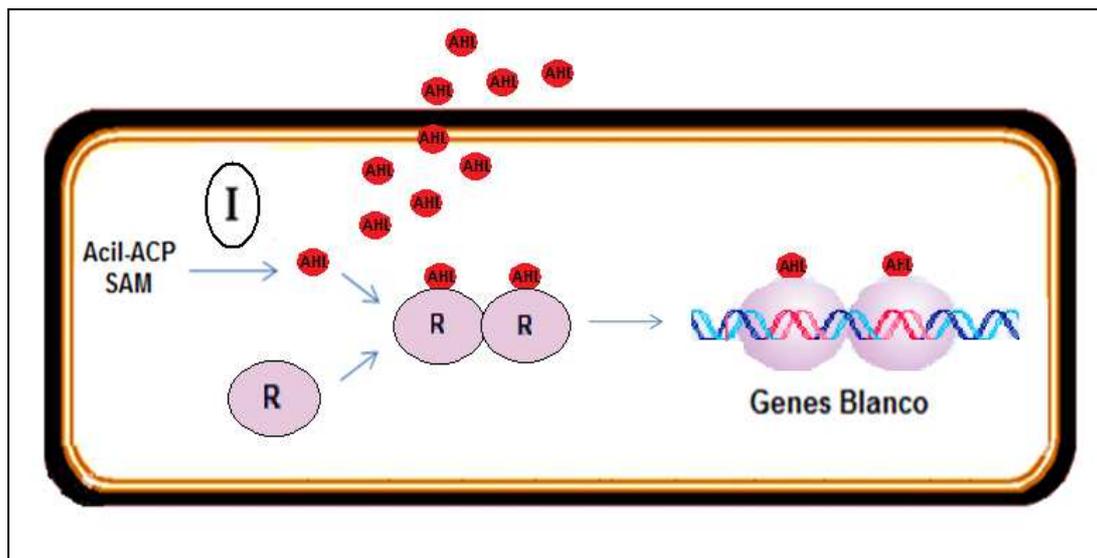
distinta naturaleza, lo que permite clasificar los sistemas QS descritos en diferentes grupos (Waters y Bassler, 2005; Valenzuela y col., 2007; Frederix and Downie, 2011).

En bacterias Gram-negativas, el sistema más estudiado involucra moléculas AI del tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) o autoinductor-1 (AI-1). Este sistema QS está involucrado en comunicaciones intra-especies e inter-especies (Whitehead y col., 2001). Fue descrito por primera vez en la bacteria marina bioluminiscente *Vibrio fischeri* (Nealson y col., 1970; Fuqua y col., 1994). Dicho sistema es considerado como el paradigma QS en bacterias Gram-negativas, el cual contempla al menos cuatro elementos: i) AHLs como molécula señal o AI-1, ii) una proteína AHL sintasa (perteneciente a la familia de proteínas I) que sintetice el AI-1, iii) un regulador transcripcional (perteneciente a la familia de proteínas R) y iv) una secuencia de ADN palindrómica activa en *cis* que sea blanco del complejo binario R-AHL (Fig. 3, Whitehead y col., 2001).

### 2.1.1 AHL sintasa I

Se conocen tres familias de proteínas que pueden sintetizar AHLs: i) la familia tipo proteínas LuxI que se encuentra en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -*Proteobacteria* (Gray y Garey, 2001), ii) las proteínas LuxM, AinS y VanM que se encuentran sólo en *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. fischeri* y *V. anguillarum*, respectivamente) (Gilson y col., 1995; Hanzelka y col., 1999; Milton y col., 2001) y iii) la proteína HdtS descrita en *Pseudomonas fluorescens* (Laue y col., 2000) y Act en *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rivas y col., 2007).

La familia de la proteína I cataliza la síntesis de AHLs desde dos sustratos: S-adenosilmetionina (SAM) y la proteína cargadora de grupos acilos (acil-ACP) (Schaefer y col., 1996; Val and Cronan, 1998; Parsek y col., 1999). Algunas proteínas I son capaces de sintetizar más de un tipo de AHLs, las cuales pueden presentar un hidrogeno, un grupo cetona o un grupo alcohol en el carbono 3 (C3) de su cadena acil (Whitehead y col., 2001; Farah y col., 2005). Además, existen variaciones en el largo de la cadena acilo de las AHLs (4 a 18 átomos de carbono) (Fig. 4, Hanzelka y Greenberg, 1996; de Kievit y col., 2000).



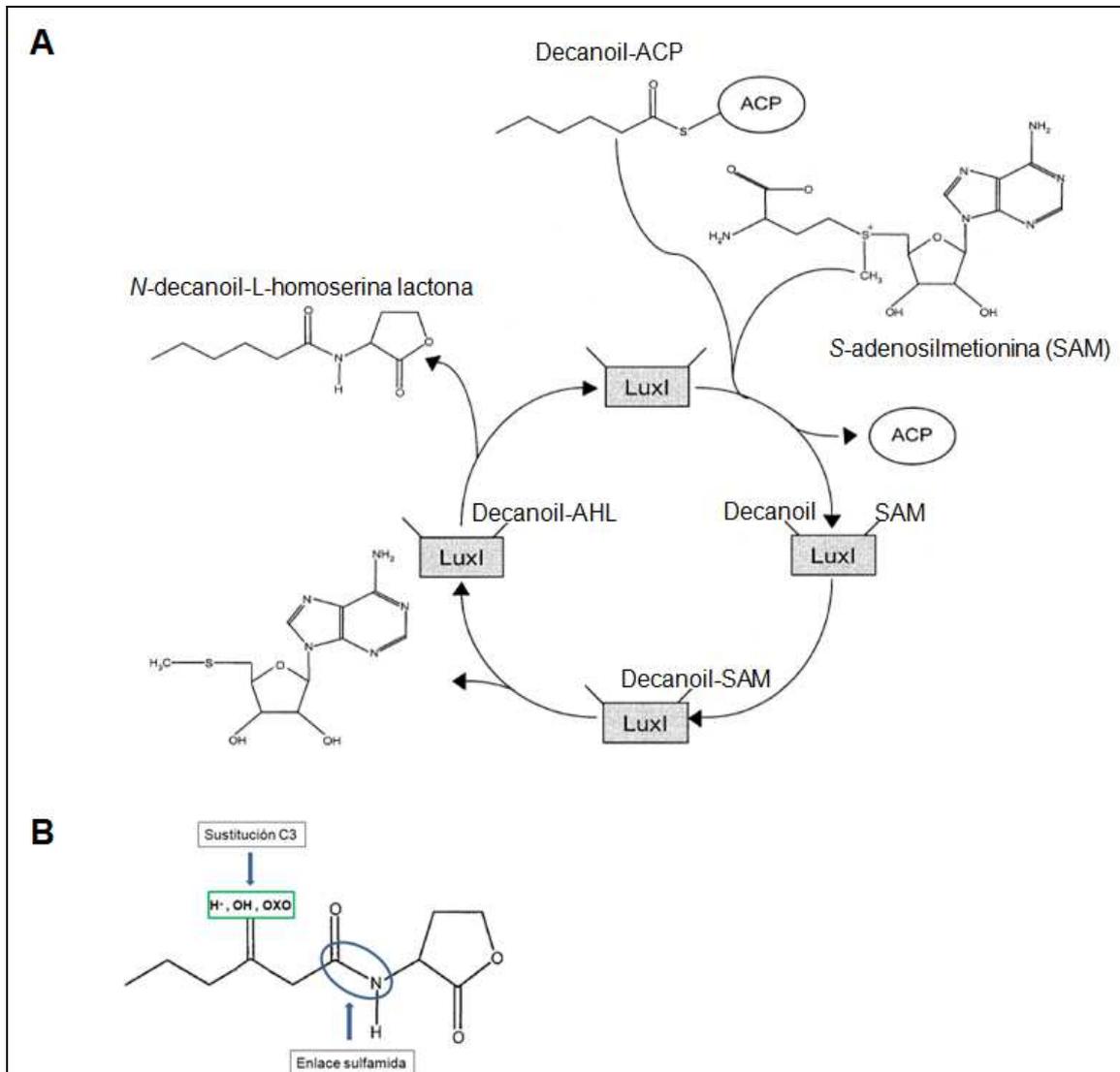
**Figura 3. Esquema del sistema de comunicación Quorum Sensing tipo AI-1.** Las AHLs son sintetizadas al interior de la bacteria por la proteína I a partir de la proteína carrier acil acilada (acil-ACP) y S-adenosil metionina (SAM). Las moléculas de AHLs difunden hacia el medio extracelular, aumentando su concentración tanto en el medio interno como externo de la célula proporcionalmente al incremento de la población celular. Al llegar a la concentración umbral de actividad biológica, las moléculas de AHLs se unen con la proteína R, que dimeriza y promueve o reprime la transcripción de genes blanco. Algunos de estos genes blanco poseen un sitio de unión para el complejo de R/AHL en su región promotora.

Estas variaciones otorgan especificidad en la comunicación celular de una especie bacteriana, debido a que esta última puede distinguir sus propias AHLs de aquellas que producen otras especies.

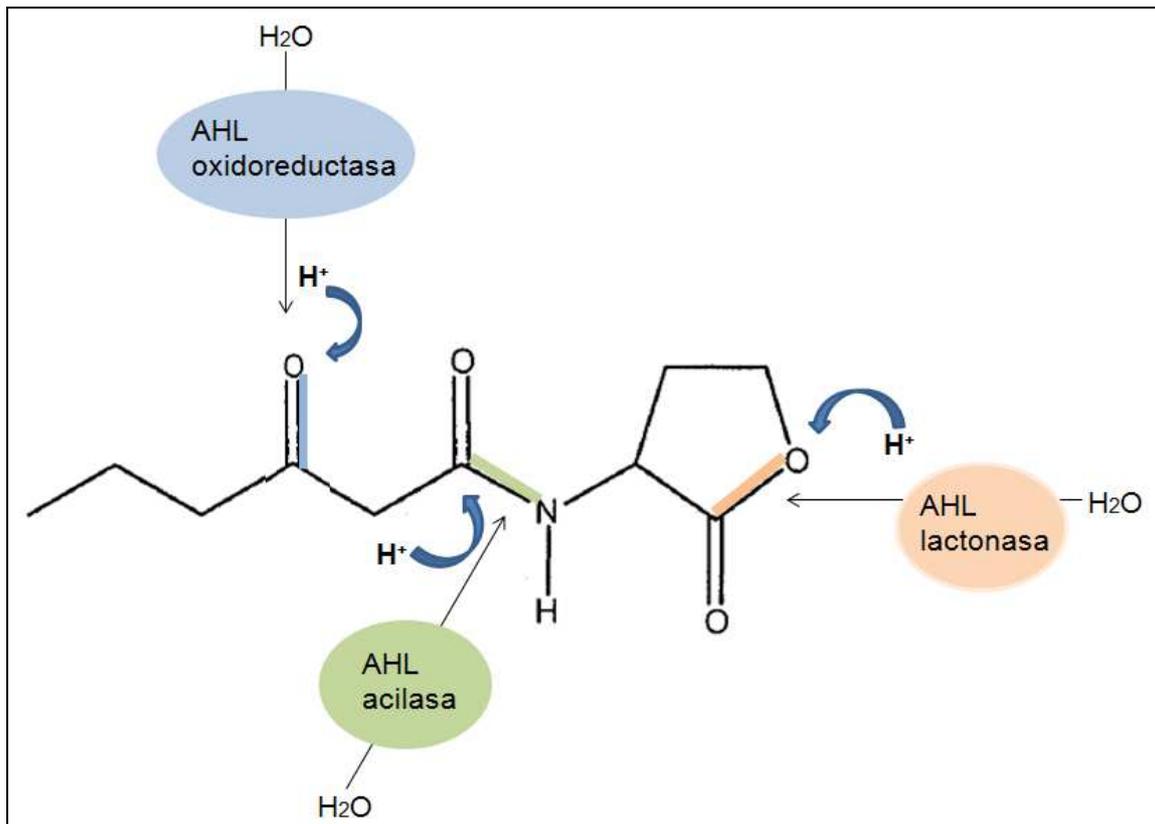
El mecanismo de acción general de las moléculas de AHLs es difundir al interior de la célula diana y unirse a un regulador transcripcional tipo R para generar su dimerización. Esto ocurre cuando la concentración de AHLs en el medio extracelular es suficiente para generar un gradiente hacia el espacio intracelular (Nilsson y col., 2001). La concentración de las moléculas de AHLs en el medio extracelular no solo depende de su síntesis, sino también de su difusión, transporte y degradación. La difusión de las moléculas de AHLs depende de su tamaño. Las AHLs de cadena acilo corta difunden libremente a través de la membrana celular (Kaplan y Greenberg, 1985), mientras que AHLs de cadena larga son excretadas mediante transportadores (Schaefer y col., 1996; Pearson y col., 1999; Chan y col., 2007). La degradación de las moléculas de AHLs ocurre por degradación enzimática: i) AHL lactonasa, provoca la hidrólisis del enlace ester del anillo de homoserina lactona (HSL) (Dong y col., 2000), ii) AHL acilasa, genera la hidrólisis del enlace amida entre la cadena de ácido graso y el anillo HSL (Sio y col., 2006) y iii) AHL oxidoreductasa, induce la hidrólisis del grupo 3-oxo (Fig. 5, Uroz y col., 2005). Además, existen factores no enzimáticos como temperaturas altas o pH alcalino que también favorecen la degradación de las AHLs.

### **2.1.2 Análogos de AHLs**

Hay estudios que han demostrado que mediante la utilización de análogos sintéticos de AHLs es posible reprimir o estimular el QS (Geske y col., 2008). Se han descrito análogos sintéticos de AHLs que presentan una serie de modificaciones químicas que favorecen una actividad supresora o activadora (Geske y col., 2007; 2008). Por otro lado, los análogos sintéticos con el enlace carboxamida sustituido por un enlace sulfamida actúan como inhibidores de QS, ya que compiten con la AHL endógena por el sitio de unión del regulador transcripcional de tipo R (Rasmussen y col., 2005; Rasmussen y Givskov, 2006).



**Figura 4. Esquema de la síntesis y de la estructura de Acil Homoserina Lactonas. A,** *S*-adenosilmetionina (SAM) y la proteína cargadora de grupos acilos (acil-ACP) son precursores de las moléculas de AHLs y sustratos de la proteína LuxI. SAM otorga la estructura de anillo de la molécula de AHL, mientras que la proteína acil-ACP transfiere los grupos acilos que se unen a la estructura de anillo mediante un enlace sulfamida (en base a Whitehead y col., 2001). **B,** estructura de una molécula de AHL. El carbono 3 (C3) de la molécula puede presentar sustituciones como hidrógeno (H<sup>+</sup>), hidroxil (OH) u OXO (rectángulo verde). El círculo azul indica la posición del enlace sulfamida.



**Figura 5. Esquema de la degradación de las moléculas de Acil Homoserina Lactonas.** La degradación de las moléculas de AHL puede ocurrir por degradación enzimática: i) AHL lactonasa, provoca la hidrólisis del enlace ester del anillo de homoserina lactona (HSL), ii) AHL acilasa, genera la hidrólisis del enlace amida entre la cadena de ácido graso y el anillo HSL y iii) AHL oxidoreductasa, induce la hidrólisis del grupo 3-oxo.

Esto provocaría una inhibición de los cambios estructurales necesarios para que el regulador tipo R dimerice generando el bloqueo de su función (Castang y col., 2004). Una molécula llamada furanona producida por el alga *Delisea pulcra* posee una estructura similar a las AHLs, siendo capaz de unirse a los receptores de éstas últimas y bloquearlos (Manefield y col., 1999; Wu y col., 2004). De esta forma, al utilizar análogos sintéticos de esta molécula ha sido posible inhibir el QS y afectar varios fenotipos regulados por este sistema de comunicación bacteriana (Hentzer y col., 2002). Otros análogos que contienen dos enlaces amida que constituyen una columna de grupos trifenilo o que presentan modificaciones en su cadena acilada debido a la introducción de grupos alquil, cicloalquil o aril en la posición C4, actúan como activadores de QS debido a que poseen una alta estabilidad -en comparación con las AHL nativas- lo que genera una actividad prolongada del regulador transcripcional tipo R (Reverchon y col., 2002; Borlee y col., 2010).

### 2.1.3 Regulador transcripcional R

La familia de proteínas tipo LuxR son reguladores transcripcionales compuestos por dos subdominios: la región amino-terminal que posee el sitio de unión de las AHLs y la región carboxilo-terminal que presenta un motivo de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice que se une a secuencias de ADN conservadas (Hanzelka y Greenberg, 1995; Whitehead y col., 2001). La interacción entre las proteínas R y AHLs promueve la dimerización y un cambio conformacional de estas proteínas. Este cambio conformacional facilita generalmente la unión de la proteína R a la secuencia blanco de ADN i) induciendo el reclutamiento de la ARN polimerasa para promover la transcripción de los genes blanco (Welch y col., 2000; Whitehead y col., 2001; Miller y Bassler, 2001) o ii) bloqueando el sitio de unión de la ARN polimerasa en la secuencia de ADN, reprimiendo la transcripción de los genes blancos (Tsai y Winans, 2010), pero puede también en algunos casos generar la disociación entre la proteína R y su secuencia de ADN blanco en presencia de AHL (Minogue y col., 2002).

#### 2.1.4 Regulón QS

Las bacterias Gram-negativas son capaces de coordinar su comportamiento en función de la densidad celular gracias al sistema de comunicación QS (Whitehead y col., 2001; Waters y Bassler, 2005). Este sistema es capaz de regular varios fenotipos, entre ellos los más estudiados son la bioluminiscencia en *V. fischeri* (Eberhard y col., 1981; Engerbrecht y Silverman, 1984), la virulencia en bacterias patógenas como *P. aeruginosa* (Schuster y col., 2003), la transferencia de ADN en la bacteria patógena de plantas *Agrobacterium tumefaciens* (Lang y Faure, 2014) y la formación de biopelículas en un gran número de microorganismos (Parsek y Greenberg, 2005). Estos fenotipos son el resultado de los cambios en la expresión de múltiples genes que son regulados directa o indirectamente por un regulador transcripcional tipo R. Este conjunto de genes u operones que son controlados por un mismo regulador transcripcional en una condición determinada se denomina regulón.

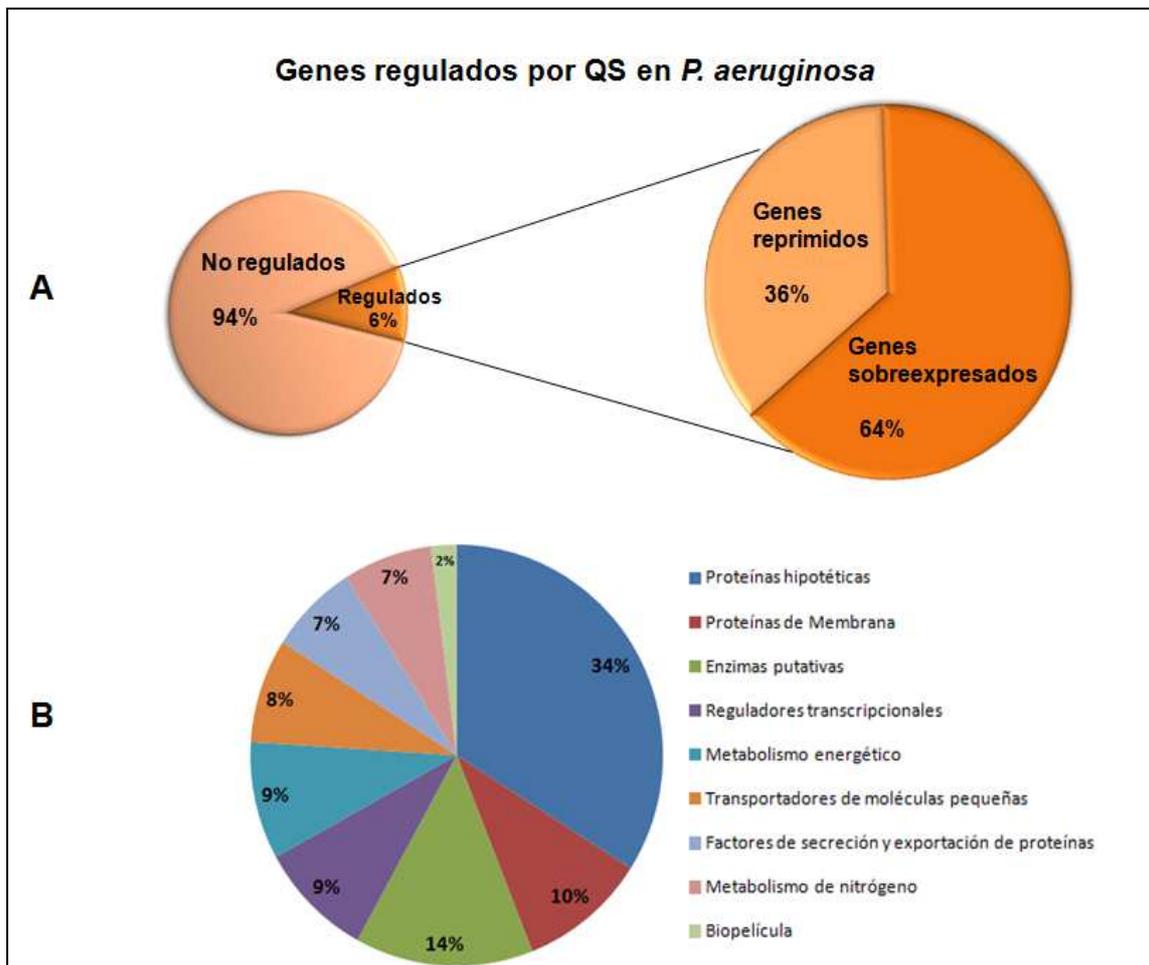
La identificación y caracterización de un regulón es posible mediante experimentos genómicos y proteómicos (Schuster y col., 2003; Dudley y col., 2006). En particular, para estudiar el regulón QS generalmente se realizan experimentos comparando una cepa silvestre con una cepa mutante en genes QS. Para ello, se utiliza un mutante para el gen que codifica la AHL sintasa en la mayoría de los estudios.

Los primeros trabajos elaborados en esta área se realizaron en la bacteria *P. aeruginosa*. Un estudio en esta bacteria analizó un conjunto de 7000 mutantes *lasI-rhlI* - incapaces de sintetizar moléculas de AHL- que presentaban la inserción, a través del transposon Tn5, del gen *lacZ* sin promotor (Whiteley y col., 1999). De esta forma, aquellos genes u operones que son regulados por QS se transcribieron junto con el gen *lacZ* en presencia de las moléculas de AHL exógenas. Se determinó que cerca de un 3 a 4% del total de los genes en esta bacteria son regulados por el sistema QS. Otro estudio en *P. aeruginosa* que caracteriza el regulón QS mediante microarreglos de ADN en mutantes deficientes en la generación de AHL endógena, sugiere que el regulón QS representa

alrededor de un 6% del total de los genes presentes en el genoma (Fig. 6, Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003).

En conclusión podemos mencionar que en *P. aeruginosa* el regulón QS corresponde aproximadamente a un 6% del total de genes de acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de microarreglos de ADN de varios trabajos de investigación (Whiteley y col., 1999; Schuster y col., 2003; Vasil, 2003; Wagner y col., 2003). Sin embargo, estos resultados varían al estudiar otros microorganismos.

En *V. fischeri* se identificaron proteínas codificadas por genes regulados por QS mediante experimentos de electroforesis bidimensional en un gel de poliacrilamida para determinar y comparar el proteoma de la cepa silvestre, un mutante para la AHL sintasa LuxI y un mutante para LuxR en distintas fases de crecimiento. Se identificaron ocho proteínas (LuxA, LuxB y LuxE [proteínas de luminiscencia], QsrP [proteína periplasmática], RibB [3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa, participa en la síntesis de riboflavina], AcfA [factor de colonización], QsrV [proteína hipotética] y QSR 7 [proteína con función desconocida]) cuya expresión es regulada por QS y corresponden al 0,2 % del proteoma total (Callahan y Dunlap, 2000; Qin y col., 2007). En el caso de *Serratia proteamaculans* al comparar una cepa mutante con una cepa silvestre y agregar análogos sintéticos de AHL, se observó un cambio en 39 proteínas tanto inducidas como reprimidas que corresponden a un 1% del proteoma (Christensen y col., 2003). Por otra parte, en *Burkholderia thailandensis* se realizaron estudios de secuenciación del transcriptoma (RNA-seq) sobre una cepa mutante para la AHL sintasa crecida con y sin análogos sintéticos de AHLs (Majerczyk y col., 2014). En este trabajo se analizó el efecto de diferentes análogos sintéticos de AHLs (C8-AHL, OH-C10-AHL y OH-C8-AHL) en dos estadios de crecimiento (fase de crecimiento en la fase estacionaria inicial [T] y la fase estacionaria [S]). Los resultados indicaron que 187 genes (3,3 %) fueron regulados por OH-C8-AHL en la fase T y 89 genes (1,6 %) en la fase S, mientras que 115 genes (2 %) fueron

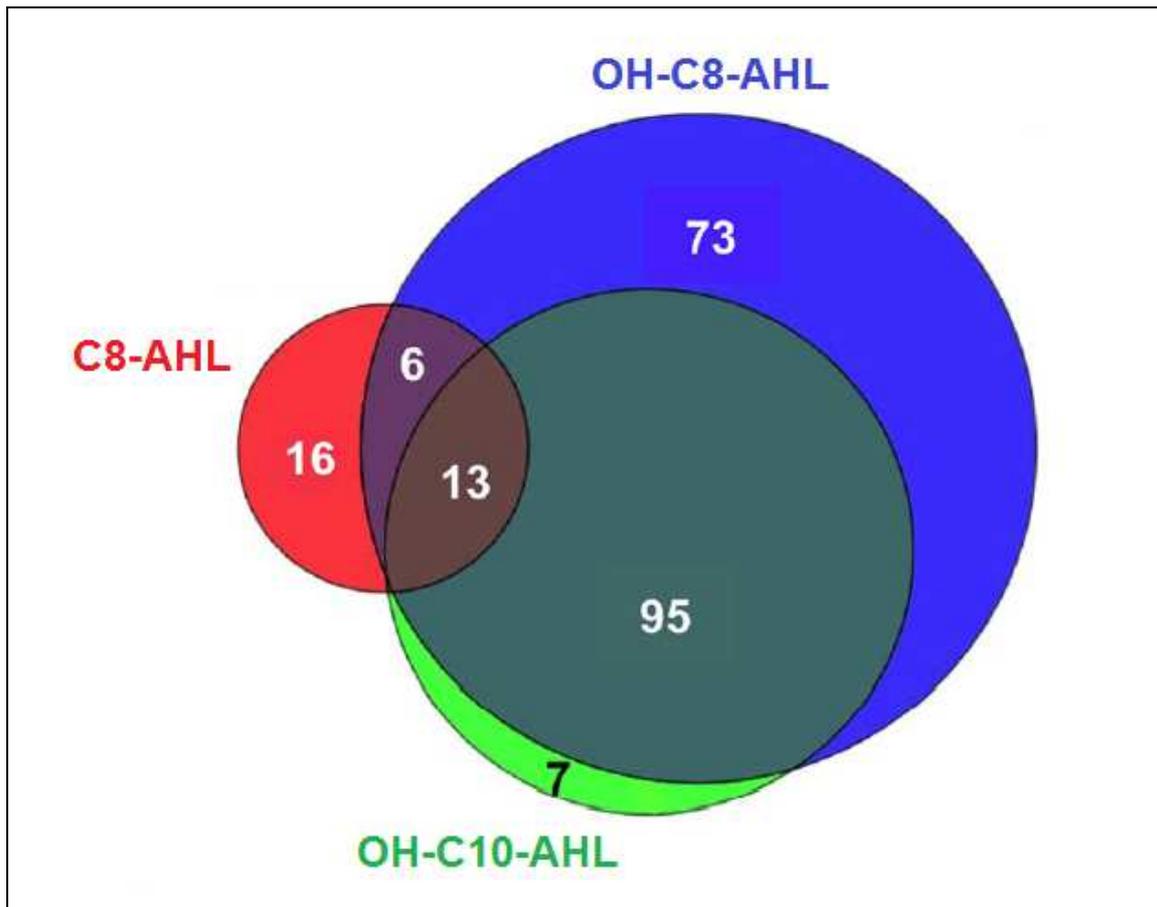


**Figura 6. Genes regulados por Quorum Sensing en *Pseudomonas aeruginosa*.** **A,** Aproximadamente un 6% de los genes de *Pseudomonas aeruginosa* son regulados por QS (regulón QS) (Schuster y col., 2003). Dentro de este 6%, existe un 36% de esos genes que son reprimidos y un 64% que son activados por el sistema QS. **B,** Clasificación de los genes regulados por QS según su función (Wagner y col., 2003).

regulados por OH-C10-AHL en la fase T y 52 genes (0,9%) en la fase S. Por otro lado, 35 genes (0,6%) fueron regulados por C8-AHL en la fase T y 97 genes (1,7%) en la fase S. Al comparar el efecto de las distintas moléculas de AHL sobre los genes regulados por QS en la fase T, los resultados revelan que sólo 13 genes son comunes en los tres regulones QS (Fig. 7). Estos estudios sugieren que la expresión o represión de genes, regulados por QS, varía de acuerdo al tipo de AHL exógeno utilizado y al estadio de crecimiento analizado (Majerczyk y col., 2014). En otras palabras, que la identificación de los genes que conforman un regulón QS depende de las condiciones experimentales (Schuster y Greenberg, 2006).

En muchos microorganismos la obtención de un mutante nulo es muy complicada o bien imposible. En estos casos, se realizan estudios utilizando una cepa silvestre donde se compara una condición control con una condición “inducida”. Esto último consiste principalmente en adicionar análogos sintéticos de AHLs en cultivos de la cepa silvestre. Para estos experimentos se requiere que los niveles endógenos de AHLs sean mínimos para que el efecto de las AHLs exógena sea detectado. Un ejemplo de esto lo describe González y col. (2013) demostrando que la molécula C14-AHL aumenta la adherencia de células de *At. ferrooxidans* sobre diferentes sustratos energéticos, como azufre y piritita, y que dicho efecto también ocurre en células silvestres de esta bacteria pertenecientes a una comunidad biominera (comunidad extraída de un reactor semi-industrial). Otro estudio fue realizado en la cepa silvestre de *S. meliloti* donde se encontró un cambio en la traducción de 100 proteínas (5% del proteoma total), tanto inducidas como reprimidas con respecto a la condición control (Chen y col., 2003).

En base a los estudios antes mencionados, podemos concluir que los porcentajes de genes y proteínas que cambian su patrón de expresión/síntesis indican que el sistema QS tiene efectos globales en la fisiología bacteriana. Sin embargo, dichos efectos son fuertemente influenciados por las condiciones de crecimiento de cada microorganismo, lo que genera una alta variabilidad en el porcentaje de genes que son regulados por QS. No obstante, al integrar los resultados obtenidos en cada estudio descrito, podemos deducir que



**Figura 7. Diagrama de Venn de la comparación de los regulones Quorum Sensing de células de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con distintas moléculas de Acil Homoserina Lactonas.** Se observa la relación entre los genes regulados por QS de células de *P. aeruginosa* tratadas con distintas moléculas de AHL (C8-AHL, OH-C8-AHL y OH-C10-AHL) durante la fase de crecimiento estacionaria inicial (T) (Majerczyk y col., 2014).

un regulón QS no debiere superar el 6% del total de un genoma determinado (Whiteley y col., 1999; Schuster y col., 2003; Vasil, 2003; Wagner y col., 2003; Majerczyk y col., 2014). Esta información es fundamental para nuevos estudios transcriptómicos y proteómicos que ayuden a identificar potenciales genes que pertenezcan al regulón QS de microorganismos menos estudiados.

### **2.1.5 QS y biopelículas**

Una biopelícula procarionte corresponde a un grupo de microorganismos donde las células se adhieren a una superficie una al lado de la otra. Estas células frecuentemente se encuentran dentro de una matriz de SPE formada por las mismas células. Las SPE están compuestas por un conglomerado polimérico generalmente formado por ADN extracelular, proteínas y polisacáridos (Lear y Lewis, 2012). Estas SPE en conjunto desarrollan una estructura con pequeños canales acuosos que facilitan la comunicación entre las células y el transporte de nutrientes y desechos. Esto último favorece la formación de biopelículas, las cuales se pueden desarrollar sobre superficies vivas, como un tejido celular (Hall-Stoodley y col., 2004), o no vivas como la superficie de un mineral (Gehrke y col., 1998).

Las biopelículas acumulan metabolitos secundarios y otros factores microbianos excretados, dentro de los cuales son de particular interés las moléculas de comunicación intercelular o moléculas de QS (Parsek y Greenberg, 2005). Por esta razón, las biopelículas representan un contexto ambiental relevante para el sistema QS, ya que facilita físicamente la comunicación entre las células. El sistema QS al ser un mecanismo de comunicación célula a célula, utiliza señales autoinductoras que son captadas por los microorganismos y que permiten a éstos regular procesos celulares dependientes de la densidad celular. Una vez alcanzada cierta concentración umbral, la señal autoinductora gatilla la expresión de diferentes genes blancos (Fuqua y col., 1994), regulando de esta forma fenotipos como el desarrollo de una biopelícula.

La densidad celular juega un rol muy importante en el desarrollo de una biopelícula, puesto que ésta es mayor en una biopelícula que en un cultivo líquido. De acuerdo a esto, cuando los microorganismos censan cambios en el pH, la temperatura, concentración de nutrientes, moléculas inorgánicas u oxígeno (O'Toole y Kolter 1998; Aparna y Yadav 2008; Karatan y Watnick 2009) como consecuencia de una variación en la densidad celular tienden a adherirse a una superficie, se multiplican generando una monocapa celular que crece y forma una microcolonia. Estas microcolonias se comunican a través del sistema de señalización QS para proliferar hasta formar una biopelícula (Costerton y col., 1999). Para algunos microorganismos el sistema QS es de gran importancia en la construcción y/o disolución de las comunidades en una biopelícula (Parsek y Greenberg, 2005).

Existen evidencias que relacionan la formación de biopelículas con QS y su señal AI en bacterias Gram-negativas. En *P. aeruginosa* se ha descrito que posee dos sistemas de comunicación celular tipo QS: el sistema *lasR-lasI* y el sistema *rhlR-rhlI*. El primer sistema posee el gen *lasI* que codifica para una proteína I encargada de la síntesis de *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (oxo-C12-AHL) y el gen *lasR* que codifica para un regulador transcripcional que requiere de un nivel suficiente de oxo-C12-AHL para activar genes de virulencia, el gen *lasI* y el sistema *rhlR-rhlI*. Similarmente, el segundo sistema posee el gen *rhlI* que también codifica para una proteína AHL-sintasa (*N*-butyryl-L-homoserina lactona) y el gen *rhlR* que codifica para un regulador transcripcional (Gambello y col., 1991; Latifi y col., 1995). Experimentos de formación de biopelículas en la cepa silvestre y una doble mutante para ambas AHL-sintetasas (*lasI* y *rhlI*) de esta bacteria indicaron que la biopelícula desarrollada por el doble mutante era muy delgada y correspondía al 20% del grosor de la biopelícula desarrollada por la cepa silvestre. Esto demuestra que la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* depende principalmente de los dos sistemas de comunicación celular que posee. (Davies y col., 1998; Parsek and Greenberg 2000; Asahi y col., 2010).

Otras evidencias que relacionan el sistema QS y su señal AI con la formación de biopelículas son descritas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Algunas bacterias Gram-negativas que utilizan el sistema Quorum Sensing en la regulación de la formación de biopelículas (Lear y Lewis, 2012).

Especies	Autoinductor QS	Efecto generado sobre la biopelícula	Referencia
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AHL	Efecto positivo en la maduración	Lynch y col. (2002)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	AHL	Efecto positivo en la adherencia a superficie	González (2013)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	AHL	Efecto positivo en la maduración	Huber (2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AHL	Efecto positivo en la maduración	Davies y col. (1998)
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	AHL	Efecto negativo en la producción de la matriz	Zhang y Pierson (2001)
<i>Pantoea stewartii</i>	AHL	Efecto positivo en la adherencia a superficie Efecto negativo en la formación de flóculos	von Bodman y col. (1998); koutsoudis y col. (2006)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	AHL	Efecto negativo en la formación de flóculos	Puskas y col. (1997)
<i>Serratia marcescens</i>	AHL	Efecto positivo en la maduración	Rice y col. (2005)
<i>Serratia liquefaciens</i>	AHL	Efecto positivo en la maduración	Labbate y col. (2004)
<i>Vibrio anguillarum</i>	AHL	Efecto positivo en la adherencia	Croxatto y col. (2002)
<i>Vibrio cholerae</i>	AHL	Efecto negativo en la producción de matriz Efecto positivo en la dispersión	Karatan y Watnick (2009)
<i>Vibrio fischeri</i>	AHL	Efecto positivo en la formación	Ray y Visick (2012)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	AHL	Efecto negativo en la formación de flóculos	Atkinson y col. (1999)
<i>Escherichia coli</i>	AI-2	Efecto positivo en la maduración	Li y col. (2007)
<i>Haemophilus influenzae</i>	AI-2	Efecto negativo en la formación	Daines y col. (2005)
<i>Salmonella enterica</i>	AI-2	Efecto positivo en la formación	Prouty y col. (2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PQS	Efecto positivo en la arquitectura	Diggle (2003)

AHL: Acil homoserine lactona. PQS: Señal quinolona de *Pseudomonas aeruginosa* (2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolona). AI2: Autoinductor 2.

## 2.2 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

### 2.2.1 Características principales de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica, Gram-negativa, perteneciente a la clase *Acidithiobacillia* dentro de *Proteobacteria* (Williams y Kelly, 2013). Crece óptimamente a 30°C en ambientes naturales asociados a minerales como la pirita, depósitos de carbono y drenajes acidificados (Gonzalez-Toril y col., 2003). Sus condiciones ambientales son extremas en comparación con la mayoría de los microorganismos, encontrándose a pH muy ácidos (1,3 a 4,5, siendo 2,5 su óptimo). Para su desarrollo en condiciones aeróbicas utiliza la energía obtenida de la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y de los compuestos inorgánicos reducidos de azufre que se encuentran en los minerales (Temple y Colmer, 1951). Además, es capaz de fijar nitrógeno desde la atmósfera (Mackintosh, 1977) y de crecer anaeróbicamente reduciendo  $\text{Fe}^{3+}$  o azufre.

Esta bacteria es un importante miembro dentro del consorcio microbiano utilizado para la recuperación de cobre mediante procesos como la biolixiviación (Rawlings y col., 2002). Este proceso ocurre a través de la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por parte de *At. ferrooxidans*. Los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  provocan una oxidación química del Cu(I) a Cu(II) generando su reducción a iones de  $\text{Fe}^{2+}$  para volver a iniciar el ciclo. *At. ferrooxidans* es capaz de generar la remoción de electrones desde el sustrato sólido directamente a nivel de su membrana celular externa (Yarzabal y col., 2002) o abióticamente a través de iones de  $\text{Fe}^{3+}$  presentes en sus SPE. En la vía de oxidación de iones de  $\text{Fe}^{2+}$  el flujo de electrones ingresa por el citocromo *c* Cyc2 localizado en la membrana externa, rusticianina y la vía del citocromo *c* Cyc1 para reducir el oxígeno mediante la oxidasa *aa<sub>3</sub>* o vía el citocromo CycA1 para reducir  $\text{NAD}^+$  mediante el complejo *bc<sub>1</sub>*/quinonas/complejo NADH deshidrogenasa (Appia-Ayme y col., 1999; Bruscella y col., 2007; Quatrini y col., 2009). Otra propiedad de *At. ferrooxidans* es su habilidad para oxidar aeróbicamente compuestos inorgánicos reducidos de azufre como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Estudios bioinformáticos y transcriptómicos han descrito un conjunto de quinonas oxidoreductasa involucradas en la oxidación de estos compuestos inorgánicos reducidos de azufre en *At. ferrooxidans*

(Quatrini y col., 2006; 2009; Valdés y col., 2008). Básicamente, la oxidación de estos compuestos inorgánicos reducidos de azufre involucra varias enzimas, complejos enzimáticos y transportadores de electrones que se encuentran en distintos compartimentos de la célula. Primero, el azufre insoluble es convertido en sulfano sulfato que luego es transferido a una heterodisulfuro reductasa a través de una cascada de enzimas azufre transferasas (DsrE, TusA y Rhd). Por otro lado, los electrones que provienen de la oxidación de sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ), tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) y sulfano sulfato (GSSH) son transferidos mediante quinonas directamente a las oxidasas *bd* o *bo*<sub>3</sub>, o indirectamente a través del complejo *bc*<sub>1</sub> y un citocromo *c* (CycA2) o una proteína de alto potencial de hierro-azufre (HiPIP) hacia la oxidasa *aa*<sub>3</sub> donde ocurre la reducción de  $\text{O}_2$ . Los electrones también pueden ser directamente transferidos hacia el complejo I NADH deshidrogenasa (NDH1) para generar poder reductor (Quatrini y col., 2009). Este metabolismo lleva a *At. ferrooxidans* a ser un actor biológico muy relevante en los ciclos biogeoquímicos de hierro y azufre en el ambiente.

### 2.2.2 Biopelículas de *At. ferrooxidans*

*At. ferrooxidans*, al igual que gran parte de las bacterias biomineras, es capaz de adherirse sobre superficies naturales de distintos minerales (Arkesteyn, 1979; Pradhan y col., 2008) o sobre superficies artificiales como resinas hidrofóbicas o de intercambio de iones (Koseoglu-Imer y Keskinler, 2013). Además, *At. ferrooxidans* forma biopelículas en monocapas, lo cual es característico en esta bacteria (Harneit y col., 2006a; González y col., 2013). Esta biopelícula ocurre en una serie de pasos bien organizados: i) primero se genera la adherencia de la bacteria sobre la superficie, seguido de la multiplicación celular, ii) segundo, la formación de microcolonias que secretan SPE son capaces de organizarse para formar una comunidad y iii) tercero, algunas células abandonan la microcolonia y se adhieren en otra superficie no colonizada (Harneit y col., 2006b; Flemming y Wingender, 2010). La adherencia de esta bacteria depende de la presencia de una matriz adhesiva

compuesta por SPE que presentan una estructura basada en polisacáridos, ácido urónico y lípidos (Gehrke y col., 2001).

*At. ferrooxidans* es capaz de adaptar la composición de sus SPE según el sustrato y fuente de energía al que se adhiere, por lo que se ha propuesto que su modo de adherencia debe ser diferente para las células que oxidan compuestos inorgánicos reducidos de azufre o para aquellas que oxidan hierro (Gerhke y col., 2001; Harneit y col., 2006b). La célula bacteriana debe ser capaz de sentir la superficie del mineral y gatillar la expresión de genes diferentes de acuerdo a la composición del sustrato mineral y a las condiciones de crecimiento -pH y temperatura principalmente- en las que se encuentre (Gerhke y col., 2001). En base a esto, la estructura química de las SPE varía según el sustrato al cual se adhiere la bacteria. Algunas especies del género *Acidithiobacillus* crecidas con azufre presentan un alto porcentaje de lípidos (53,8%) en sus SPE en comparación con aquellas crecidas con sulfato ferroso (36,9%). La composición de los polisacáridos de las SPE también cambia de acuerdo al sustrato, presentando una mayor variabilidad de sacáridos (ramnosa, fucosa, xilosa, mannosa, glucosa y ácido glucurónico) en células crecidas con sulfato ferroso que aquellas crecidas con azufre (glucosa y ácido glucurónico) (Gehrke y col., 2001).

Las SPE de *At. ferrooxidans* median el contacto entre la bacteria y el mineral, lo cual es de gran importancia en la interacción bacteria-sustrato y la formación de biopelículas (Gerhke y col., 1998; Sand y Gerhke, 2006). Vera y col., (2009) describieron que el perfil de expresión de genes entre células planctónicas y sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> crecidas con pirita e incubadas por 4 días es diferente, indicando principalmente que en células sésiles se expresan los genes relacionados con la vía de oxidación del azufre, mientras que en células planctónicas se expresan los genes involucrados en la oxidación de Fe<sup>2+</sup>. Otro trabajo del mismo autor mediante estudios del proteoma de células sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> durante la formación temprana de biopelículas sobre pirita (1 día de incubación) sugiere que ocurre una serie de adaptaciones moleculares que involucran la función de transportadores de membrana externa (transportadores ABC) y bombas de expulsión, biosíntesis de SPE, lipoproteínas, cofactores, coenzimas, proteínas involucradas en la respuesta a estrés,

sensoras de osmolaridad y relacionadas con el metabolismo de glutatión principalmente. Estas adaptaciones favorecen la formación de biopelículas en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Vera y col., 2013). La comparación de ambos trabajos sugiere que el patrón de expresión de genes en células sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> entre los días 1 y 4 es diferente, posiblemente debido a la evolución de la biopelícula.

Las SPE además de beneficiar la unión de la célula a la superficie del sulfuro metálico permiten concentrar los iones de Fe<sup>3+</sup> mediante la formación de complejos con ácidos urónicos u otros residuos, facilitando el ataque oxidativo sobre el sulfuro (Sand y Gehrke, 2006). Por otra parte, la disponibilidad de iones de hierro disueltos durante el proceso de biolixiviación es un factor importante para el desarrollo de ciertos tipos de exopolisacáridos (EPS) (Gerhke y col., 2001). Gerhke y col., (2001) sugirieron que la regulación de la síntesis y composición de SPE en *At. ferrooxidans* puede ser controlada por un sistema sensor de iones de hierro. Por otro lado, Barreto y col., (2005) describieron la presencia funcional de un operón *gal* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> que se expresa más en células que tienen como sustrato energético el hierro en relación con aquellas que tienen azufre. Por ello, estos autores especularon que la expresión diferencial de los genes del operón *gal* refleja la necesidad de diferentes mecanismos de adherencia.

En base a lo anterior, podemos concluir que la formación de biopelículas en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se basa en la síntesis y estructura de las SPE que dependen de la composición del sustrato donde se adhiere la bacteria. Esto nos sugiere que de acuerdo a la composición del sustrato la célula es capaz de expresar determinados genes que favorezcan su adherencia.

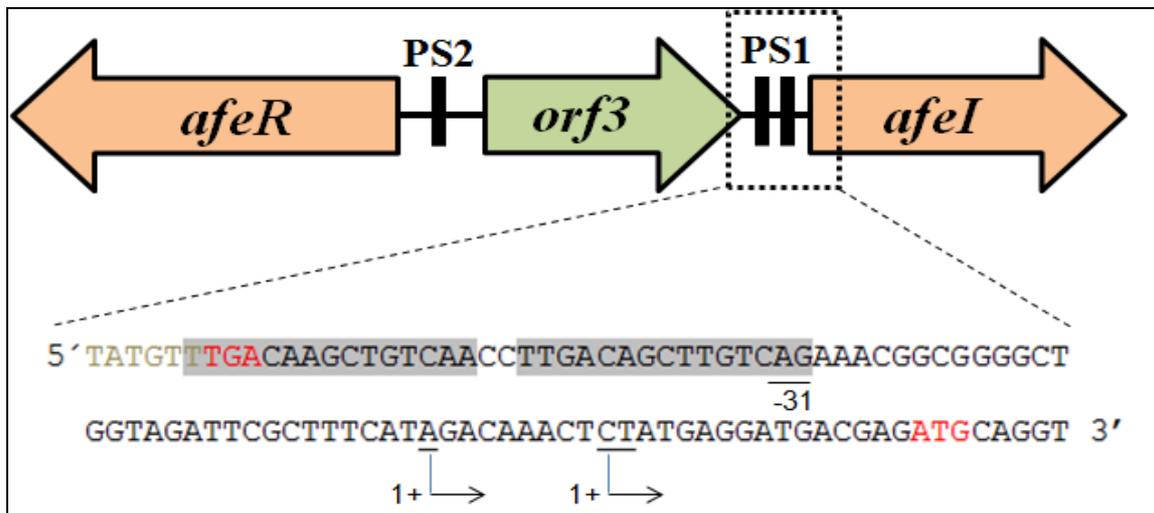
### 2.2.3 *At. ferrooxidans* y QS

Se ha descrito que la cepa tipo ATCC 23270<sup>T</sup> de *At. ferrooxidans* presenta un sistema de comunicación QS tipo AI-1 funcional (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). El locus genético QS de esta cepa se encuentra conformado por los genes *afeI*, *orf3* y *afeR* que codifican para una AHL sintasa AfeI, una proteína de función desconocida Orf3 y un

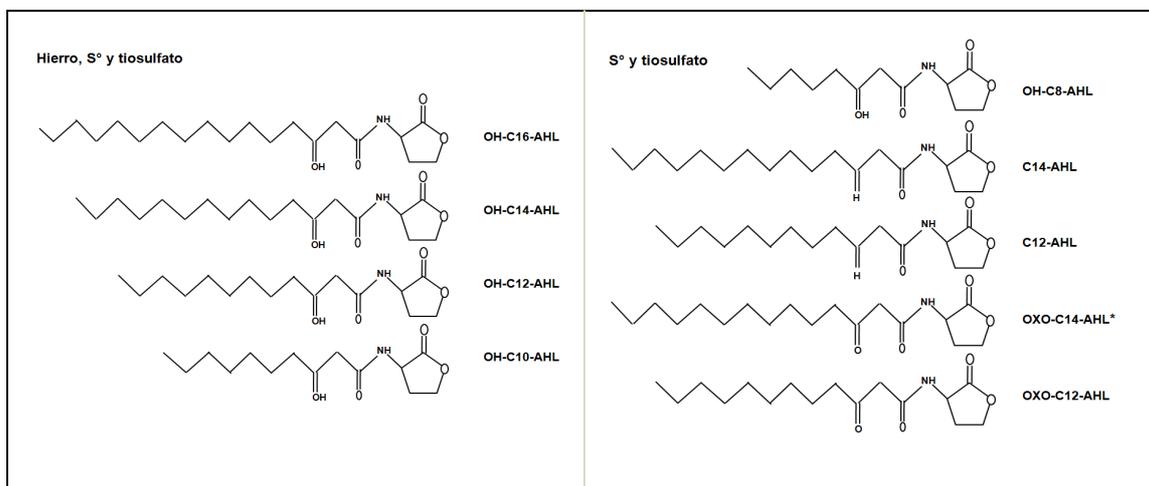
regulador transcripcional AfeR, respectivamente (Farah y col., 2005). Los genes *afeI* y *afeR* son divergentes, mientras que el gen *orf3* se encuentra entre *afeI* y *afeR* (Fig. 8).

*At. ferrooxidans*<sup>T</sup> es capaz de producir nueve tipos de AHLs con cadenas acilo cuyo largo oscila entre 8 y 16 carbonos que poseen sustituciones del tipo oxo e hidroxilo en el C3 (Fig. 9, Farah y col., 2005). La presencia de AHLs con sustitución de tipo hidroxilo -excepto OH-C8-AHL- es independiente del medio de cultivo, mientras que aquellas AHLs sin sustitución o que presentan una sustitución del tipo oxo sólo se encuentran en células crecidas en medios con azufre o tiosulfato. Se ha descrito que AfeI es capaz de sintetizar a lo menos siete (OH-C8-AHL, OH-C10-AHL, OH-C12-AHL, OH-C14-AHL, C12-AHL y C14-AHL) de los nueve tipos de AHL que sintetiza *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en *Escherichia coli*. Además, la transcripción del gen *afeI* es mayor en las células crecidas en azufre y tiosulfato que en células cultivadas en hierro (Farah y col., 2005). Por otro lado, Rivas y col., (2007) describieron una segunda sintetasa de AHLs codificada por el gen *act* que se sobre-expresa cuando *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> es crecida en medio de cultivo con hierro comparado con azufre. Estos autores proponen que dos sintetasas de AHL presentes en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> responden a señales ambientales diferentes, lo que puede estar relacionado con la capacidad que posee esta bacteria de unirse a minerales diferentes que contienen tanto azufre como hierro.

Puesto que el sistema de comunicación QS mediado por AHLs está presente en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, y que la adherencia de esta última depende de la producción de SPE, se ha sugerido que el sistema QS podría regular la formación de SPE y adherencia de esta bacteria a sustratos sólidos, y por ende ser muy relevante para controlar el proceso de formación de biopelículas (Farah y col., 2005; Valenzuela y col., 2007; Ruiz y col., 2008). Ruiz y col., (2008) han descrito que la utilización de análogos sintéticos de AHLs en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> han permitido modular la adherencia a pirita de esta bacteria, postulando que un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en el control y regulación de la formación de biopelículas podría ser de gran importancia para el control del proceso de biolixiviación en la industria biominera.



**Figura 8.** Esquema del locus genético Quorum Sensing de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>. El locus genético QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> está compuesto por tres genes: *afeI*, codifica una AHL sintetasa, *orf3*, codifica una proteína de función desconocida y *afeR* que codifica un regulador transcripcional y se encuentra en orientación divergente con respecto a los otros dos genes. Río arriba del gen *afeI* y del gen *afeR* existen dos secuencias palindrómicas (PS1 y PS2) diferentes. PS1 está formada por dos secuencias palindrómicas (11 a 15 pb) denominadas “cajas *afe*” (secuencias en gris), mientras que PS2 está compuesta por al menos dos secuencias palindrómicas (6 a 10 pb) diferentes (Farah y col., 2005). En rojo se indica el inicio de la traducción del gen *afeI* (ATG) y el término del gen *orf3* (TGA). En la posición (1+) se indican los dos sitios de inicio de la transcripción de *afeI*.



**Figura 9.** Acil Homoserina Lactonas producidas por *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>. Nueve tipos de AHLs con sustitución oxo e hidroxilo en el C3 producidas por *A. ferrooxidans*<sup>T</sup> de acuerdo a su medio de cultivo (Farah y col., 2005). (\*) indica que sólo se encontraron trazas de esta molécula de AHL en esos medios de cultivo.

### 2.3 Propuesta de esta tesis de investigación

En numerosas bacterias Gram-negativas el sistema QS regula la formación de biopelículas. Por otro lado, existe un sistema QS funcional en la bacteria *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> perteneciente al consorcio biominero (Farah y col., 2005; Valenzuela y col., 2006; 2007). Este sistema QS involucra la participación de la AHL sintasa AfeI y el regulador transcripcional AfeR capaz de unirse a AHLs, lo cual sugiere la existencia de un regulón QS, tal como ocurre en otras bacterias Gram-negativas (Eberhard y col., 1981; Engebrecht and Silverman, 1984; Beck von Bodman and Farrand, 1995; Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003). Además, la adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre sustrato mineral puede ser modulada por análogos sintéticos de AHLs, lo que relaciona estrechamente el QS y la formación de biopelículas (Ruiz y col., 2008; González, 2010; González y col., 2013). Sin embargo, hasta la fecha de inicio de esta tesis, a excepción de *afeI* (Rivas y col., 2005), no se conocían los genes regulados por QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.

Por eso de acuerdo a todos estos antecedentes, es fundamental entonces identificar los genes que son regulados por QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, y en particular establecer si algunos de estos genes están relacionados con la formación de biopelículas. En otras palabras, nos propusimos intentar contestar la siguiente interrogante ¿Cuáles son los genes regulados por QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>?

Para responder la pregunta anterior, nos propusimos identificar el regulón QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> mediante el análisis de la expresión global de los genes (estudios transcriptómicos) utilizando la tecnología de microarreglos de ADN (Quatrini y col., 2006; Appia-Ayme y col., 2006; Quatrini y col., 2009; Vera y col., 2009) en presencia y ausencia de análogos sintéticos de AHLs como moduladores del sistema QS (González y col., 2013).

En búsqueda de responder nuestra interrogante mediante otra estrategia experimental, nos propusimos construir un mutante nulo *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> por ingeniería genética. Es conocido que en este tipo de bacterias extremófilas la frecuencia de obtención de mutantes es muy baja, ya que presentan gran dificultad en la integración de material

genético exógeno en comparación con otras bacterias. Sin embargo, el laboratorio de la Dra. Bonnefoy ha logrado la obtención de un mutante de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Liu y col., 2001). Además, recientemente utilizando la misma estrategia experimental desarrollada por el laboratorio de la Dra. Bonnefoy se obtuvieron mutantes de *At. caldus* (Kotze y col., 2006; van Zyl y col., 2008), lo que incentivó nuestra idea de construir un mutante nulo *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. Con estos antecedentes nos planteamos realizar la construcción de un mutante de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para el gen *afeI*, ya que es el responsable de la síntesis de al menos siete de las AHLs endógenas presentes en esta bacteria. De esta forma, provocaríamos la inhibición del sistema QS por métodos genéticos, lo cual permitiría caracterizar el regulón QS al comparar el transcriptoma del mutante con el de la cepa silvestre a través de ensayos de microarreglos de ADN.

Por último, nos propusimos realizar experimentos que permitan la sobre expresión, obtención y purificación del regulador transcripcional AfeR para determinar a través de ensayos de cambio de movilidad electroforética (electrophoretic mobility shift assays - EMSA) el sitio de unión de AfeR en la región reguladora del gen *afeI*. De esta manera, nos propusimos identificar, mediante análisis bioinformáticos, aquellos genes que presenten este sitio de unión y se encuentren controlados por este regulador transcripcional y por ende regulados por QS.

Las tres estrategias experimentales e independientes antes descritas deberían permitirnos identificar los genes cuya expresión es modulada por el sistema QS en esta bacteria.

## HIPÓTESIS

Existe un conjunto de genes regulados en *At. ferrooxidans* ATCC 23270<sup>T</sup> que conforman el regulón QS de este microorganismo y que responden a la presencia de análogos sintéticos de AHLs.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes del regulón QS en *At. ferrooxidans* ATCC 23270<sup>T</sup>.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

**Objetivo específico 1.** Identificar análogos sintéticos de AHLs que favorecen la adherencia a sustrato mineral de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.

**Objetivo específico 2.** Estudiar el transcriptoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs e identificar aquellos genes regulados por QS, en particular aquellos involucrados en la adherencia sobre sustrato mineral.

- 2a. Identificar el inicio de la estimulación del sistema QS durante el crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> mediante el estudio de la expresión diferencial del gen *afeI* (involucrado en el sistema QS).
- 2b. Analizar la expresión global de los genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> cuando el sistema QS se encuentre estimulado (determinado en el punto anterior) en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs.

**Objetivo específico 3.** Construcción de un mutante nulo del gen *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para analizar su efecto en la adherencia en el mineral.

- 3a. Construcción de un vector suicida con un fragmento del gen *afeI* mediante ingeniería genética.
- 3b. Obtención del mutante *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.

**Objetivo específico 4.** Determinar el sitio de unión de AfeR en la región reguladora del gen *afeI*.

- 4a. Construir mediante ingeniería genética un vector de expresión para obtener un recombinante de AfeR.
- 4b. Sobre-expresar el gen *afeR* en *Escherichia coli* y purificar AfeR.
- 4c. Identificar la secuencia de ADN donde se une AfeR.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas y medios de cultivo

Se utilizó la cepa tipo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270<sup>T</sup>. El genoma de ésta cepa está completamente secuenciado y consiste en un cromosoma circular de 2,982,397 pb con un porcentaje de G+C de 58,8%, posee 3147 genes que codifican proteínas, con un gran porcentaje (64,3%) de proteínas putativas según análisis *in silico* (Valdés y col., 2008). *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fue cultivada aeróbicamente a 30°C en medio 9K modificado [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 0,4 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04 g/l, pH 2,5, sin metales traza] en presencia de perlas de azufre elemental (50 o 200 g/l) como fuente de energía (Amaro y col., 1991). Para obtener cultivos frescos, ésta cepa se creció en medio FeCi [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 0,4 g/l; FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 3,5% p/v; Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O (CO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> 0,3 g/l; pH 1,6] (Yarzabal y col., 2003) y en medio 9K modificado que contenía FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O (35 g/l) como fuente de energía. Para los experimentos de conjugación *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fue cultivado en medio TK [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 0,4 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 g/l y pH 3,5 - 5,2] con perlas de azufre (50 g/l) (Tuovinen y Kelly, 1973; Peng y col., 1994a) y en medio DOP [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11,25 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 1,875 g/l; KCl 0,375 g/l, 0,5x10<sup>-4</sup> M de ácido diaminopimélico (DAP), 3 mM de Leucina, pH 4,5 - 5,2] con 1,95 g/L de FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O y 1,95 g/L de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como fuente de energía (Peng y col., 1994a; Liu y col., 2001).

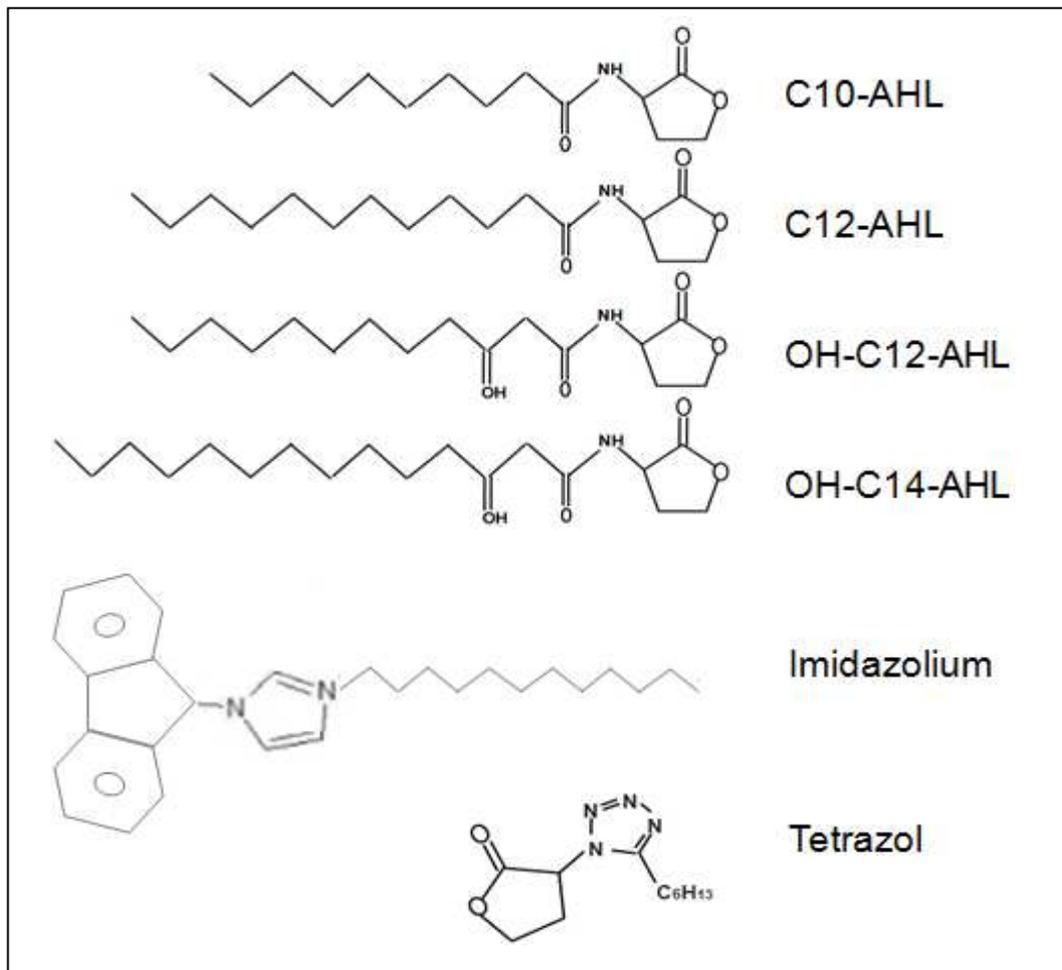
Para realizar las transformaciones, la construcción del vector de expresión para AfeR y de los vectores suicida en los experimentos de conjugación se utilizó la cepa TG1 de *Escherichia coli* [*supE*, *hsdD5*, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), F':*traD36*, *proAB*<sup>+</sup>, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ* $\Delta$ M15]. Además, la cepa Rosetta BL21(DE3)/pLysS de *E. coli* [F' *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm*  $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)] se usó para expresar AfeR. Estas dos cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani Broth (LB). Por último, se utilizó la cepa S17.1 de *E. coli* [*recA pro hsdR* (RP4-2, Tc::Mu Km::Tn7)] como cepa donora en los experimentos de conjugación y fue cultivada en medio DOP en presencia de un antibiótico como agente selectivo y 0,5 % de extracto de levadura.

### 3.2 AHLs sintéticas y análogos de AHLs

Se utilizaron diferentes tipos de análogos de AHLs para ser evaluados como activadores de QS (Castang y col., 2004; Frezza y col., 2006; Geske y col., 2007). La colaboración con el laboratorio del Dr. Doutheau (Francia) nos permitió tener acceso a AHLs sintéticas y a análogos sintéticos de AHLs (Castang y col., 2004; Frezza y col., 2006; Ruiz y col., 2008). Los análogos sintéticos utilizados están descritos en la Figura 10.

### 3.3 Ensayos de adherencia al mineral

Los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se realizaron en medio 9K modificado con matraces erlenmeyer de 100 ml que contenían perlas de azufre (50 g/l), 8 cupones de azufre elemental (placas de superficie plana de 0,5 cm<sup>2</sup> obtenidas por la fusión de azufre elemental) y análogos sintéticos de AHLs (5 μM) desde el inicio de la preparación de cada cultivo. La incubación se efectuó a 30 °C con una agitación lateral (90 rpm) por siete días como tiempo máximo de incubación. El análisis de la adherencia de las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre la superficie mineral se realizó observando al microscopio las células adheridas en los 8 cupones de azufre utilizados como sustrato mineral (Ruiz y col., 2008). Dos cupones fueron extraídos desde cada cultivo al 1<sup>er</sup>, 3<sup>er</sup>, 5<sup>to</sup> y 7<sup>mo</sup> día de incubación. Una vez obtenidos los cupones de azufre de cada tiempo de incubación se realizó inmediatamente un análisis microscópico de la respuesta de adherencia celular sobre mineral mediante la tinción de las células adheridas sobre los cupones. Primero, los cupones de azufre de cada cultivo y de cada tiempo de incubación fueron lavados tres veces con agua ácida (pH 1,5) para remover las células planctónicas, luego fueron teñidos con DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole, (1 mg/ml)] o con LIVE/DEAD BacLight (1 μl/cm<sup>2</sup>, Invitrogen) durante 30 minutos. Posteriormente los cupones fueron lavados tres veces con agua ácida para remover el colorante sobrante. De esta manera, se marcaron las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> adheridas en cada cupón de azufre. Utilizando microscopía de fluorescencia



**Figura 10. Acil Homoserina Lactonas y análogos sintéticos utilizados en cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.** Las C12-AHL, C10-AHL, OH-C12-AHL y OH-C14-AHL, tetrazol e imidazolium fueron utilizadas en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para observar su efecto en la adherencia de esta bacteria sobre el sustrato mineral. El tetrazol y la OH-C14-AHL (González y col., 2013) se utilizaron como estimuladores del sistema QS, mientras que el imidazolium lo fue como inhibidor de QS (des Essarts y col., 2013).

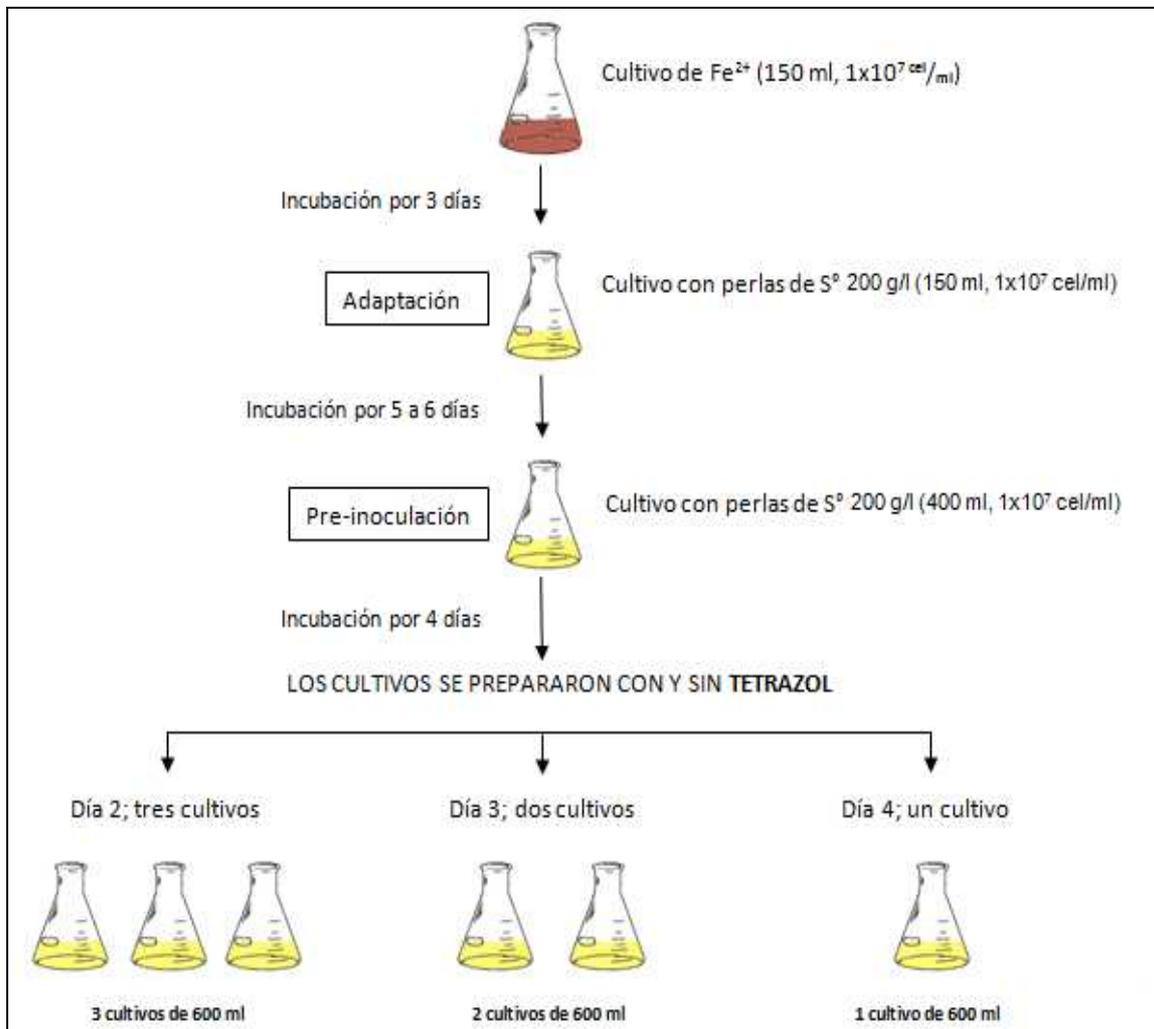
cia se observó la adherencia celular en presencia de los análogos sintéticos de AHLs (González, 2010). Para ello, cada cupón fue observado a 63x de aumento en un microscopio de epifluorescencia invertido ZEISS Axiovert 200M. Para cada ensayo de adherencia se preparó un cultivo como control biótico [cultivo con células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> y DMSO (solvente utilizado para la preparación de stocks de AHLs)] y un control abiótico (cultivo sin células), ambos controles con cupones de azufre y sin análogos sintéticos de AHLs. Los cupones obtenidos desde los cultivos control fueron analizados de igual forma que los ensayos de adherencia.

De acuerdo a lo anterior, se seleccionaron los análogos sintéticos de AHLs que generan una mayor respuesta de adherencia sobre el mineral. Para corroborar que estos análogos sintéticos de AHLs seleccionados producen una fuerte respuesta en el fenotipo de adherencia, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido que posee una alta resolución espacial (Mangold y col., 2008a; Mangold y col., 2008b). Se prepararon los cupones de azufre para su secado de punto crítico, método que utiliza una temperatura y una presión por arriba del punto crítico de temperatura y presión de la muestra para evitar el colapso de su estructura durante el secado. Luego, se realizó un sombreado con oro para generar una capa fina del metal sobre los cupones, lo cual permite obtener una imagen al rastrear la superficie de estos con un haz electrónico. Finalmente, los distintos cupones fueron observados en el microscopio electrónico de barrido SEM LEO 1420VP de la Unidad de microscopia y rayos X de la Facultad de Física de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC).

### **3.4 Protocolo de preparación de cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para la extracción de ARN total**

Los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para la extracción de ARN total se realizaron en medio 9K modificado en presencia y ausencia de tetrazol (5  $\mu$ M) y con perlas de azufre (200 g/l) como fuente de energía. Se utilizó un protocolo para el crecimiento y adaptación de las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con el objetivo de estandarizar la preparación de todos los cultivos para la obtención de ARN total. De esta forma se normalizó el crecimiento de

las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en todos los cultivos. Esto fue necesario para obtener una reproducibilidad en todas las muestras de ARN total y por ende en los resultados obtenidos. Se desarrolló un cultivo de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en medio FeCi con una concentración celular inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. Luego de tres días de incubación con agitación lateral (90 rpm, 30°C), el cultivo se encontraba en su fase final de crecimiento exponencial. Posteriormente, desde el cultivo anterior se tomaron las células necesarias para preparar un nuevo cultivo (150 ml) de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. Previo a la preparación del nuevo cultivo, las células fueron lavadas tres veces con medio 9K modificado para eliminar los remanentes del medio FeCi, incluyendo el hierro. Luego, las células lavadas fueron resuspendidas con 150 ml de medio 9K modificado en un erlenmeyer de 500 ml que contenía perlas de azufre (200 g/l). De esta forma, se permitió una adaptación de las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> a las condiciones del nuevo medio de cultivo. Después de una incubación de seis días, el cultivo se encontraba en su fase final de crecimiento exponencial y alcanzaba una concentración de  $1 \times 10^8$  cel/ml aproximadamente. Así, desde el cultivo de adaptación de las células se tomó una alícuota para realizar un nuevo cultivo denominado pre-inóculo, el cual se utilizó para preparar los cultivos con y sin tetrazol desde donde se extrajeron las muestras de ARN total. Este pre-inóculo se realizó en medio 9K modificado (400 ml) con perlas de azufre (200 g/l). Una vez que el pre-inóculo alcanzó una concentración celular de  $1 \times 10^8$  cel/ml (4 días de incubación a 30°C con agitación lateral), se tomó una alícuota de éste para preparar 3600 ml de medio 9K modificado con una concentración celular inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml, con tetrazol (5  $\mu$ M) y sin éste (sólo DMSO, solvente de tetrazol). Éstos 3600 ml fueron divididos para generar seis cultivos de 600 ml con igual concentración celular. Cada cultivo de 600 ml se preparó en un matraz erlenmeyer de 2 L que contenía perlas de azufre (200 g/l) previamente esterilizadas. Los seis cultivos fueron incubados a 30°C con agitación lateral (90 rpm). Tres cultivos fueron incubados por 2 días, dos por 3 días y el último por 4 días. Así, la misma cantidad de células total se obtuvo en cada condición de incubación. Al término del tiempo de incubación se realizó la extracción de las muestras de ARN total. Este protocolo se realizó seis veces (tres con tetrazol y tres sin tetrazol) para obtener tres réplicas biológicas de muestras de ARN total con y sin tetrazol a los distintos intervalos de tiempo (Fig. 11).



**Figura 11. Esquema de la preparación de cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> para la extracción de muestras de ARN total.** Se realizó este protocolo experimental para normalizar el crecimiento celular y disminuir las variaciones experimentales en la obtención de cada muestra de ARN total (ver detalle en el texto).

### **3.5 Obtención de células planctónicas y adheridas**

Se cultivó la cepa de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de los análogos sintéticos de AHLs seleccionados en el objetivo 1 como se describe en el punto 3.4. De estos cultivos se extrajeron las células planctónicas mediante pulsos de centrifugación (1000 rpm por 5 minutos) para precipitar las trazas de azufre en suspensión obteniendo solamente el sobrenadante con las células planctónicas. Para la obtención de células adheridas al mineral se recolectaron las perlas de azufre de cada cultivo. Éstas fueron lavadas con agua ácida para eliminar las células planctónicas remanentes. Luego las perlas de azufre fueron incubadas por 5 minutos en agua ácida (pH 1,5) con Triton X-100 al 0,04% (agitando con un vortex cada 1 minuto) para facilitar el desprendimiento de la célula desde las perlas de azufre. Inmediatamente, se realizaron pulsos de sonicación (un pulso de sonicación cada 4 segundos por 2 minutos a 4°C) en un baño de sonicación para separar las células adheridas de las perlas de azufre. Posteriormente, a través de una centrifugación (1000 rpm por 5 minutos) se precipitaron las perlas de azufre y remanente de este último, obteniendo en el sobrenadante las células adheridas liberadas, las cuales fueron lavadas tres veces con agua ácida para eliminar el Triton X-100. Finalmente, para corroborar que se obtuvo gran parte de las células adheridas, se efectuó una tinción con LIVE/DEAD BacLight de las perlas de azufre después del proceso de sonicación para analizarlas mediante microscopía de fluorescencia y verificar que se extrajo el total o un alto porcentaje de las células adheridas.

### **3.6 Extracción de ARN total y obtención de ADNc**

Se extrajo el ARN total desde células planctónicas y adheridas que provenían de cultivos con y sin análogos sintéticos de AHLs (seleccionados en el objetivo 1) mediante un protocolo modificado de extracción de ARN total con fenol ácido (Aiba y col., 1981; Guiliani y col., 1997). Este protocolo incluye un paso de extracción preliminar con TRIZOL® (Invitrogen) y la purificación del ARN total utilizando el “kit High Pure RNA isolation” (Roche Applied Biosystem) como descrito previamente (Quatrini y col., 2006;

2009). Para remover el ADN, el ARN total fue tratado con Turbo DNase (Applied Biosystem). La calidad de cada muestra de ARN total fue verificada en un gel de agarosa y la ausencia de ADN genómico fue chequeada por PCR. La purificación de las muestras fue chequeada mediante la D.O.=260/280 (valores  $\geq 1.8$ ) y D.O.=260/230 (valores  $\geq 2.0$ ) para descartar la contaminación con proteínas, sales, EDTA, carbohidratos o fenol.

Para la generación de ADNc a partir de ARN total se utilizaron dos métodos dependiendo del tipo de análisis a realizar: i) para los experimentos de qRT-PCR se utilizó la transcriptasa reversa “Superscript II<sup>TM</sup> RNAsa” (Invitrogen Life Technologies) (Quatrini y col., 2009) y ii) para los experimentos de microarreglos de ADN se utilizó el “kit” de la transcriptasa reversa “ChipShot<sup>TM</sup> Labelling Clean Up System” (Promega) para obtener un ADNc fluorescente por incorporación directa de nucleótidos marcados con Cy®3 y Cy®5 (Quatrini y col., 2006; 2009).

### **3.7 PCR en tiempo real (qRT-PCR)**

Para estudiar la expresión diferencial de los genes se realizaron experimentos de qRT-PCR. Para esto, se utilizaron los ADNc obtenidos desde muestras de ARN total de células planctónicas y adheridas provenientes de los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> crecidos con y sin análogos sintéticos de AHLs y cosechadas en distintos intervalos de tiempo.

En los primeros experimentos de qRT-PCR se analizó la expresión diferencial del gen *afeI* en distintos intervalos de tiempo de incubación (6, 9, 12, 24 y 48 horas) con la molécula OH-C14-AHL (5  $\mu$ M) en un cultivo de tres días. Se empleó el termociclador Mx3000P (Stratagene) y el “kit Fast EvaGreen® qPCR Master Mix” (Biotium). El fluoróforo SYBR Green se une al dsDNA y emite fluorescencia cuando es excitado. La fluorescencia se monitoreó en tiempo real, siendo ésta proporcional a la cantidad de producto amplificado (Bustin, 2000). Se construyeron curvas de calibración con diluciones seriadas del ADN genómico de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para estimar el número de copias de cada gen en los distintos ensayos. Para normalizar los resultados, se utilizó la expresión del gen

*rrs* que codifica para el ARNr 16S de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> como control endógeno (Tabla 3, partidores *rrs*<sup>a</sup>).

Los experimentos de qRT-PCR realizados para analizar la expresión diferencial de los genes *afeI*, *afeR*, *zwf*, *wcaA* y AFE\_1339 (2, 3 y 4 días de incubación con y sin tetrazol) fueron desarrollados utilizando el “kit SsoFast EvaGreen Supermix 2X” (BioRad) y el sistema CFX96 Real-Time usando el termociclador C1000 (BioRad). El fluoróforo EvaGreen actúa de forma similar al fluoróforo SYBR Green.

Para normalizar los resultados, se utilizó la expresión diferencial del gen *rrs* que codifica para el ARNr 16S de *At. ferrooxidans* como control endógeno. Los partidores utilizados en los experimentos de qRT-PCR fueron diseñados con el programa de Roche (Tabla 3, partidores *rrs*<sup>b</sup>). Los resultados obtenidos de cada muestra fueron analizados con los programas MxPro 3.2 y REST (The Relative Expression Software Tool). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prims 5.

### **3.8 Ensayo de expresión global mediante microarreglos de ADN**

Con la finalidad de estudiar la expresión génica de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en distintas condiciones de cultivo (células planctónicas y adheridas a las perlas de azufre, crecidas con y sin análogos sintéticos de AHLs) se utilizó la técnica de microarreglos de ADN (Quatrini y col., 2006; 2009). De esta forma, se analizó la expresión diferencial de todos los genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para identificar aquellos pertenecientes al regulón QS. Esta técnica experimental se desarrolló con ARN total obtenido desde células planctónicas y adheridas para cada condición (con y sin AHLs). Se utilizó 10 µg de ARN total de cada muestra para generar dos preparaciones de ADNc independientes (cada preparación contenía 5 µg de ARN total). Estas dos preparaciones de ADNc fueron marcadas con uno de los dos fluoróforos (Cy@3 o Cy@5) con el “kit” de la transcriptasa reversa “ChipShot<sup>TM</sup> Labelling Clean Up System” (Promega) para obtener un marcaje con fluorescencia reversa o intercambio de fluoróforo o “dye swap” para dar cuenta de diferencias en el muestreo, los

**Tabla 3.** Partidores utilizados para los experimentos de qRT-PCR.

<b>Gen</b>	<b>Código partidor</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>Tm (°C)</b>
<i>afeI</i>	AFEIT11	CCAGCTGAAGTTTTACCG	253	60
	AFEIT22	GTGCCAGTCCGTTGAGTA		60,9
<i>afeR</i>	AFER11	GTCACGGTTTCTCCAGCA	222	59
	AFER22	CAGATATCAAGCGCAGGAAT		59
<i>zwf</i>	zwf1	CGATATGGAACCGCAATTACA	211	60,7
	zwf2	CGCAGGACTTTGACCTT		60,2
AFE_1339	AFE1339-1	TCGTATTGTGGCGGTGGATG	209	60,7
	AFE1339-2	TAAGGCCGACTTGATCCTGT		59
<i>wcaA</i>	wcaA-1	AGGGGAGCGTCAATCGGTA AAA	183	58
	wcaA-2	ACCCTGGCATCTGGACAAAA		56
<i>rrs<sup>b</sup></i>	16S-G	ACACTGGGACTGAGACACGG	260	58
	16S-D	ACCGCCTACGCACCCTTTAC		58
<i>rrs<sup>a</sup></i>	16S11	TGGTGCCTAGCGTACTGAGTGT	204	60,1
	16S22	CCGAAGGGCACTTCCGCA		59

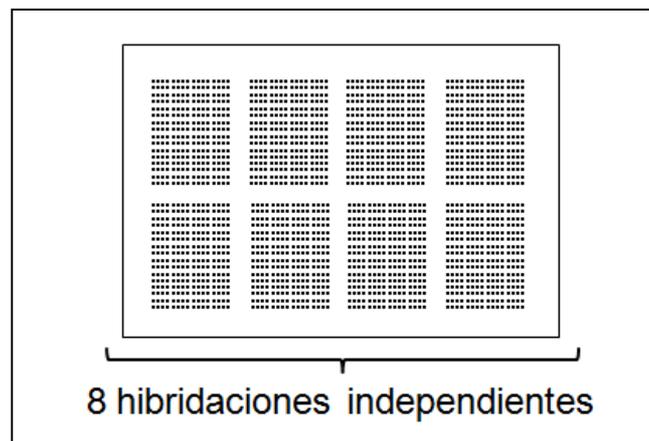
sesgos en el acoplamiento de los fluorocromos y la eficiencia en las emisiones de éstos últimos. Para eliminar el exceso de nucleótidos fluorescentes marcados con Cy®3 o Cy®5 y ARN total degradado, el ADNc marcado fue purificado usando el “kit ChipShot Labelling Clean-Up System” (Promega). La eficiencia de incorporación de los fluoróforos fue determinada por la absorbancia a 260, 550 y 650 nm y la frecuencia de incorporación (FOI, frecuencia de incorporación) fue calculada de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Con las muestras de ADNc marcadas óptimamente se realizaron 16 hibridaciones como se muestra en la Tabla 4. Se utilizaron 300 ng de ADNc marcado para cada condición experimental (células planctónicas o adheridas, con y sin AHLs). Cada hibridación de 600 ng de ADNc (300 ng marcados con Cy®3 y 300 ng marcados con Cy®5) fue cargada inmediatamente sobre dos microarreglos de Agilent, cada uno contenía 8 copias independientes del grupo de oligonucleótidos que representaban al genoma completo de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 12). Cada copia contenía 6294 oligonucleótidos de 55 nt que monitorean la expresión diferencial de 3147 genes, a razón de dos oligonucleótidos por cada gen. El diseño de todos los oligonucleótidos fue realizado por el Dr. Emmanuel Talla (Laboratoire de Chimie Bactérienne UMR 7283, CNRS - Marseille). Una vez que las 16 hibridaciones fueron cargadas, cada microarreglo se incubó por 16 horas a 42°C en una cámara de hibridación (Agilent G2534A). Finalmente, el microarreglo fue lavado con “kit Agilent gene expression wash buffer” (1 minuto a 37°C, “Two-color microarray-based prokaryote analysis protocol”, Agilent) con agitación y secado por centrifugación a 1200 × g por 1 minuto para su posterior análisis (Quatrini y col., 2006; 2009; Vera y col., 2009).

### **3.9 Análisis de microarreglos de ADN**

Los datos “spots” obtenidos de la imagen escaneada con el escáner Axion 4400A (Molecular Devices) de cada microarreglo fueron cuantificados con el programa Genepix Pro 6.0 (Molecular Devices) y posteriormente analizados usando el programa Acuity 4.0 (Molecular Devices). Todos los datos fueron estudiados según su patrón de hibridación,

**Tabla 4.** Descripción de las 16 hibridaciones realizadas en las 2 láminas de microarreglos de ADN. S, células sésiles; P, células planctónicas; D, cultivos con DMSO sin tetrazol; T, cultivos con tetrazol; 1, 2 y 3, número de la réplica biológica; a y b, réplicas experimentales. En cada hibridación se utilizó cianina 5 (Cy@5, emite color rojo) para marcar una muestra y la cianina 3 (Cy@3, emite color verde) para marcar la otra muestra a comparar. Ocho hibridaciones se realizaron en cada microarreglo de ADN (M1 y M2).

Microarreglos de ADN	N° de Hibridaciones	Cy5	Cy3
M1	1	SD1	ST1a
	2	SD2a	ST2
	3	SD3	ST3
	4	SD2b	ST1b
	5	ST2	SD3
	6	ST3	SD1
	7	PD1	PT1a
	8	PD2a	PT2
M2	9	PD3	PT3
	10	PD2b	PT1b
	11	PT2	PD3
	12	PT3	PD1
	13	PT1	ST1a
	14	ST2	PT2
	15	ST3	PT3
	16	PT2	ST2



**Figura 12.** Representación de un microarreglo de ADN de Agilent utilizado para los estudios transcriptómicos del genoma de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>. Cada microarreglo de ADN posee 8 copias independientes del genoma completo de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. Cada copia posee 6294 oligonucleótidos capaces de hibridar con la secuencia de ADNc de 3147 genes. Cada gen está representado por dos oligonucleótidos.

lo cual se revela por una correlación lineal negativa entre el logaritmo de la intensidad de Cy®3 y el de Cy®5 en cada “spot”. Posteriormente, todos los datos fueron transformados al logaritmo en base dos de la razón entre la intensidad de cada uno de los fluoróforos ( $\log_2^{Cy^5/Cy^3}$  = expresión del gen) y normalizados (“lowess”) para disminuir la variación entre los dos grupos de datos. Finalmente, todos los genes con valores  $< 5E^{-2}$  ( $\geq 95\%$  de confianza) del “One Sample t-Test Benjamini-Hochberg (Adv)” fueron considerados. Los resultados de expresión diferencial obtenidos para cada gen (en cada réplica biológica y experimental) que presentaron valores de su mediana  $\geq 1,0$  o  $\leq -1,0$  (valores que indican un cambio en la expresión de dos veces o más) en las 16 hibridaciones fueron analizados.

### 3.10 Construcción del vector suicida pSM1a

La construcción del vector pSM1a se realizó mediante la inserción del gen de resistencia a la kanamicina y de un gen *afeI* trunco en un vector suicida movilizable, de tal manera que mediante una sola recombinación homóloga éste plásmido sea capaz de interrumpir el gen silvestre *afeI* (Fig. 13). Se utilizó el plásmido movilizable pUC18mob (4.2 kb) (Simon y col., 1983) que no puede replicarse en *At. ferrooxidans*. El gen de resistencia a la kanamicina (1.3 kb) se obtuvo y escindió desde el plásmido pUC4KISS mediante una digestión con la enzima de restricción *PstI*. Con esta misma enzima se cortó el vector pUC18mob para posteriormente ligarlo con el gen de resistencia (Fig. 14). El producto de esta reacción de ligación (pUC18mob Kan<sup>R</sup>, 5.5 kb) se introdujo por transformación en la cepa TG1 de *Escherichia coli* para su replicación.

La construcción del gen trunco  $\Delta afeI$  (253 pb) se realizó mediante PCR con los partidores AFEIT11 y AFEIT22 (ver Tabla 3), luego el producto PCR se ligó con el vector pCR-Blunt-TOPO para obtener el gen trunco  $\Delta afeI$  flanqueado con los sitios de restricción *EcoRI*. El producto de esta reacción de ligación (pCR-Blunt-TOPO $\Delta afeI$ ) se introdujo por transformación en células quimiocompetentes JM109 de *E. coli* para su replicación. Posteriormente, para escindir el gen trunco  $\Delta afeI$  se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Finalmente, se cortó el plásmido pUC18mob Kan<sup>R</sup> con *EcoRI* para ligar

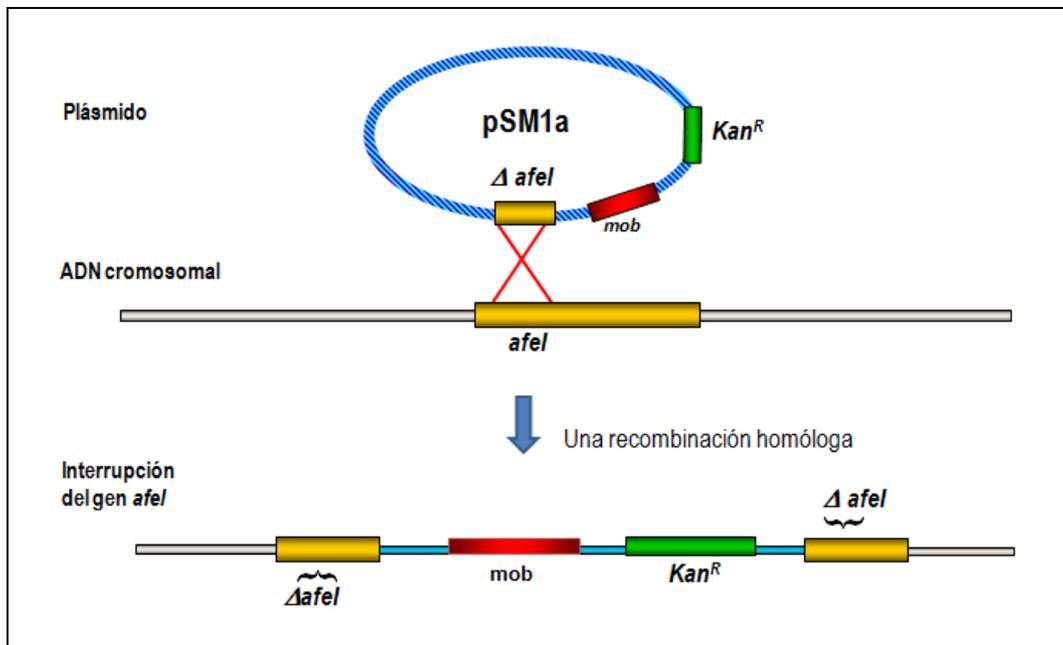


Figura 13. Esquema teórico de la inserción del vector suicida pSM1a (pUC18mob $\Delta afel$  Kan) en el ADN genómico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.

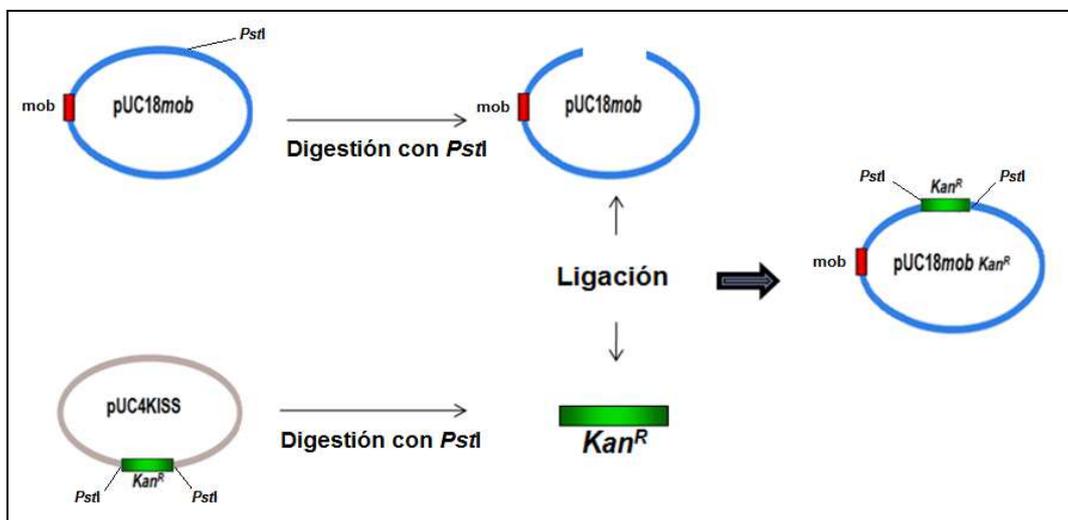
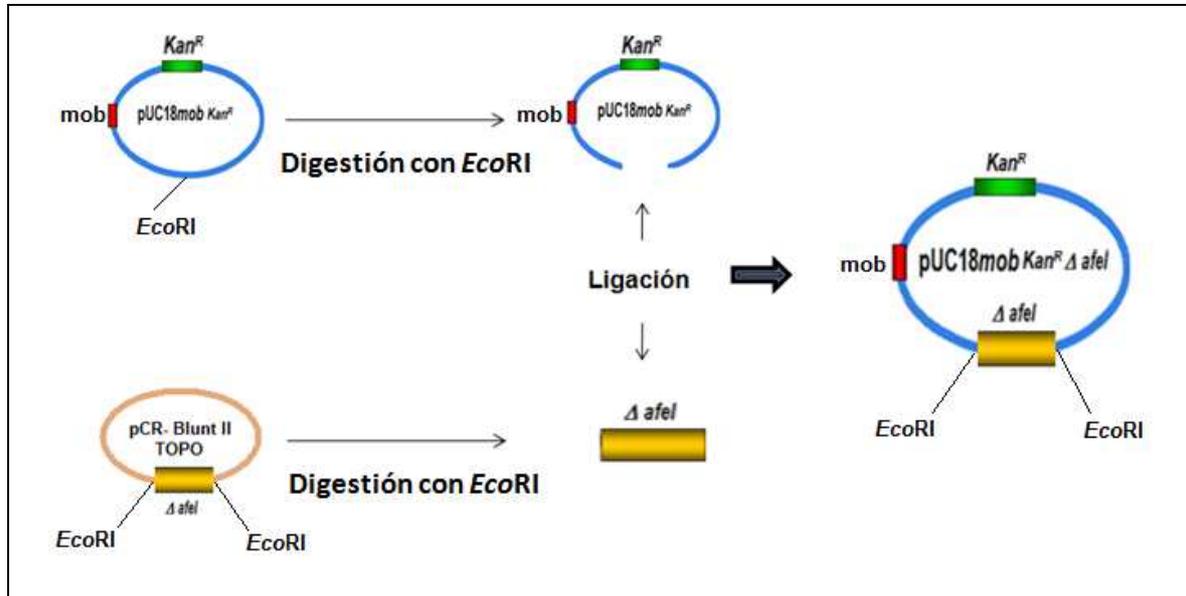


Figura 14. Esquema de la inserción del gen de kanamicina en el vector pUC18mob. La inserción del gen de resistencia a kanamicina, se realizó a través de una digestión con la enzima *Pst*I para remover dicho gen desde el plásmido pUC4KISS y para cortar el vector pUC18mob. Luego, mediante ligación se logró la inserción del gen resistente a kanamicina en el sitio de multiclona del vector pUC18mob.

el gen trunco  $\Delta afeI$  y obtener el vector suicida pSM1a (pUC18mob  $\Delta afeI$  Kan<sup>R</sup>, 5.8 kb) (Fig. 15). Todas las construcciones fueron chequeadas por secuenciación (MACROGEN, Corea).

### 3.11 Construcción del vector suicida pSM1b

La construcción del vector pSM1b se realizó utilizando el vector pBluescript (pBS SK polylinker, 2.9 kb) e insertando en él un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por dos fragmentos que corresponden a las regiones río arriba y río abajo del gen *afeI*. De esta forma, y a través de una doble recombinación homóloga de éstos fragmentos con la región del gen silvestre *afeI* es teóricamente posible su interrupción (Fig. 16). Mediante PCR con los partidores AFEIN1, AFEIN2, AFEIC1 y AFEIC2 (ver Tabla 5) se obtuvo la amplificación de  $\Delta afeI$  que corresponde a: i) la región río arriba de *afeI* (286 pb de la región reguladora y 284 pb de la región codificante), región denominada N (570 pb) y ii) la región río abajo del mismo gen (249 pb de la región codificante y 294 pb río abajo), región denominada C (543 pb). Las regiones N y C de *afeI* presentan sitios de restricción enzimática específicos en sus extremos para facilitar su inserción en el plásmido BS. La región N presenta río arriba el sitio de restricción *KpnI* y río abajo el sitio de restricción *HindIII*. La región C presenta los mismos sitios de restricción, pero inversamente (río arriba-*HindIII* y río abajo-*KpnI*). De acuerdo a esto, las regiones N y C fueron introducidas de manera independiente en el plásmido BS (SK polylinker) a través de las digestiones - y posterior ligación - con *KpnI* - *HindIII* y *HindIII* - *SmaI* respectivamente. Para la inserción de la región C en el plásmido BS (SK polylinker) se utilizó el sitio de restricción *SmaI* debido a que éste se encontraba en el plásmido río abajo del sitio *HindIII*, lo cual permitió orientar la inserción de la región C respecto a la región N. Además, la enzima de restricción *SmaI* genera extremos romos o de tipo "blunt". Una vez obtenida la región C mediante PCR con los partidores descritos en la Tabla 5 se procedió a realizar una digestión con la enzima



**Figura 15. Esquema general de la construcción del vector suicida pSM1a (pUC18mobΔafeI Kan).** Se realizó una digestión con la enzima *EcoRI* de los vectores pUC18mob Kan y pCR-Blunt-TOPO [vector que se utilizó para la construcción del gen trunco *afeI* ( $\Delta afeI$ )]. De esta forma, se obtuvo el vector pUC18mob Kan y el gen *afeI* trunco en su forma lineal. Finalmente, se realizó una reacción de ligación de ambos productos lineales obteniendo el vector suicida pSM1a (pUC18mobΔafeI Kan).

**Tabla 5.** Partidores utilizados para la obtención del gen  $\Delta afeI$  (regiones N y C). Se indican los sitios de restricción *KpnI* y *HindIII* en rojo y azul, respectivamente.

Código partidor	Secuencia 5' - 3'	Amplicon (pb)	Tm (°C)
AFEIN1	AA <b>GGTACCT</b> TGGGGTGGGACTGGCGGATGGA	570	57
AFEIN2	AAA <b>AAGCTT</b> CAGTCCGTTGAGTAACTGGG		48
AFEIC1	AAA <b>AAGCTT</b> TCTGAATGGCCAAGCCAAGA	543	47
AFEIC2	AA <b>GGTACCT</b> ACGGATGTCTTCATCCGTAAC		50

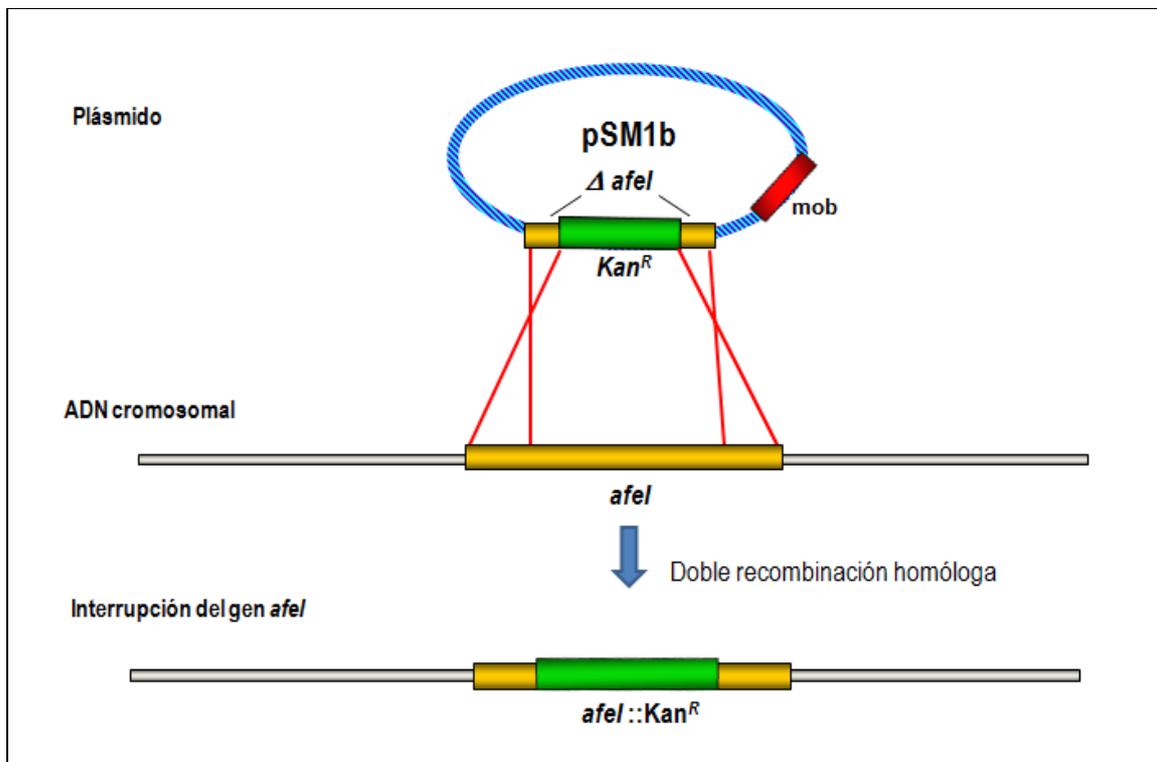


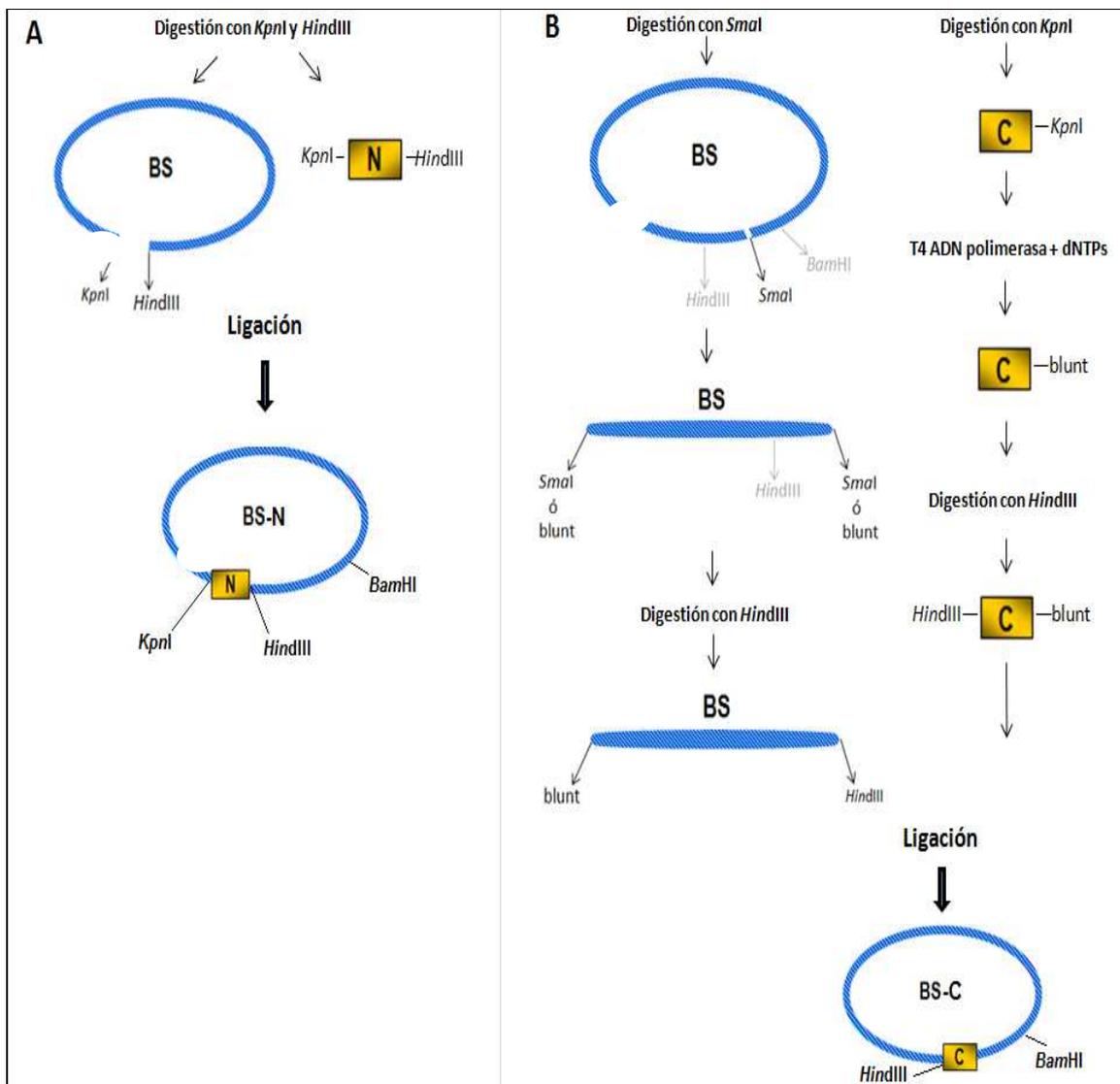
Figura 16. Esquema teórico de la inserción del vector suicida pSM1b (BSmob $\Delta afeI$ ::Kan) en el ADN genómico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.

*KpnI* para posteriormente mediante la acción de la T4 polimerasa generar un extremo romo. Finalmente, este fragmento de ADN fue digerido con *HindIII* y fue insertado en el plásmido BS (SK polylinker) que fue digerido con *HindIII* y *SmaI* (Fig. 17).

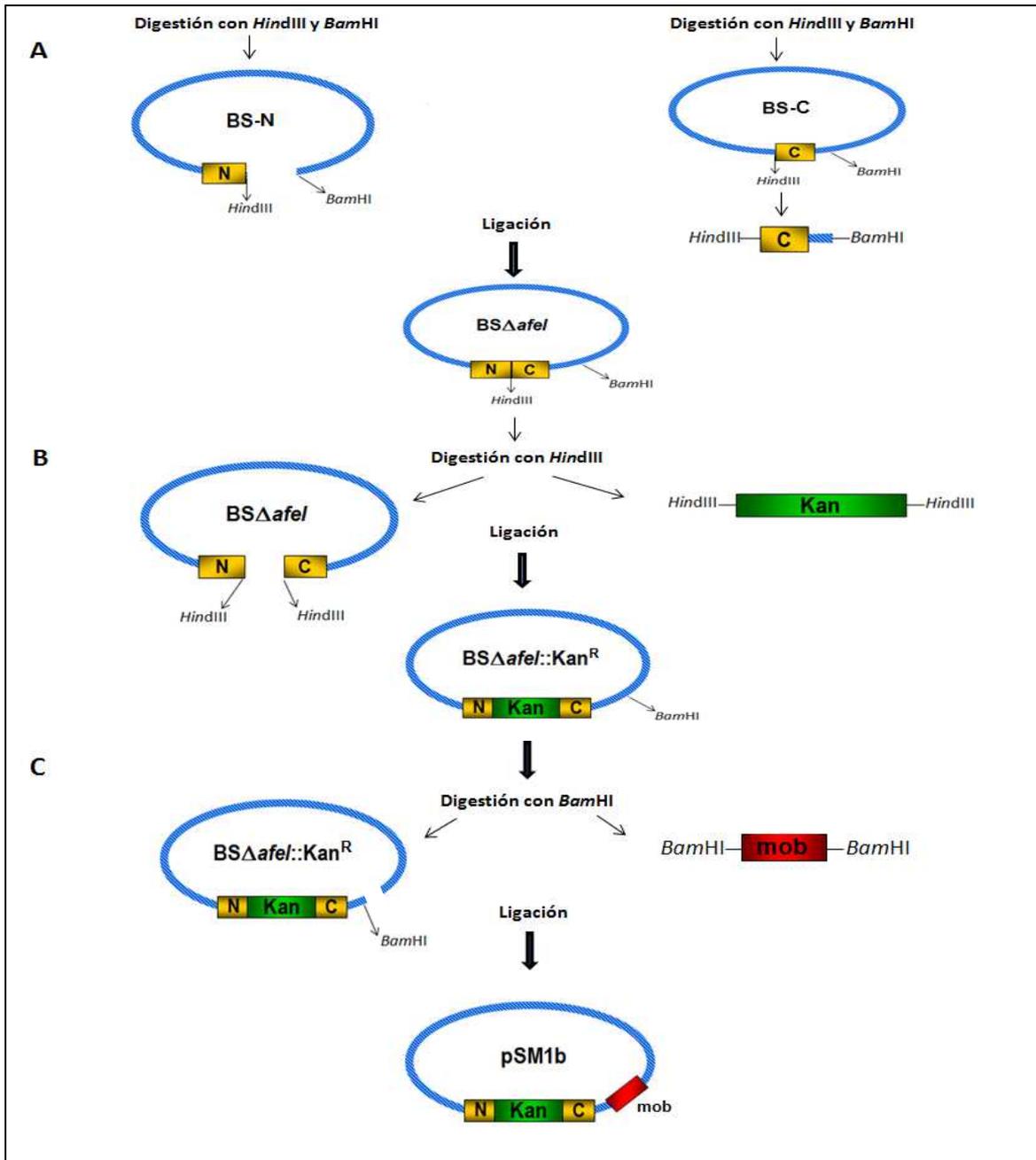
Una vez insertada la región N en el plásmido BS (SK polylinker) de forma independiente, se procedió a escindir la región C con los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* para luego ser insertada en el plásmido BS que contiene la región N, obteniendo el pseudogen  $\Delta afeI$  (fragmento N-C, 1.1 kb) (Fig. 18A). Posteriormente, se cortó el plásmido BS $\Delta afeI$  con la enzima de restricción *HindIII* para insertar el gen de resistencia a kanamicina (2 kb), el cual se obtuvo y escindió desde el plásmido pHP45 $\Omega$ Kan mediante una digestión con la misma enzima (Fellay y col., 1987). El gen de resistencia a kanamicina al ser insertado en el plásmido BS $\Delta afeI$  quedó flanqueado por las regiones N y C del gen *afeI*, debido a que el único sitio de restricción *HindIII* en el plásmido se encuentra entre ambas regiones (Fig. 18B). Por último, se procedió a ejecutar una digestión en el plásmido BS  $\Delta afeI::Kan^R$  con la enzima de restricción *BamHI* para insertar la región mob (región que posee los genes de movilidad necesarios para la conjugación, 1.6 kb), la cual proviene del vector pUC18mob y se obtuvo mediante una digestión con la misma enzima de restricción (Fig. 18C). Finalmente, se obtuvo el vector suicida pSM1b (pBSmob $\Delta afeI::Kan^R$ , 7.6 kb).

Todas las transformaciones fueron realizadas a través de células quimiocompetentes generadas en la cepa TG1 de *Escherichia coli*. La selección de los clones positivos en la inserción de las regiones N y C en el plásmido BS se realizó observando la hidrólisis de un  $\beta$ -galactósido llamado X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), el cual al ser hidrolizado genera un color azul. Su hidrólisis es producida por la  $\beta$ -galactosidasa, enzima que es funcional cuando no hay inserción de ADN extranjero en el sitio de multi-clonamiento del plásmido BS.

Todas las construcciones fueron chequeadas por secuenciación (GATC Biotech, Alemania).



**Figura 17. Esquema general de la inserción de las regiones N y C en el plásmido BS.** A, la inserción de la región N en el plásmido BS se realizó a través de la digestión de ambos con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, para posteriormente facilitar la ligación de la región N y el vector. B, la inserción de la región C en el plásmido BS se efectuó a través de las digestiones con las enzimas *KpnI*, *HindIII* y *SmaI*. En el caso del plásmido BS, primero se realizó la digestión con *SmaI* para generar los extremos romos o de tipo “blunt”, luego se realizó otra digestión con la enzima *HindIII*. El producto PCR de la región C fue digerido con la enzima *KpnI* para luego mediante la acción exonucleasa de la T4 ADN polimerasa se escinda el extremo 3' saliente generando un extremo tipo “blunt”, perdiéndose el sitio de restricción *KpnI*. Posteriormente, mediante una segunda digestión con *HindIII* se obtuvo el fragmento C con un extremo cortado con *HindIII* y otro de tipo “blunt”. Finalmente la región C fue ligada al plásmido BS.



**Figura 18. Esquema general de la construcción del vector suicida pSM1b (pBSmob $\Delta$ *afel*::Kan).** **A**, la construcción del gen *afel* trunco se realizó mediante la inserción de la región C -obtenida a través de las digestiones con *Hind*III y *Bam*HI desde el plásmido BS- en uno de los clones positivos que presenta inserta la región N. **B**, el gen de resistencia a kanamicina fue escindido y obtenido desde el plásmido pHP45 $\Omega$ Kan a través de una digestión con la enzima *Hind*III, misma enzima con la que se cortó el plásmido BS  $\Delta$ *afel* para insertar el gen de resistencia. **C**, la inserción de la región *mob* en el plásmido BS  $\Delta$ *afel*::Kan fue realizada mediante la digestión con la enzima *Bam*HI y posterior ligación de ambos.

### 3.12 Conjugación

Los experimentos de conjugación se realizaron con *E. coli* como cepa dadora y *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> como cepa receptora. La cepa S17.1 de *E. coli* contiene la maquinaria necesaria para el proceso de conjugación y transferencia del vector movilizable suicida (pSM1a o pSM1b), el cual contiene el gen *afeI* trunco y un sitio de reconocimiento para funciones de transferencia (región *mob*) para la movilización de él mismo (Simon y col., 1983). La cepa dadora fue cultivada en medio líquido DOP (37 °C, extracto de levadura al 0,5 % como fuente de energía y kanamicina [100 µg/ml]) y adaptada a un pH más ácido (pH 4,5 o 5,2) que el óptimo de la bacteria (pH 7,0). Luego, un nuevo cultivo de ésta cepa adaptada se creció en igual condiciones hasta la fase de crecimiento exponencial tardía (Liu y col., 2001). En tanto, la cepa receptora se creció a 30 °C en medio líquido TK a pH 4,5 o 5,2 con perlas de azufre como fuente de energía hasta la fase de crecimiento estacionaria (Tuovinen y Kelly, 1973; Peng y col., 1994a; Liu y col., 2000). Ambas cepas fueron lavadas tres veces con medio salino basal DOP para eliminar las trazas de fuente de energía de cada medio de cultivo (extracto de levadura y azufre) al ser recolectadas por centrifugación (8 minutos a 7000 rpm, a temperatura ambiente y 4 °C para la cepa receptora y dadora, respectivamente). Luego cada cepa fue resuspendida en un volumen de medio salino basal DOP para obtener una concentración final de  $2 \times 10^9$  cel/ml. Posteriormente, se hizo una mezcla de 100 µl en distintas proporciones (1:1, 1:2 y 2:1) de la cepa dadora y receptora. Los 100 µl de cada proporción fueron incubados en medio sólido DOP (pH 4,5 o 5,2) que contenía adicionalmente 0,05 % de extracto de levadura,  $0,5 \times 10^{-4}$  M de DAP, 3 mM de Leucina y 0,05 % de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (Peng y col, 1994b; Liu y col., 2001). Luego de una incubación a 30 °C por tres o cinco días en el medio sólido, las células fueron recuperadas y resuspendidas en 1 ml de medio salino basal DOP. Del total de células recuperadas, distintas diluciones (Tabla 6) fueron plaqueadas y crecidas por 10 a 15 días en medio sólido DOP (30 °C, sin extracto de levadura,  $\text{FeSO}_4$  0.05 %, con y sin kanamicina [100 y 200 µg/ml], pH 4,5) y por 7 días en medio líquido DOP (30°C a pH 2,5) reemplazando el  $\text{FeSO}_4$  por 5 g de azufre en polvo tal como descrito en Liu y col. (2000). Los transconjugantes resistentes a kanamicina fueron analizados por PCR.

**Tabla 6.** Diferentes condiciones experimentales realizadas en los ensayos de conjugación.

D/R	Tiempo de conjugación 3 días				Tiempo de conjugación 5 días			
	pH 4,5 <sup>a</sup>		pH 5,2 <sup>a</sup>		pH 4,5 <sup>a</sup>		pH 5,2 <sup>a</sup>	
	Cultivo en medio sólido*	Inoculación medio líquido	Cultivo en medio sólido*	Inoculación medio líquido	Cultivo en medio sólido*	Inoculación medio líquido	Cultivo en medio sólido*	Inoculación medio líquido
	-K, +K	-K, +K	-K, +K	-K, +K	-K, +K	-K, +K	-K, +K	-K, +K
1:1	√	√	√	√	√	√	√	√
1:2	√	√	√	√	√	√	√	√
2:1	√	√	√	√	√	√	√	√

(\*): Los cultivos en placas de medio sólido se realizaron con distintas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  cel/ml) a partir del total de células recuperadas de la conjugación.

(a): pH de los cultivos de adaptación y del medio de conjugación para la cepa dadora y receptora.

D/R: Proporción entre la cepa dadora y la cepa receptora.

-K: Sin Kanamicina.

+K: Con Kanamicina (100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ).

√: Condición realizada.

### 3.13 Construcción de un vector de expresión de AfeR

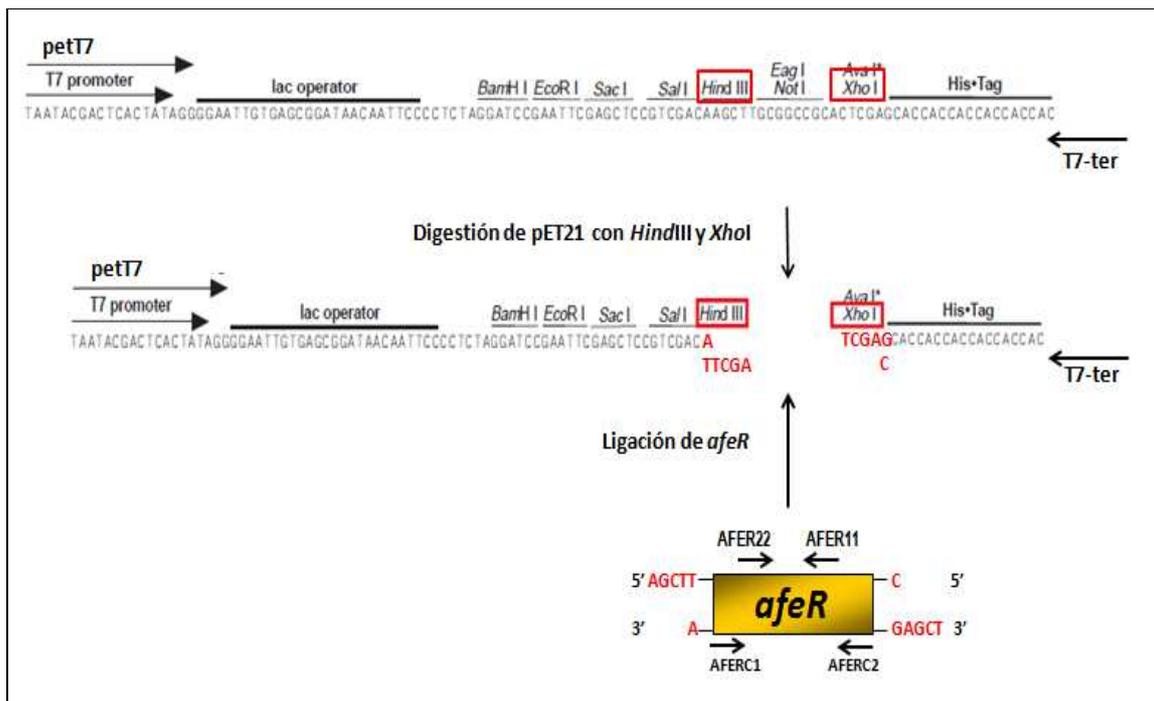
La construcción del vector de clonamiento se realizó utilizando el plásmido pET21 (NOVAGEN) debido a que contiene el promotor T7 (el cual controla la expresión de los genes clonados) y codifica una secuencia His•Tag al final de su sitio de multiclonamiento donde se insertó el gen *afeR*. Mediante PCR con los partidores AFERC1 y AFERC2 (Tabla 7) se amplificó el gen *afeR* con los sitios de restricción *Hind*III río arriba y *Xho*I río abajo. Posteriormente, se realizó una digestión del producto PCR -correspondiente al gen *afeR*- y del plásmido pET21 con las enzimas *Hind*III y *Xho*I para luego insertar a través de una ligación el gen *afeR* en el plásmido (Fig. 19). Con el producto de esta ligación se realizó una transformación en la cepa TG1 de *E. coli*, recuperando las cepas recombinantes en placas con agar LB y ampicilina (100 µg/ml), puesto que el plásmido pET21 posee esta resistencia. Luego de una incubación por 24 horas a 37°C, las colonias resistentes al antibiótico fueron analizadas por PCR con los partidores AFER11, AFER22, petT7 y T7 ter (Tabla 7) para verificar la correcta inserción del gen *afeR* en el sitio de multiclonamiento del plásmido. Una vez identificados algunos clones positivos, se escogió uno para secuenciar la región de multiclonamiento del plásmido con el objetivo de corroborar la correcta inserción del gen *afeR* y comprobar que su secuencia no ha sido alterada (GATC Biotech, Alemania). Finalmente, se realizó una nueva transformación para introducir el plásmido secuenciado que contiene el gen *afeR* en la cepa Rosetta (DE3)/pLysS, puesto que dicha cepa tiene el gen que codifica la T7 ARN polimerasa que se encuentra bajo el control del promotor *Plac* UV5 inducible con IPTG. Los clones positivos obtenidos de esta última transformación fueron analizados por una reacción de PCR y utilizados en los experimentos de expresión y purificación de la proteína AfeR.

### 3.14 Expresión y purificación de AfeR

El vector pET21-*afeR* se insertó en la cepa Rosetta (DE3)/pLysS de *E. coli* para su replicación y la expresión del gen *afeR*. Un cultivo de 4,8 L de esta cepa recombinante se

**Tabla 7.** Partidores utilizados para la amplificación del gen *afeR* y para corroborar su correcta inserción y orientación en el vector de expresión. En rojo y azul se indican los sitios de restricción para *Hind*III y *Xho*I respectivamente.

Código partidor	Secuencia 5' - 3'	Amplicon (pb)	Tm (°C)
AFERC1	AAA <b>AAGCTT</b> GGGAAGGAGGGACATTTGGATC	747	50
AFERC2	AA <b>ACTCGAG</b> CGACAGCAACCCGAGCATCG		54
AFER11	GTCACGGTTTCTCCAGCA	222	59
AFER22	CAGATATCAAGCGCAGGAAT		59
petT7	GTGAGCGGATAACAATTCCCC	966	59
T7 ter	CAGCCAACCTCAGCTTCCTT		60



**Figura 19.** Esquema general de la construcción del vector de expresión de AfeR. La construcción se realizó en el plásmido pET21, el cual fue digerido con las enzimas *Hind*III y *Xho*I para insertar el gen *afeR*. La amplificación del gen *afeR* se efectuó a través de una reacción de PCR con partidores (AFERC1/AFERC2) que permitieron obtener un producto PCR con los sitios de restricción *Hind*III y *Xho*I en los extremos 5' y 3' respectivamente. Se indica la posición de los partidores petT7, T7-ter sobre la secuencia del plásmido y AFERC1, AFERC2, AFER11 y AFER22 sobre la secuencia del gen *afeR* (genoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>).

creció a 37°C en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y cloramfenicol (34 µg/ml) hasta una D.O.=0,6. En este punto de crecimiento del cultivo se agregó OH-C14-AHL (1 µM, Soulère y col., 2008) para estimular y estabilizar un correcto plegamiento de la proteína AfeR durante su síntesis, puesto que la molécula de AHL tiene la capacidad de unirse a ésta proteína. Además, en este punto de crecimiento del cultivo fue agregado nuevamente el antibiótico (ampicilina, 100 µg/ml) para mantener la presión selectiva, debido a que la ampicilina es degradada por la beta-lactamasa codificada por el producto del gen *bla* que se encuentra presente en el vector pET21-*afeR*. Posteriormente, el cultivo se creció por 30 minutos a 30°C para provocar que la síntesis de proteínas ocurra más lentamente y favorecer así un correcto plegamiento de AfeR. Por último, el cultivo se estimuló con IPTG (0,4 mM) para inducir la expresión del gen y se creció por 3 horas a 30°C (D.O.=1,4). Las células fueron obtenidas mediante centrifugación (8000 × g por 10 minutos a temperatura ambiente) y lisadas por sonicación en un tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM, Tween 20 2%, DNAsa 0,1 mg/ml, antiproteasa phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM (libre de EDTA), lisozima 0,1 mg/ml, OH-C14-AHL 5 µM, pH 7,4]. Se realizó una centrifugación (12000 × g durante 30 minutos a 4°C) para obtener el precipitado donde se encontraban los cuerpos de inclusión. El precipitado fue solubilizado con urea (4 M) en un tampón fosfato (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, NaCl 300 mM, PMSF 1 mM, OH-C14-AHL 5 µM y DNAsa 0,1 mg/ml, pH 7,4) mantenido 4°C con agitación suave por 30 minutos y centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a los cuerpos de inclusión solubilizados, fue filtrado (filtro de 0,45 µm) y cargado sobre una columna HisTrap™ Talon® crude (cobalto). La elución de la proteína fue realizada utilizando un tampón fosfato (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM, NaCl 300 mM, urea 4 M, PMSF 1 mM, OH-C14-AHL 25 µM) con concentraciones crecientes de imidazol (5, 50, 150, 250 y 500 mM). Los resultados fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti His•tag. La muestra que contenía la proteína fue eluída con una concentración de imidazol de 150 mM. La banda que correspondía al tamaño de AfeR, obtenida en los análisis anteriores, fue cortada y tratada con Tripsina para obtener los péptidos que fueron analizados por MALDI-TOF para confirmar la presencia de AfeR en la fracción eluída con 150 mM de imidazol. La muestra fue dializada completamente [durante

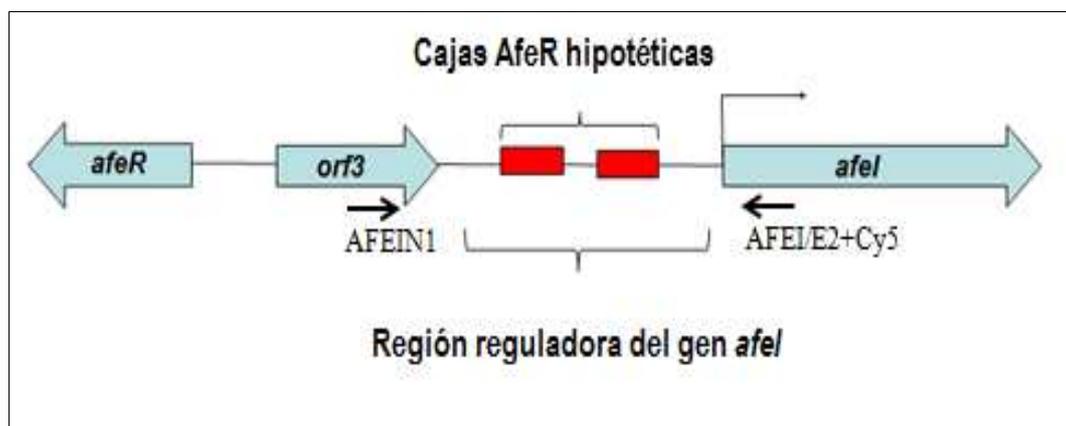
24 horas a 4°C, utilizando el tampón 4 (NaCl 150 mM, Hépes 50 mM, DTT 10 mM, OH-C14-AHL 5 µM, pH 8)] disminuyendo la concentración de urea (2, 0,5 y 0 M), luego fue concentrada y recuperada en 400 µl del mismo tampón. La proteína AfeR se mantuvo a 4°C para su uso en los experimentos de cambio de movilidad electroforética.

### 3.15 Ensayo de cambio de movilidad electroforética

Los ensayos de cambio de movilidad electroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assays – EMSA”) se desarrollaron para identificar el sitio de unión de la proteína AfeR en la región reguladora del gen *afeI* de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. Los experimentos se realizaron utilizando un fragmento de ADN de 360 pb que contiene la secuencia correspondiente a la región reguladora del gen *afeI* (Fig. 20). El fragmento de ADN de 360 pb fue obtenido por PCR utilizando los partidores AFEIN1 y AFEI/E2+Cy5 (partidor que posee en su extremo 5' una Cy5 que permite marcar este fragmento, ver Tabla 8 y Fig. 20). Como control negativo se utilizó un fragmento de ADN de 95 pb correspondiente a una región interna del gen *rrs* que codifica el ARNr 16S de *Thiomonas arsenitoxydans*. Este fragmento de ADN se obtuvo de igual forma que el fragmento de 360 pb utilizando los partidores para el gen *rrs* de *T. arsenitoxydans* (Tabla 8). Para cada reacción se utilizaron 2,3 ng de ADN marcado, 2 µM de proteína (AfeR) y el tampón de reacción (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, Nonidet 0,05%, EDTA 1 mM, Glicerol 10%, OH-C14-AHL 5 µM, DNA de esperma de Herring 3 ng/µl y BSA 100 µg/ml, pH 8). Cada reacción se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una pre-corrida a 30 mA durante 5 minutos de un gel nativo de acrilamida (6%) inmerso en tampón de migración (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 M, EDTA 1 mM, espermidina 200 µM, pH 8,3) para limpiar los carriles del gel. Al finalizar la pre-corrida se cargaron las muestras en el gel de acrilamida y se realizó la electroforesis. Finalmente, el gel fue escaneado (escáner Fujifilm , FLA5100) usando un láser de 635 nm y un filtro rojo de paso largo para observar la migración de los fragmentos de ADN marcados y verificar si la presencia de la proteína AfeR provoca un cambio en la migración del fragmento de ADN de la región reguladora del gen *afeI*.

**Tabla 8.** Partidores utilizados para obtener el fragmento de ADN de la región reguladora del gen *afeI* de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> y el gen *rrs* de *Thiomonas arsenitoxydans*.

Gen	Código partidor	Secuencia 5' - 3'	Amplicon (pb)	Tm (°C)
<i>afeI</i>	AFEIN1	AAGGTACCTGGGGTGGGACTGGCGGATGGA	360	63,4
	AFEI/E2+Cy5	Cy5-GTAGCCGGCCACCTTCGCATAC		55,3
<i>rrs</i>	16S-Cy5	Cy5-CACACCGCCCGTCACACC	95	60
	16S rev2	CCCCAGTCATGAAGCCTACC		60



**Figura 20.** Esquema general del sitio de unión de AfeR. El fragmento de ADN utilizado en los experimentos de EMSA corresponde a la región reguladora del gen *afeI* que contiene las dos cajas AFER. Estas últimas han sido predichas como posibles cajas AfeR. Se indica la posición de los partidores AFEIN1 y AFEI/E2+Cy5 utilizados para amplificar y obtener el fragmento de ADN (360 pb) que contiene las cajas AfeR hipotéticas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Identificación de análogos sintéticos de AHLs que favorecen la adherencia a mineral de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>

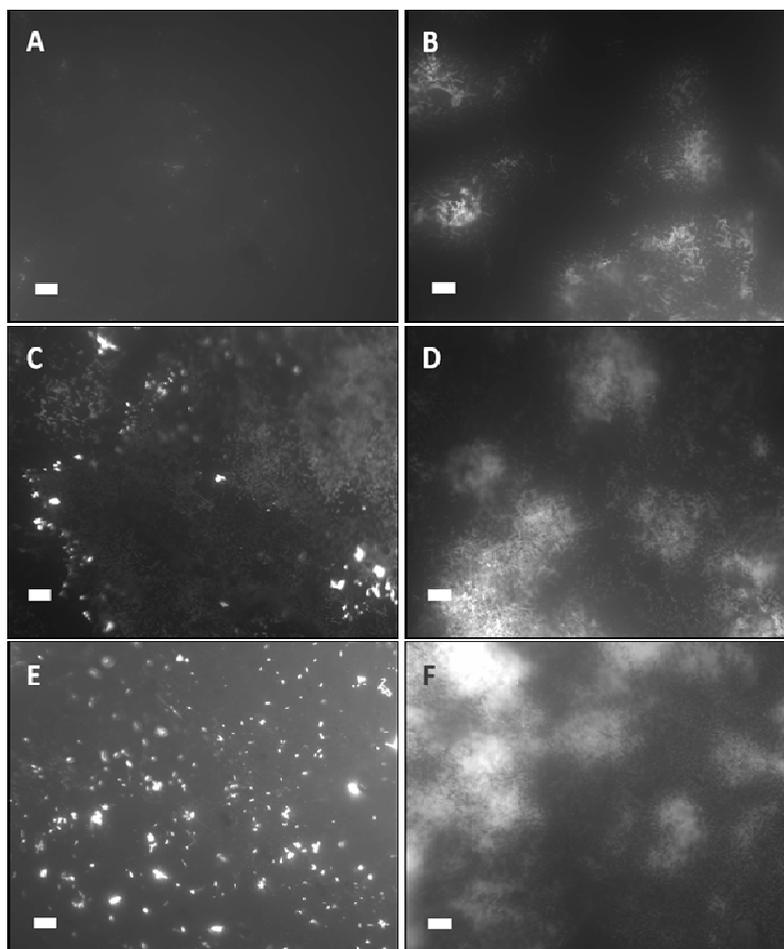
Los componentes del sistema de QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> han sido caracterizados previamente por nuestro laboratorio (Farah y col., 2005; Valenzuela y col., 2007). Sin embargo, los genes regulados por este sistema son aún desconocidos. La identificación del regulón QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> mediante el estudio del transcriptoma de este microorganismo en condiciones donde el regulón QS se encuentre estimulado debería permitir identificarlos. Debido a esto y a la existencia de estudios que demuestran que mediante la utilización de análogos sintéticos de AHLs es posible inducir o inhibir un sistema QS (Reverchon y col., 2002; Castang y col., 2004; Frezza y col., 2006; 2008; Estephane y col., 2008; Geske y col., 2008; Sabbah y col., 2011), en este trabajo nos propusimos profundizar la búsqueda de análogos sintéticos de AHLs que favorezcan la inducción del sistema QS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (González, 2010; González y col., 2013). Esta estrategia se desarrolló mediante experimentos de incubación y crecimiento de las células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de AHLs exógenas, observando la adherencia celular (fenotipo conocido por ser regulado por el sistema QS en otras bacterias, Parsek y Greenberg, 2005) sobre cupones de azufre a distintos intervalos de tiempo de incubación con cada análogo sintético (González y col., 2013). De esta forma, se seleccionaron los análogos sintéticos de AHLs que generan una mayor respuesta de adherencia celular sobre los cupones de azufre.

Los experimentos fueron realizados en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> crecidos en medio 9K modificado hasta fase exponencial ( $2 \times 10^8$  cel/ml), con cupones de azufre en presencia y ausencia de AHLs exógenas durante 9 días de incubación a 30°C. La concentración celular inicial utilizada en cada cultivo fue de  $1 \times 10^7$  cel/ml. La concentración de AHLs exógena fue de 5  $\mu$ M, éstas fueron agregadas al momento del

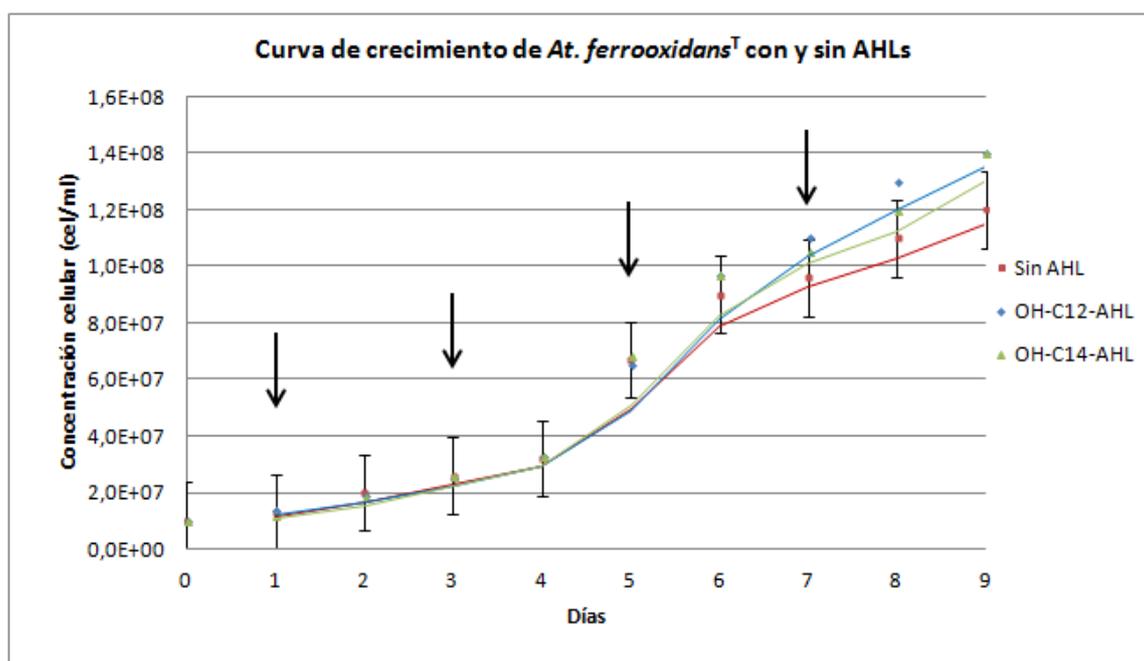
inicio de la incubación. Al examinar mediante microscopía de fluorescencia el grado de adherencia sobre el mineral, se observó que el cupón de azufre del control abiótico (Fig. 21A) no presentó células adheridas, mientras que sí se observaron en el control biótico (Fig. 21B). Por otro lado, se observó una mayor densidad celular adherida sobre los cupones de azufre provenientes de cultivos tratados con C12-AHL (Fig. 21C), OH-C12-AHL (Fig. 21D) y OH-C14-AHL (Fig. 21F) en comparación con lo observado en el cupón de azufre del control biótico. En cambio, el cupón de azufre del cultivo con OH-C10-AHL (Fig. 21E) no mostró gran diferencia en densidad celular adherida en comparación con el control biótico.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa revelaron que al agregar OH-C12-AHL (Fig. 21D) o OH-C14-AHL (Fig. 21F) en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se fomenta una mayor densidad celular adherida sobre el cupón de azufre en comparación con lo observado en cupones de azufre provenientes del cultivo de control biótico sin AHLs exógenas (Fig. 21B). Para corroborar estos resultados se realizó un nuevo experimento utilizando una tinción distinta (LIVE/DEAD *BacLight*) con la cual es posible observar con mayor nitidez el grado de adherencia sobre el mineral. Además, se extrajeron cupones de azufre en distintos puntos de la curva de crecimiento de células planctónicas de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 22) para observar la cinética de adherencia en cultivos con OH-C12-AHL o OH-C14-AHL en comparación con el control biótico (Fig. 23).

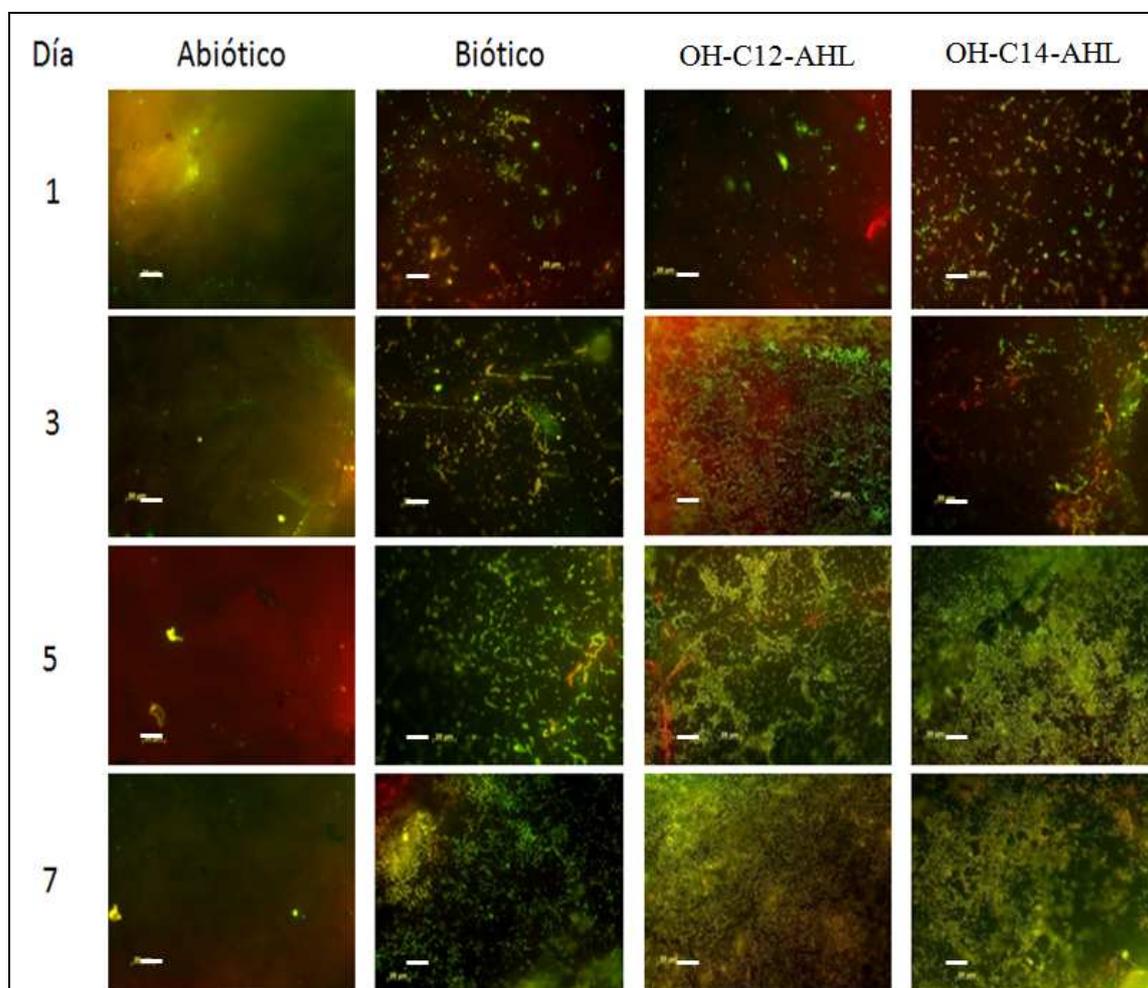
Estos análogos sintéticos de AHL no afectan el crecimiento celular de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 22). Los resultados revelaron que la presencia de OH-C12-AHL y OH-C14-AHL en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> provocan que la adherencia de este microorganismo sobre la superficie de los cupones de azufre ocurra anticipadamente en comparación con cultivos que no presentan AHL exógenas (control biótico). En efecto, se observa que el fenómeno de mayor adherencia en cultivos con OH-C12-AHL y OH-C14-AHL se inicia desde el tercer día de incubación, mientras que esto fue observado desde el quinto día en cultivos sin AHL (Fig. 23).



**Figura 21. Microfotografías de cupones de azufre obtenidas desde cultivos abiótico y bióticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin AHLs.** Los cupones de azufre teñidos con DAPI fueron extraídos desde cada cultivo al 7<sup>mo</sup> día de incubación y observados por microscopía de fluorescencia a 63x. A, cultivo de control abiótico; B, cultivo de control biótico en fase exponencial ( $2 \times 10^8$  cel/ml). Las microfotografías C, D, E y F corresponden a cupones de azufre obtenidos desde cultivos con C12-AHL ( $2,1 \times 10^8$  cel/ml), OH-C12-AHL ( $2,3 \times 10^8$  cel/ml), OH-C10-AHL ( $2,3 \times 10^8$  cel/ml) y OH-C14-AHL ( $2,2 \times 10^8$  cel/ml) respectivamente. La barra blanca indica 50  $\mu$ m.



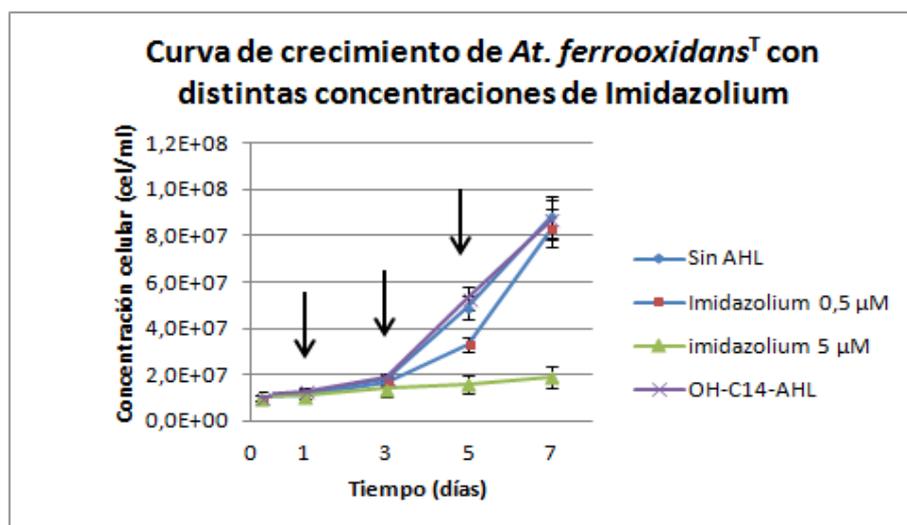
**Figura 22.** Curvas de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin AHLs. Los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fueron crecidos en medio 9K modificado con cupones de azufre y una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. En rojo (■) corresponde a un cultivo de control biótico sin AHLs, en azul (◆) un cultivo con OH-C12-AHL y en verde (▲) un cultivo con OH-C14-AHL (AHLs 5  $\mu$ M). Las flechas indican los días de extracción de los cupones de azufre.



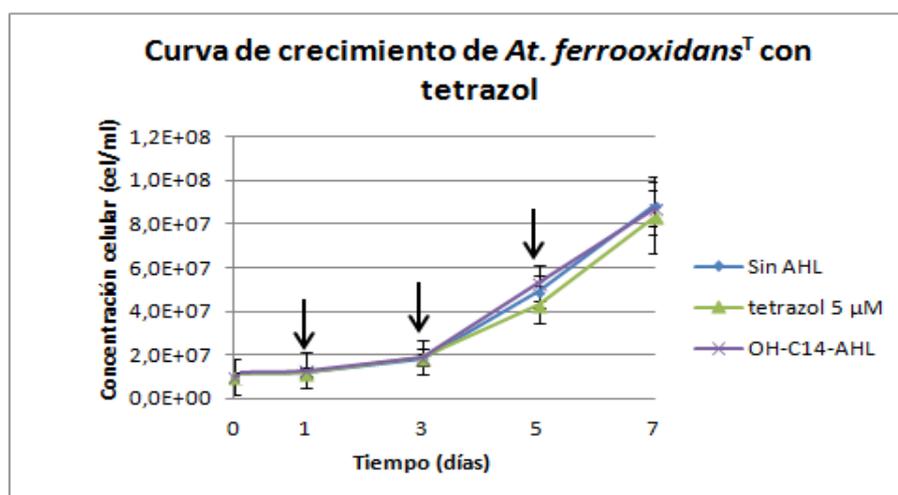
**Figura 23.** Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos abiótico y bióticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin OH-C12-AHL y OH-C14-AHL. Los cupones de azufre fueron obtenidos en distintos puntos de la curva de crecimiento de células planctónicas de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> desde cultivos de control abiótico, control biótico y con AHLs OH-C12-AHL y OH-C14-AHL. Estos fueron teñidos con LIVE/DEAD BacLight y observados por microscopía de fluorescencia a 63x. La barra blanca indica 20  $\mu\text{m}$ .

En la búsqueda de un análogo sintético de AHLs que favorezca la adherencia a mineral, se realizaron otros experimentos de adherencia en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con nuevos análogos sintéticos de AHLs obtenidos gracias a la colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Doutheau y el Dr. Queneau (INSA-CNRS, Francia). Los análogos sintéticos de AHLs analizados fueron tetrazol e imidazolium. Estas dos moléculas estimula e inhibe respectivamente el sistema de comunicación QS de acuerdo a los experimentos realizados por el grupo de investigación a cargo del Dr. Doutheau (Sabbah y col., 2011; 2012; des Essarts y col., 2013). Para ambos análogos sintéticos de AHLs los experimentos de adherencia se realizaron de igual forma que los ejecutados para las moléculas OH-C12-AHL y OH-C14-AHL (Fig. 24 - 27).

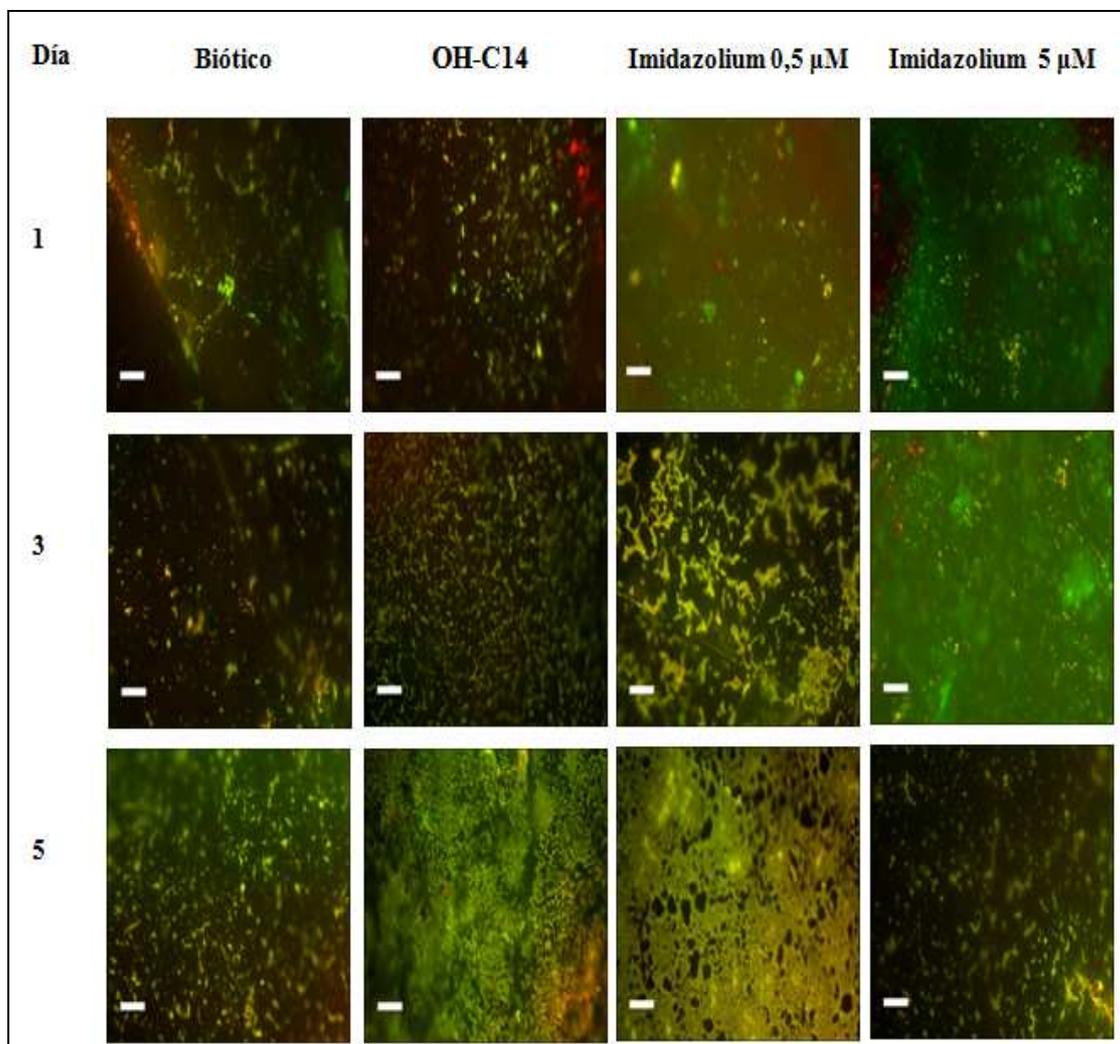
Los resultados obtenidos en los experimentos de adherencia sobre la superficie de cupones de azufre en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con imidazolium indicaron que este análogo sintético puede causar un efecto negativo en el crecimiento y por lo tanto también en la adherencia celular. En los cultivos con 5  $\mu$ M de imidazolium el crecimiento celular fue severamente inhibido (Fig. 24), por lo que no es sorprendente haber observado una menor adherencia celular sobre los cupones de azufre de éstos cultivos en comparación con los cupones obtenidos desde el cultivo de control biótico (Fig. 26). En cambio, los cultivos con 0,5  $\mu$ M de imidazolium presentaron un crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> similar al del control biótico (Fig. 24) y una mayor adherencia celular sobre los cupones de azufre (Fig. 26). Por otro lado, los experimentos con tetrazol revelaron que este análogo sintético no afecta el crecimiento celular de este microorganismo (Fig. 25). Además, los cupones de azufre obtenidos desde cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con una concentración de 5  $\mu$ M de éste análogo sintético presentaron un efecto positivo en la adherencia celular, siendo ésta mayor que la observada sobre los cupones de azufre obtenidos desde el cultivo de control biótico (Fig. 27). Por último, al comparar la adherencia celular generada por las moléculas OH-C14-AHL y tetrazol durante el tercer día de incubación, se observó que este último análogo sintético provoca un mayor estímulo en la adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre los cupones de azufre (Fig. 27).



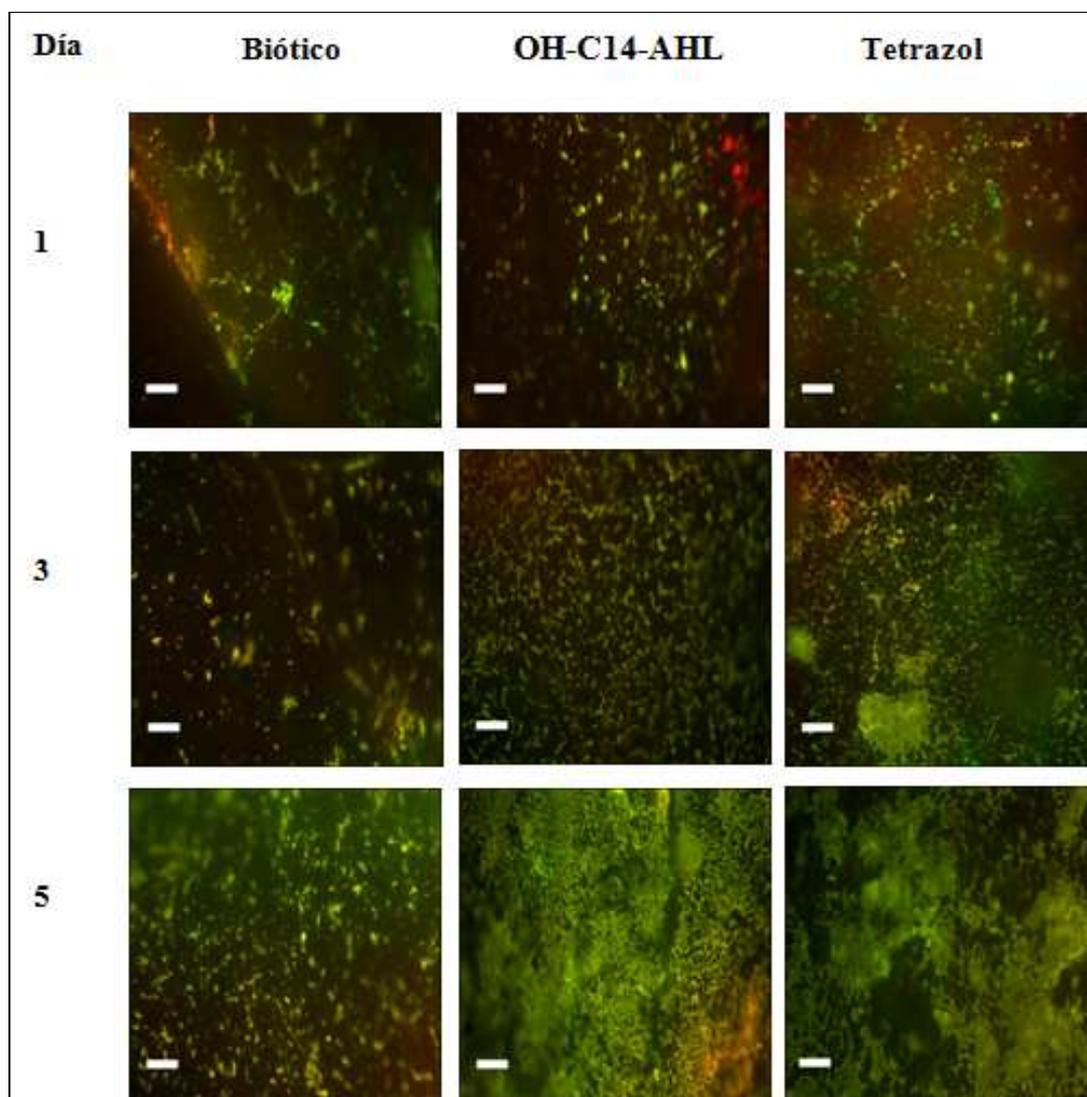
**Figura 24.** Curvas de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin imidazolium. Los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fueron crecidos en presencia de 5 (▲) y 0,5 (■) μM de imidazolium o OH-C14-AHL (×) en medio 9K modificado con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. (◻) corresponde a un cultivo biótico sin AHLs. Las flechas indican los días de extracción de los cupones de azufre.



**Figura 25.** Curvas de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin tetrazol. Los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fueron crecidos en presencia de 5 μM de tetrazol (▲) o OH-C14-AHL (×) en medio 9K modificado con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. (◻) corresponde a un cultivo biótico sin AHLs. Las flechas indican los días de extracción de los cupones de azufre.



**Figura 26.** Microfotografías de cupones de azufre obtenidas desde cultivos bióticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin imidazolium. Los cupones de azufre fueron obtenidos en distintos puntos de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> desde cultivos sin AHL exógena (control biótico), con OH-C14-AHL (5  $\mu$ M, control de adherencia) e imidazolium (5 y 0,5  $\mu$ M). Estos fueron teñidos con LIVE/DEAD BacLight y observados por microscopía de fluorescencia a 63x. La barra blanca indica 20  $\mu$ m.

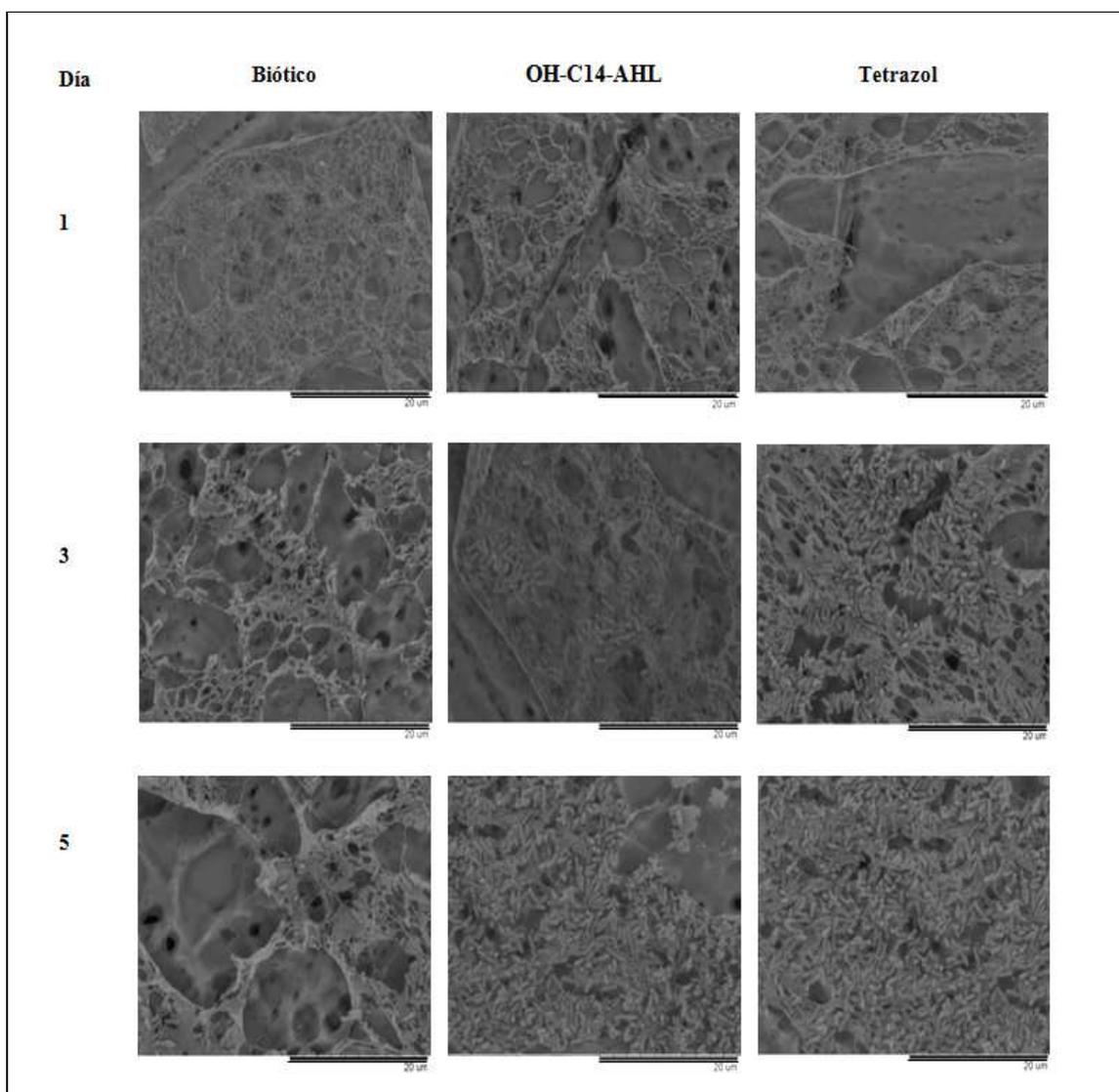


**Figura 27.** Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos bióticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin tetrazol. Los cupones de azufre fueron obtenidos en distintos puntos de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> desde cultivos sin AHL exógena (control biótico), con OH-C14-AHL (control de adherencia) y tetrazol (5  $\mu$ M para ambos análogos sintéticos). Estos fueron teñidos con LIVE/DEAD BacLight y observados por microscopía de fluorescencia a 63x. La barra blanca indica 20  $\mu$ m.

Para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de adherencia con los análogos sintéticos OH-C14-AHL y tetrazol se realizaron nuevos experimentos utilizando la técnica de microscopía electrónica de barrido. Los cupones de azufre provenientes de cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> que contienen estos análogos sintéticos (5 μM) fueron analizados. Los resultados obtenidos por microscopía electrónica confirman los resultados analizados por microscopía de fluorescencia, indicando que ambos análogos sintéticos inducen tempranamente (día tres de incubación) una mayor adherencia celular en comparación con los resultados obtenidos en cupones provenientes del control biótico. Además, se confirma que tetrazol induce una mayor adherencia celular que OH-C14-AHL en el mismo intervalo de tiempo (Fig. 28).

En conclusión, los resultados obtenidos en los experimentos de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido indican que las moléculas OH-C14-AHL y tetrazol generan una mayor adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre los cupones de azufre. Además, estos análogos sintéticos no afectan el crecimiento celular y provocan una adherencia de este microorganismo anticipada (día 3 de incubación) en comparación con la adherencia celular observada en los cupones de azufre obtenidos en el control biótico (día 5 de incubación, Fig. 23, 27 y 28). En contraste, los experimentos de adherencia realizados con el análogo sintético imidazolium muestran que esta molécula inhibe el crecimiento celular, lo cual genera una disminución de la adherencia de células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre los cupones de azufre.

Por todo lo anterior, para realizar los análisis transcriptómicos se utilizaron las moléculas OH-C14-AHL y tetrazol debido a que ambas al acelerar el fenómeno de adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre los cupones de azufre promueven la formación de biopelículas en esta bacteria. Debido a que este fenotipo se encuentra regulado por el sistema QS (Parsek y Greenberg, 2005), nos indica que estas moléculas están induciendo dicho sistema de comunicación bacteriana, condición que deseamos estudiar.



**Figura 28.** Microfotografías de cupones de azufre obtenidos desde cultivos bióticos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol y OH-C14-AHL. Los cupones de azufre fueron obtenidos en distintos puntos de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> desde cultivos sin AHL exógena (control biótico), con OH-C14-AHL y tetrazol (ambos análogos sintéticos con una concentración de 5 μM). Estos fueron secados a punto crítico y sombreados con oro para ser observados por microscopía electrónica de barrido. La barra negra indica 20 μm.

## **4.2 Estudio del transcriptoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs para identificar aquellos genes regulados por QS, en particular aquellos involucrados en la adherencia sobre sustrato mineral**

### **4.2.1 Identificación del tiempo cuando el sistema QS se encuentra estimulado por análogos sintéticos de AHL mediante el estudio de los niveles de ARNm de *afeI* (gen involucrado en el sistema QS) dentro de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>**

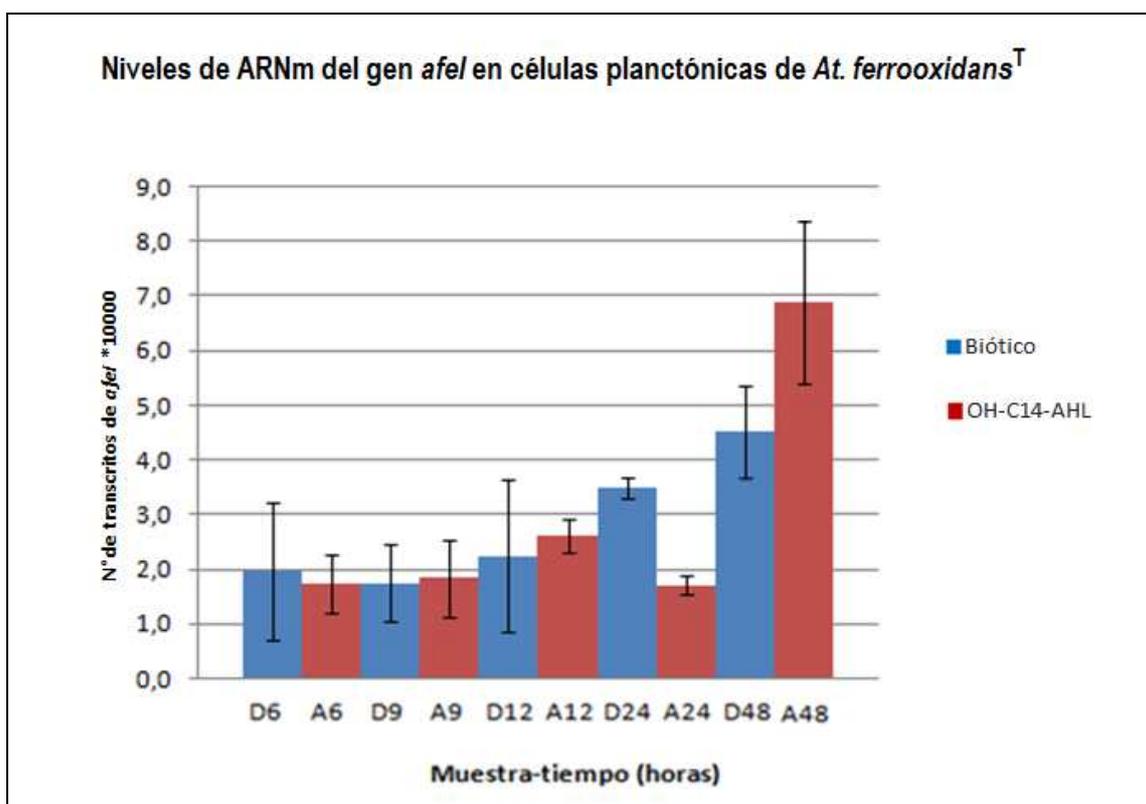
Para identificar el tiempo cuando el sistema QS se encuentra estimulado por análogos sintéticos de AHL dentro de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se analizó la expresión diferencial de *afeI* debido a que este gen codifica para una AHL sintasa que participa en el sistema QS y su expresión se encuentra regulada por dicho sistema (Rivas y col., 2005).

Con la finalidad de estudiar la expresión diferencial del gen *afeI* en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> y determinar las condiciones para realizar los experimentos de microarreglos de ADN en presencia y ausencia de un análogo sintético de AHLs, propusimos caracterizar el perfil de expresión del gen *afeI* mediante la técnica de qRT-PCR. Los resultados obtenidos en los ensayos de adherencia indicaron que el sistema QS se encontraría estimulado en cultivos sin inducción con AHL exógeno entre el 3<sup>er</sup> y 5<sup>to</sup> día de incubación (Fig. 23, 27 y 28). En cambio, en cultivos inducidos por una molécula de AHL como OH-C14-AHL o tetrazol, el sistema QS se encontraría estimulado entre el 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> día de incubación (Fig. 23, 27 y 28). De acuerdo a estos resultados, decidimos estudiar el perfil de expresión de *afeI* entre el 3<sup>er</sup> día (tiempo cuando se observó el fenómeno de adherencia celular en cultivos inducidos con OH-C14-AHL y tetrazol) y el 5<sup>to</sup> día de incubación (tiempo cuando se observó el fenómeno de adherencia en cultivos sin AHL) en distintos intervalos de tiempo. Para esto, realizamos cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (1 L) con una concentración celular inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml, iniciando la inducción del regulón QS con OH-C14-AHL (5  $\mu$ M) en el 3<sup>er</sup> día de incubación del cultivo para analizar el efecto propio

de la molécula de AHL y el tiempo que demora en inducir la expresión de *afeI*, y por ende del sistema QS. Los cultivos utilizados como control biótico fueron realizados de la misma forma sin OH-C14-AHL. De estos cultivos se extrajeron muestras de ARN total desde células planctónicas (200 ml de cultivo para cada muestra) a las 6, 9, 12, 24 y 48 horas post-inducción con la molécula.

Los resultados obtenidos revelaron una disminución significativa ( $P= 0,0003$ ) en los niveles de ARNm del gen *afeI* respecto al control biótico (D24) a las 24 horas post-inducción del regulón QS con OH-C14-AHL (A24). A las 48 horas post-inducción (A48) aunque se observó un aumento en la expresión de *afeI* en comparación con el control biótico (D48), no fue significativo ( $P= 0,07$ ). Por otro lado, fue posible observar que la expresión diferencial de *afeI* aumenta significativamente ( $P<0,05$ ) desde las 6 a las 48 horas de incubación tanto en cultivos con y sin OH-C14-AHL (Fig. 29). Estos resultados sugieren que no existe un efecto evidente generado por OH-C14-AHL durante las 48 horas post-inducción en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> y que el aumento significativo de la expresión diferencial de *afeI* puede deberse a la presencia de AHL endógeno. Debido a esto, utilizamos otra estrategia para estudiar la expresión diferencial de *afeI*; i) cambiamos el análogo sintético de AHL por tetrazol, puesto que se observó que induce una mayor adherencia que OH-C14-AHL durante el 3<sup>er</sup> día de incubación y ii) se utilizó el tetrazol desde el inicio del tiempo de incubación de los cultivos

Para esclarecer cuándo el sistema QS pudiese ser estimulado *in vivo* por AHLs exógena, se realizaron otros experimentos de qRT-PCR (incluyendo los cambios antes mencionados) para estudiar la expresión diferencial del gen *afeI* y otros genes como *afeR* (codifica el regulador transcripcional tipo R que participa en el sistema QS, Farah y col., 2005), *zwf* (AFE\_2025, codifica una proteína involucrada en los niveles de glucosa-6P, un precursor de los EPS), *wcaA* (AFE\_0233, codifica una proteína de la familia glicosil transferasa) y AFE\_1339 (codifica una proteína con dominio de biosíntesis / exportación de



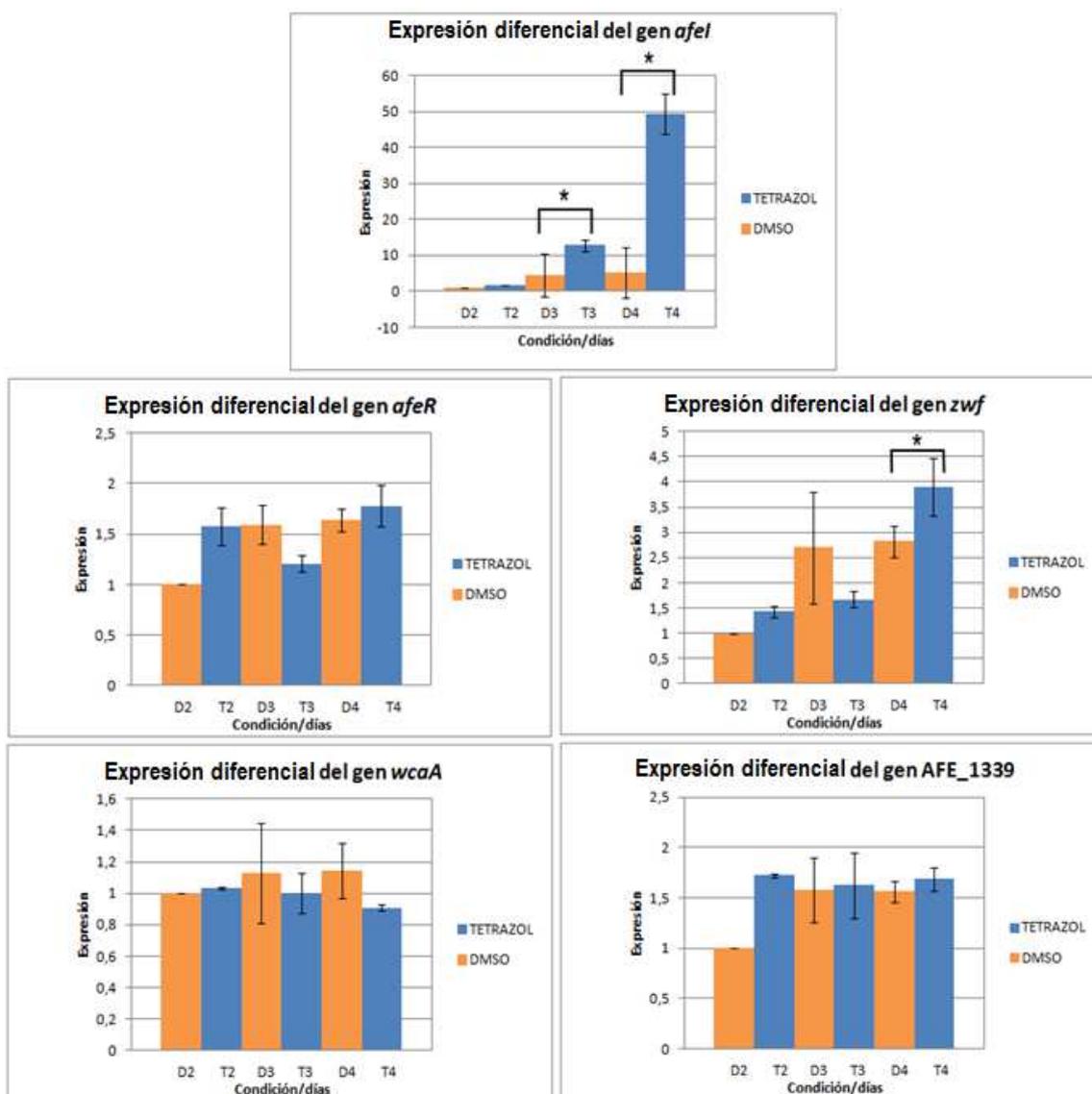
**Figura 29.** Análisis de la expresión diferencial del gen *afeI* en cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de OH-C14-AHL. El ARN total empleado para este análisis fue extraído de células planctónicas crecidas en medio 9K modificado con perlas de azufre durante la fase exponencial temprana de crecimiento. Los cultivos fueron crecidos con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml con y sin OH-C14-AHL (5  $\mu$ M) agregada a partir del tercer día de crecimiento. Posteriormente, se extrajo 200 ml de cultivo a las 6, 9, 12, 24 y 48 horas post-inducción con y sin la molécula. D (DMSO), control biótico sin AHL. A (AHL), cultivo con OH-C14-AHL. Se realizaron 3 réplicas biológicas de cada condición (con y sin OH-C14-AHL) a los distintos tiempos de inducción. La barra representa la desviación estándar.

polisacáridos). Los experimentos fueron realizados con ARN total de células planctónicas provenientes de cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin tetrazol desde el inicio de la incubación. De acuerdo a los resultados de los ensayos de adherencia (Fig. 27 y 28), la extracción de ARN total para los nuevos experimentos de qRT-PCR se realizó el 2<sup>do</sup>, 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> día de incubación con tetrazol desde cultivos independientes.

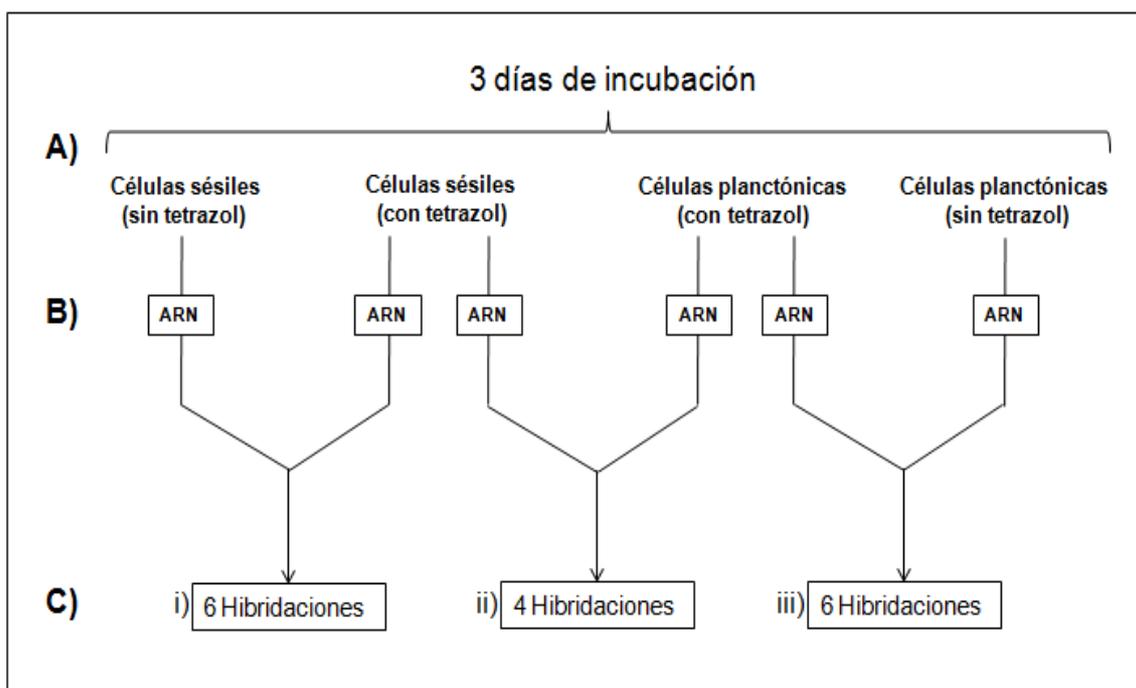
Los resultados indicaron que la expresión diferencial del gen *afeI* aumenta sus niveles de ARNm significativamente ( $P < 0,05$ ) en cultivos con tetrazol durante el 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> día post-incubación. Además, se observa que *zwf* aumenta sus niveles de ARNm el 4<sup>to</sup> día de incubación con tetrazol ( $P=0,04$ ), mientras que *afeR*, *wcaA* y AFE\_1339 fueron constitutivamente expresados con y sin tetrazol (Fig. 30). Estos resultados indicaron que es posible inducir el sistema QS en células planctónicas de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> mediante la adición en el medio de cultivo de un análogo sintético de AHL como tetrazol.

#### **4.2.2 Análisis de la expresión global de los genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia o ausencia de análogos sintéticos de AHLs**

Los perfiles de expresión genómica de las células sésiles y planctónicas de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> crecidas en medio 9K modificado con perlas de azufre con y sin tetrazol, fueron determinados mediante la técnica de microarreglos de ADN. Las condiciones experimentales se determinaron según los resultados obtenidos en los ensayos de adherencia y los experimentos de qRT-PCR que indicaron la existencia de una mayor adherencia (Fig. 28) y una mayor expresión del gen *afeI* (Fig. 30) desde el 3<sup>er</sup> día de incubación en cultivos con tetrazol comparado con cultivos sin AHL. Por esta razón, se decidió realizar los experimentos de microarreglos de ADN con muestras de ARN total extraídas desde células sésiles y planctónicas incubadas durante tres días con tetrazol y sin este análogo sintético (cultivos con DMSO, solvente para el tetrazol). Se realizaron tres réplicas biológicas de muestras de ARN total desde células sésiles y planctónicas crecidas con y sin tetrazol para realizar 16 hibridaciones (Fig. 31, Tabla 4 de Materiales y Métodos).



**Figura 30. Análisis de la expresión diferencial de los genes *afeI*, *afeR*, *zwf*, *wcaA* y *AFE\_1339* en cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol.** El ARN total empleado para estos análisis fue extraído de células planctónicas crecidas en medio 9K modificado con perlas de azufre, con y sin tetrazol (5  $\mu$ M), con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. D (DMSO, control biótico sin AHL), T (tetrazol). Se realizaron 3 réplicas biológicas para cada condición (con y sin tetrazol) a los distintos tiempos de inducción (2, 3 y 4 días). La barra representa la desviación estándar. El asterisco (\*) indica el coeficiente de correlación significativo al nivel 0,05.



**Figura 31. Esquema de la estrategia experimental de los microarreglos de ADN para células sésiles y planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol.** **A**, los cultivos de células sésiles y planctónicas crecidas en medio 9K modificado con perlas de azufre, con y sin tetrazol (5  $\mu$ M) y con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml, fueron incubados por tres días y realizados de acuerdo al protocolo de preparación de cultivos para la extracción de ARN total (ver Materiales y Métodos, Fig. 11). Para cada condición experimental (células sésiles con y sin tetrazol y células planctónicas con y sin tetrazol) se realizaron tres réplicas biológicas. **B**, se extrajo las muestras de ARN total para cada condición experimental. **C**, se desarrollaron 16 hibridaciones de las cuales: i) seis hibridaciones representan la comparación de ARN total de células sésiles con y sin tetrazol, y corresponden a cuatro comparaciones independientes (muestras biológicas independientes) y dos intercambios de fluoróforo o “dye swap”, ii) cuatro hibridaciones representan la comparación de ARN total de células sésiles y células planctónicas ambas con tetrazol, y corresponden a tres comparaciones independientes y un intercambio de fluoróforo, iii) seis hibridaciones representan la comparación de ARN total de células planctónicas con y sin tetrazol, y corresponden a cuatro comparaciones independientes y dos intercambios de fluoróforo.

Para identificar los genes diferencialmente expresados en presencia de tetrazol se empleó el siguiente criterio: sólo los genes con valores  $< 5E^{-2}$  ( $\geq 95\%$  de confianza) del “One Sample t-Test Benjamini-Hochberg (Adv)” fueron considerados. De acuerdo a esto y al valor obtenido del  $\log_2^{\text{DMSO}/\text{tetrazol}}$ : i) los genes con valores  $\leq -1,0$  fueron considerados como genes sobre-expresados en presencia de la molécula y ii) los genes con valores  $\geq 1,0$  fueron considerados como genes reprimidos con este análogo sintético. Este criterio se aplicó para analizar el efecto de la molécula sobre células sésiles y planctónicas comparando muestras de ARN total de células sin tetrazol (DMSO) versus el ARN total de células con tetrazol.

Por otro lado, para identificar los genes diferencialmente expresados en células sésiles, se comparó las muestras de ARN total provenientes desde células sésiles con tetrazol versus las muestras de ARN total de células planctónicas con tetrazol. Para el análisis de estas hibridaciones se utilizaron los siguientes valores en base al  $\log_2^{\text{sésiles}/\text{planctónicas}}$ : i) los genes con valores  $\leq -1,0$  fueron considerados como genes reprimidos en células sésiles y ii) los genes con valores  $\geq 1,0$  fueron considerados como genes sobre-expresados en células sésiles.

En base a los criterios descritos anteriormente, se obtuvieron resultados significativos para los tres tipos de hibridaciones: i) células planctónicas con y sin tetrazol, ii) células sésiles con y sin tetrazol y iii) células sésiles con tetrazol versus células planctónicas con tetrazol.

### **Tranccripción global de células planctónicas con y sin tetrazol**

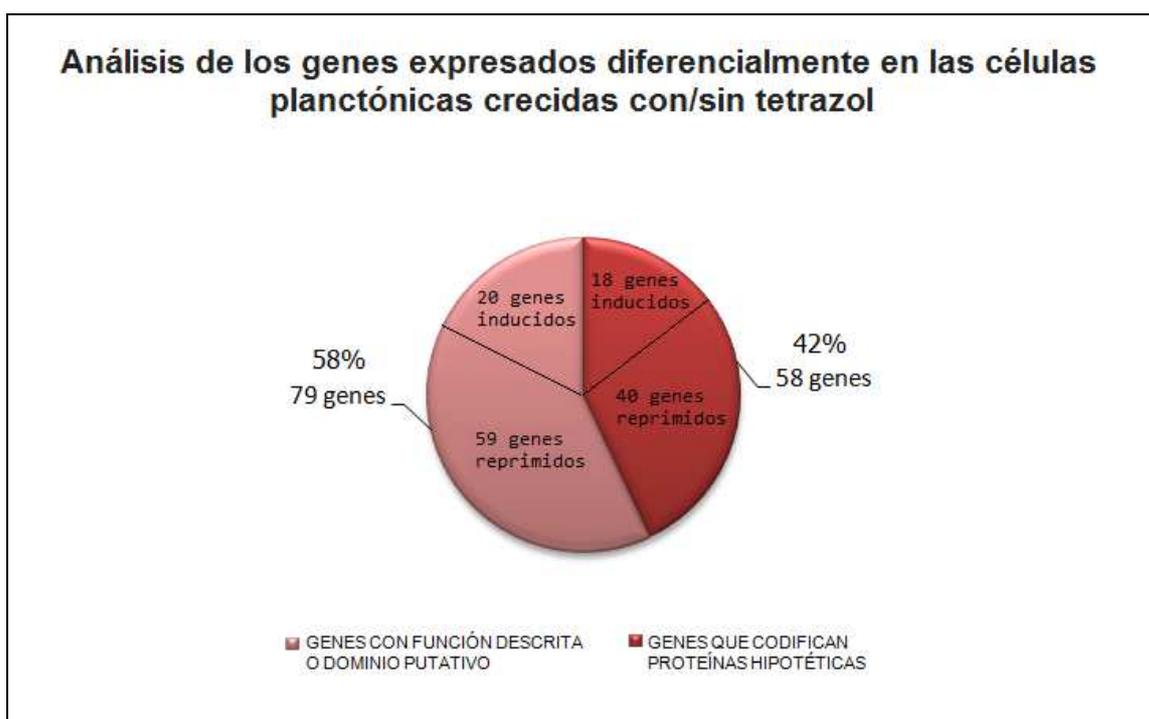
Los resultados obtenidos al comparar el ARN total de células planctónicas con y sin tetrazol indicaron que 137 genes (4,35% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, Anexos 1 y 2) presentaron cambios significativos en sus niveles de ARNm en presencia de esta molécula. El 42% de estos genes codifican proteínas hipotéticas (40 genes reprimidos y 18

sobre-expresados), mientras que el 58% son genes que exhiben una función biológica descrita o un dominio putativo (59 genes reprimidos y 20 sobre-expresados) (Fig. 32). Resultados similares se han observado previamente en estudios de microarreglos de ADN en *E. coli*, donde aproximadamente el 5,6% del genoma de esta bacteria responde a la presencia de un análogo sintético de AHL (DeLisa y col., 2001).

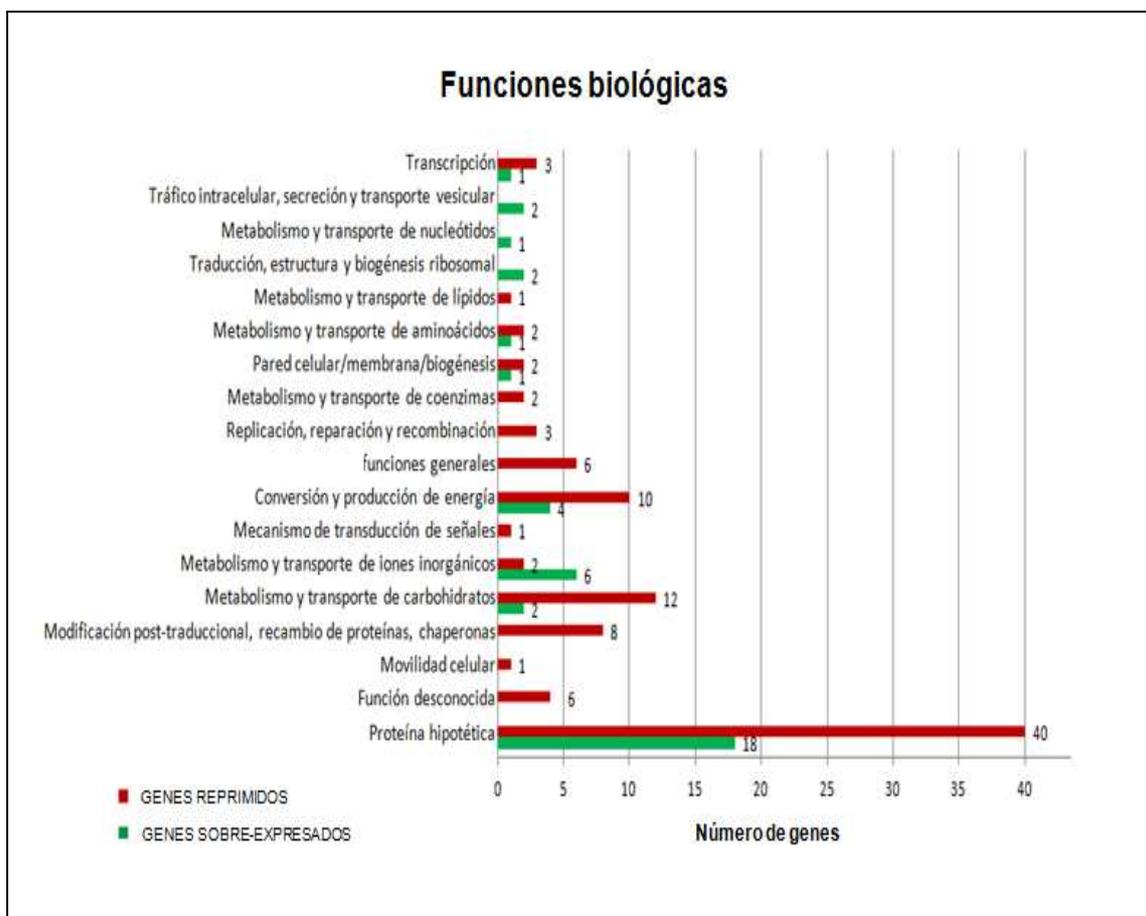
Los 137 genes que están diferencialmente expresados en células planctónicas con tetrazol fueron clasificados según el proceso o función celular con la cual se encuentran relacionados. De acuerdo a la clasificación de grupos de genes ortólogos (COG, “Clusters of Orthologous Groups”), gran parte de estos genes se encuentran sobre-expresados en el metabolismo y transporte de iones inorgánicos y reprimidos en el metabolismo y transporte de carbohidratos, conversión y producción de energía, modificación post-traducciona, recambio de proteínas y chaperonas (Fig. 33).

Para identificar el sistema metabólico en la cual participa cada gen y caracterizar la acción específica realizada por éstos, se clasificaron los 137 genes utilizando la base de datos KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”), puesto que en ella se describe en detalle la acción desarrollada de las proteínas codificadas por cada uno de los genes. Esta clasificación indicó que sólo 34 de los 137 genes analizados presentaron una función biológica descrita en esta base de datos, mientras que un gran porcentaje de estos genes (75,1%, 103 genes) corresponden a genes que codifican proteínas hipotéticas (58 genes) y genes que sólo presentaron dominios putativos (45 genes, Fig. 34).

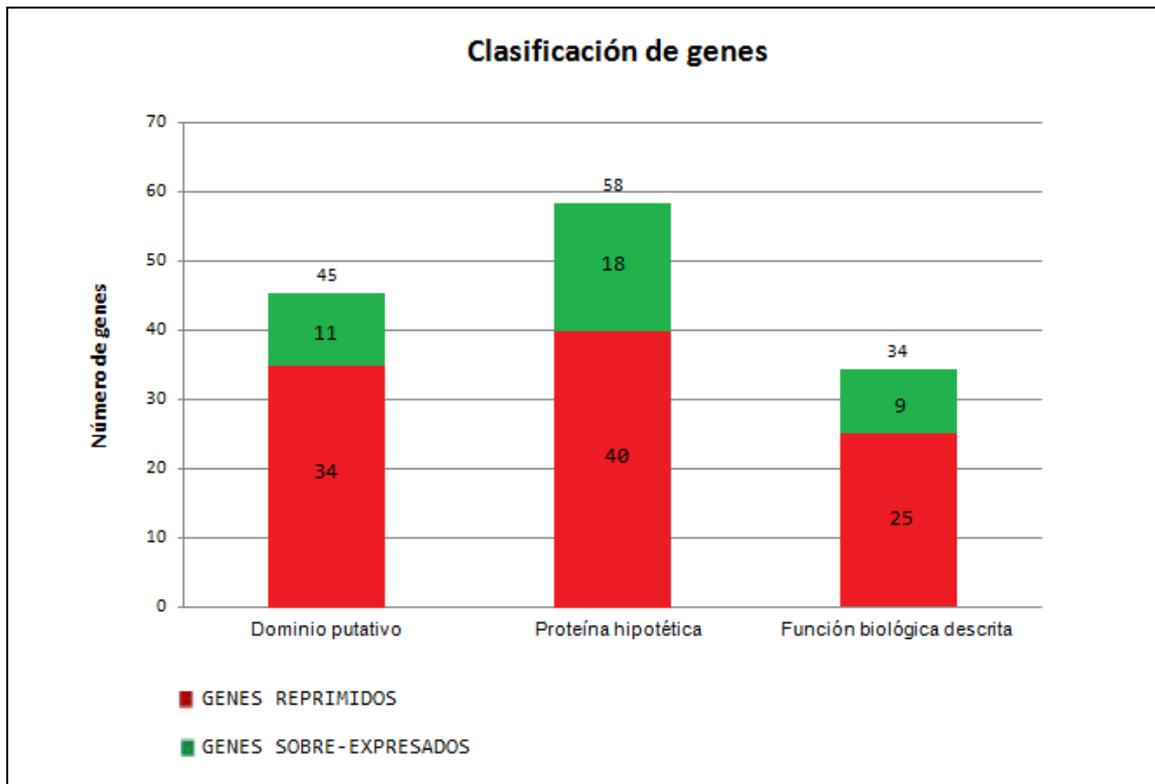
Los 34 genes que presentaron una función descrita en la base de datos KEGG participan en 37 sistemas metabólicos, en los cuales 9 genes se encuentran sobre-expresados y 25 reprimidos. Los genes sobre-expresados participan mayoritariamente en la estructura del ribosoma, transportadores ABC y fosforilación oxidativa, mientras que los genes reprimidos participan en su mayoría en la glicólisis y gluconeogénesis, la vía de la pentosa fosfato y el metabolismo del almidón y la sacarosa (Anexos 1 y 2).



**Figura 32. Análisis de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con/sin tetrazol.** Un total de 137 genes presentaron una expresión diferencial significativa en células planctónicas con tetrazol. De éstos, 79 genes (58%) presentan una función biológica descrita o un dominio putativo (encontrándose 20 inducidos y 59 reprimidos) y 58 genes (42%) codifican proteínas hipotéticas (18 genes inducidos y 40 reprimidos).



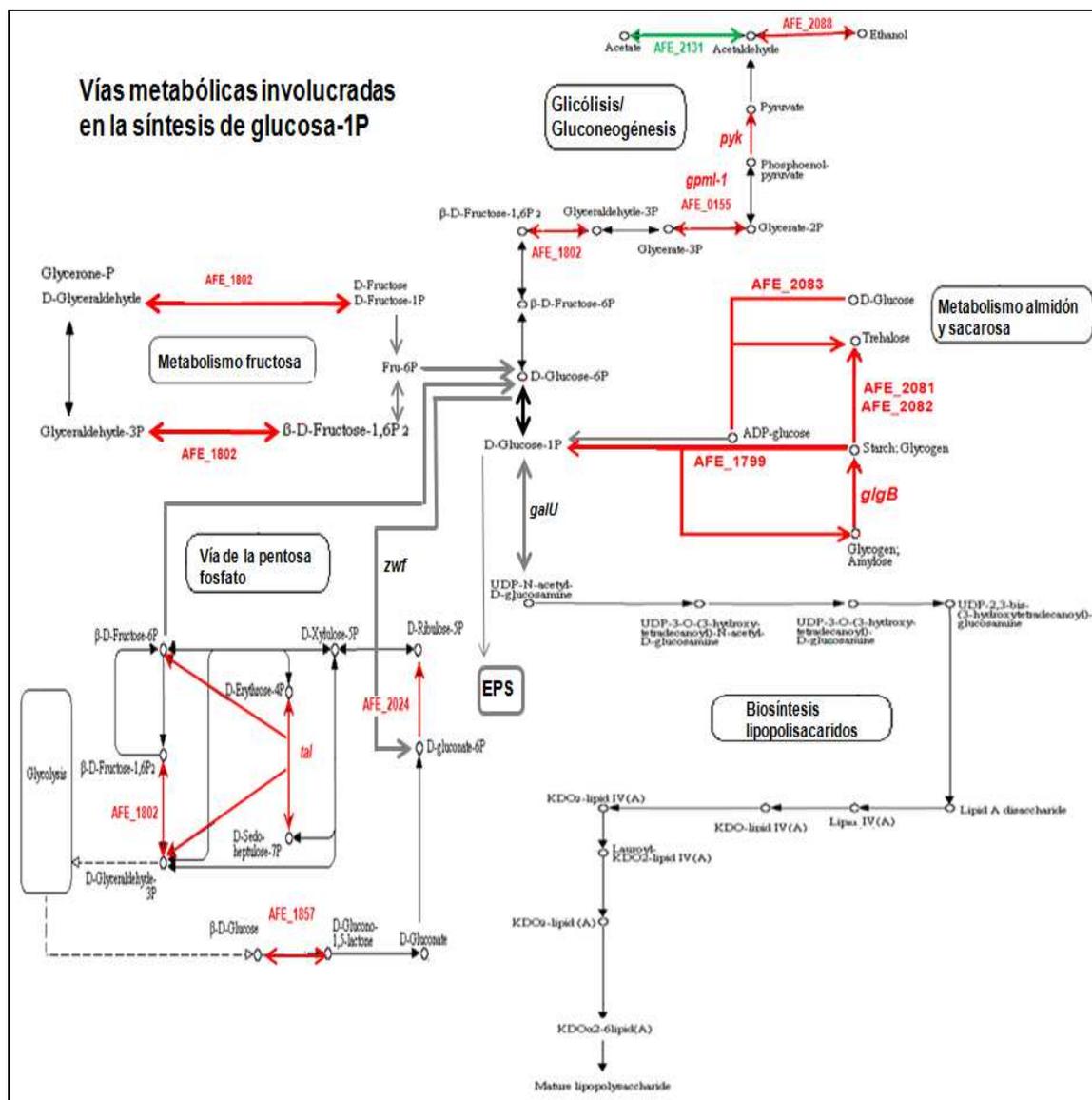
**Figura 33. Clasificación COG de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** La clasificación de los 137 genes se realizó de acuerdo a la función biológica de cada gen y según esta función, cada gen pertenece a una categoría dentro del grupo de genes ortólogos (COG). Los valores del  $\log_2 \frac{\text{planctónicas DMSO}}{\text{planctónicas tetrazol}} \geq 1,0$  corresponden a los genes reprimidos en células planctónicas, mientras que los valores del  $\log_2 \frac{\text{planctónicas DMSO}}{\text{planctónicas tetrazol}} \leq -1,0$  corresponden a los genes sobre-expresados en células planctónicas.



**Figura 34. Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados en células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** La clasificación de los 137 genes de acuerdo a la base de datos KEGG indica que 34 genes poseen una función biológica descrita, 58 genes codifican proteínas hipotéticas y 45 genes sólo presentan un dominio putativo. Las barras rojas representan los genes reprimidos y las barras verdes los genes sobre-expresados.

Dentro de los genes sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol, los genes *rpmF* (AFE\_1904, proteína ribosomal 50S L32) y *rpmB* (AFE\_2670, proteína ribosomal 50S L28) participan en la estructura del ribosoma, mientras que los genes *pstS-1* (AFE\_1939, proteína de unión a sustrato fosfato transportador ABC) y *pstC-2* (AFE\_1940, permeasa fosfato transportador ABC) participan como transportadores ABC. Los genes *atpF* (AFE\_3207, ATP sintasa F0 subunidad B), *atpE* (AFE\_3208, ATP sintasa F0 subunidad C) y *atpB* (AFE\_3209, ATP sintasa F0 subunidad A) participan en la fosforilación oxidativa.

Dentro de los genes que se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol y que participan en la glicólisis y gluconeogénesis, los genes AFE\_0155 (proteína de la familia fosfoglicerato mutasa), *pyk* (AFE\_1801, piruvato quinasa), AFE\_1802 (aldolasa), *gpml-1* (AFE\_1815, fosfogliceromutasa) y AFE\_2088 (proteína de la familia alcohol deshidrogenasa de unión a zinc) presentaron una expresión diferencial significativa. Sin embargo, el gen AFE\_2131 (proteína de la familia aldehído deshidrogenasa, NAD) que también participa en la glicólisis y gluconeogénesis se observó sobre-expresado. Todos los genes antes mencionados se encuentran directamente relacionados con la síntesis de la fructosa-6P y la glucosa-6P, sustratos para la síntesis de glucosa-1P. En la vía de la pentosa fosfato se encontraron reprimidos los genes *tal* (AFE\_0419, transaldolasa), AFE\_1802, AFE\_1857 (glucosa 1-deshidrogenasa) y AFE\_2024 (6-fosfogluconato deshidrogenasa), todos ellos relacionados con la síntesis de la fructosa-6P, un precursor para la síntesis de la glucosa-1P. Por último, en el metabolismo del almidón y la sacarosa los genes AFE\_1799 (proteína de la familia alfa-glucano fosforilasa) y *glgB* (AFE\_2836, proteína de ramificación 1,4-alfa-glucano) se encontraron reprimidos inhibiendo la síntesis de maltodextrinas que han sido relacionadas con la adherencia (Nemcová y col., 2007), mientras que los genes AFE\_2083 (glicosiltransferasa del grupo 1), AFE\_2081 y AFE\_2082 (proteínas de la familia alfa-amilasa) se encontraron reprimidos en presencia de tetrazol generando una inhibición en la síntesis de trehalosa y el consumo de ADP-glucosa y almidón (Fig. 35).



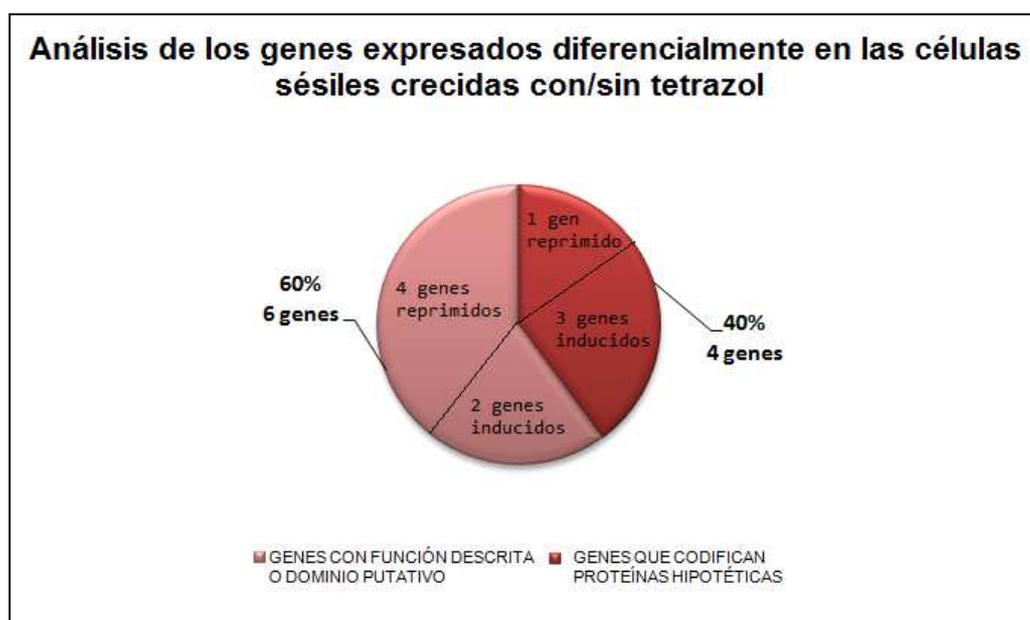
**Figura 35. Vías metabólicas involucradas en la síntesis de glucosa-1P y afectadas por la presencia de tetrazol en células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.** Cuatro vías metabólicas se encuentran relacionadas con la síntesis de glucosa-1P y la síntesis de precursores de EPS; la vía de la pentosa fosfato, metabolismo de la fruktosa y manosa, metabolismo del almidón y la sacarosa, glicólisis y gluconeogénesis. En ellas la mayoría de los genes en células planctónicas con tetrazol se encuentran reprimidos (flechas rojas), excepto el gen AFE\_2131 que se encuentra sobre-expresado (flecha verde).

En conclusión, los resultados revelaron que en células planctónicas el tetrazol genera un efecto significativo sobre los niveles de ARNm de 137 genes, de los cuales 7 genes se encuentran reprimidos participando en la estructura del ribosoma, transportadores ABC y fosforilación oxidativa, mientras que 14 genes (1 sobre-expresado y 13 reprimidos) participan en cuatro sistemas metabólicos (glicólisis y gluconeogénesis, vía de la pentosa fosfato, metabolismo de la fructosa y el metabolismo del almidón y la sacarosa) que se encontrarían relacionados con la síntesis de glucosa-1P, molécula que es uno de los principales sustratos para la síntesis de los precursores de EPS (Quatrini y col., 2007). Estos resultados sugieren que en células planctónicas con tetrazol los genes reprimidos AFE\_0155, *pyk*, AFE\_1802, *gpml-1*, AFE\_1857, *tal*, AFE\_2024 y AFE\_2088 se encontrarían inhibiendo el consumo de fructosa-6P, mientras que los genes AFE\_1799, *glgB*, AFE\_2081, AFE\_2082 y AFE\_2083 inhiben el consumo de almidón, glucógeno y ADP-glucosa y la síntesis de trehalosa provocando a su vez una disminución en el consumo de los precursores de EPS.

### Transcripción global de células sésiles con y sin tetrazol

Los resultados obtenidos al comparar el ARN total de células sésiles con y sin tetrazol indicaron que 10 genes (0,31% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, Anexos 3 y 4) presentaron cambios significativos en sus niveles de ARNm en presencia de esta molécula. El 40% de estos genes codifican proteínas hipotéticas (1 gen reprimido y 3 sobre-expresados), mientras que el 60% son genes que exhiben una función descrita o un dominio putativo (4 genes reprimidos y 2 sobre-expresados) (Fig. 36).

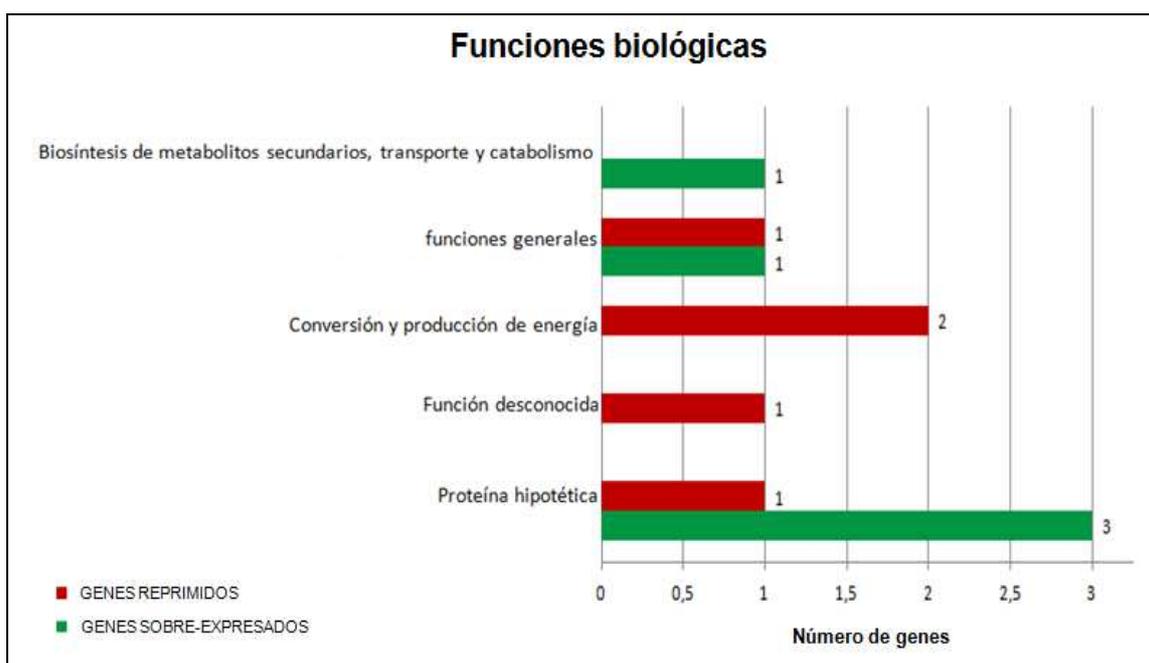
Los 10 genes con expresión diferencial fueron clasificados según el proceso o función celular en el cual participan de acuerdo a la clasificación de grupos de genes ortólogos (COG). Estos genes están involucrados en procesos celulares como la biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo (*afeI*), funciones generales [*fghA* (S-formilglutación hidrolasa) y AFE\_0710 (proteína de unión a grupos de hierro-azufre)], conversión y producción de energía [AFE\_0697 (S-hidroximetil glutación deshidrogenasa)



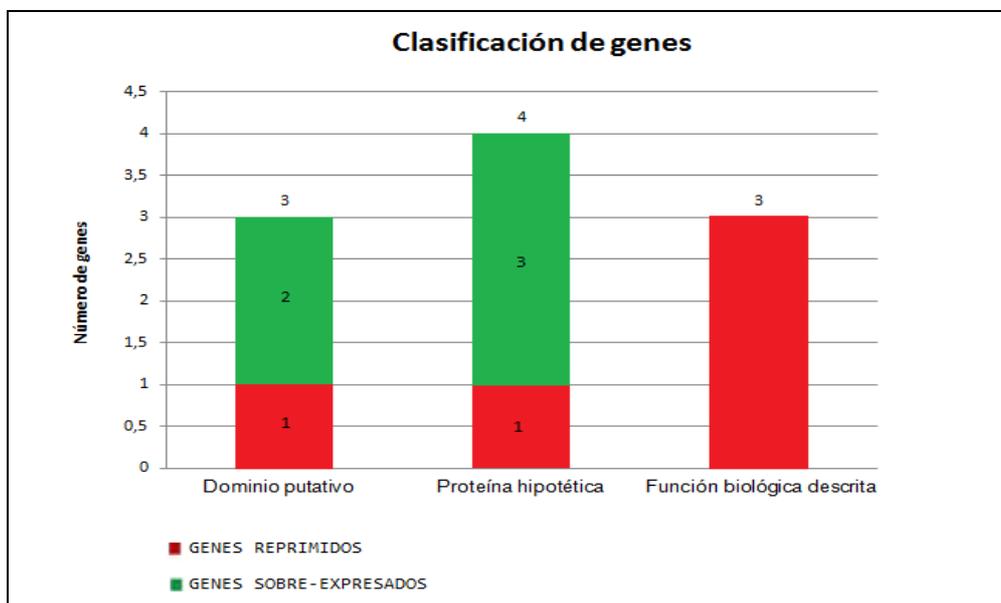
**Figura 36. Análisis de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con/sin tetrazol.** Un total de 10 genes fueron diferencialmente expresados en células sésiles con tetrazol. El 50% fueron inducidos y 50% reprimidos. Un 60% del total de genes presentan una función biológica descrita o un dominio putativo y el 40% codifican proteínas hipotéticas.

y *fdhD-2* (proteína accesoria FdhD de la familia formato deshidrogenasa)] y clasificados como función desconocida [*gfa* (proteína glutatión-dependiente de la activación de formaldehído)] (Fig. 37).

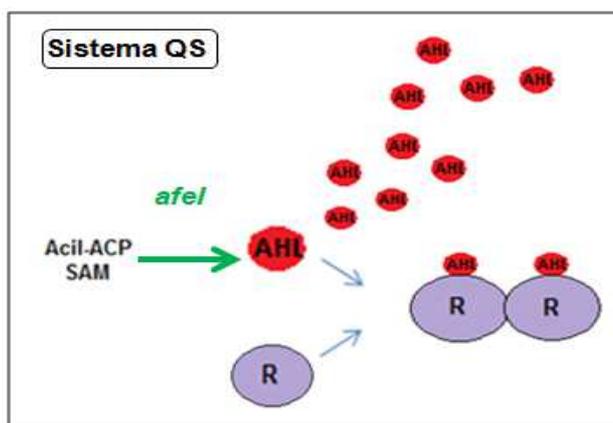
Para identificar el sistema metabólico en la cual participa cada gen y caracterizar la acción específica realizada por éstos, se realizó un análisis similar al descrito en células planctónicas. Se clasificaron los 10 genes utilizando la base de datos KEGG. Esta clasificación indicó que los genes AFE\_0697 [S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa clase III alcohol deshidrogenasa], *gfa* (proteína activadora de formaldehído dependiente de glutatión) y *fghA* (AFE\_0698, S-formilglutatión hidrolasa) presentaron una función biológica descrita, 4 genes [AFE\_0030, AFE\_0707, AFE\_0709 y *orf3* (AFE\_1998)] codifican proteínas hipotéticas y 3 genes [*fdhD-2*, AFE\_0710 (proteína de unión a grupos hierro-azufre, familia Rieske) y *afeI* (AHL sintasa)] presentaron sólo un dominio putativo (Fig. 38). Cabe destacar que dentro de los 10 genes con expresión diferencial se encuentran sobre-expresados los genes *afeI* y *orf3*, los cuales participan en el sistema QS (Fig. 39 y Anexo 4, Farah y col., 2005). De los 3 genes que presentaron una función biológica descrita en la base de datos KEGG, el gen AFE\_0697 (reprimido) participa en el metabolismo del carbono, la glicólisis y gluconeogénesis, metabolismo de la tirosina y la degradación de ácidos grasos y los genes *gfa* y *fghA* (reprimidos) participan en el metabolismo del carbono (Anexos 3 y 4). Los genes *gfa*, AFE\_0697 y *fghA* participan en la conversión de formaldehído a formato en el metabolismo del carbono. El gen AFE\_0697 participa también en la síntesis de; i) 3,4-dihidroxifeniletleneglicol (metabolismo de la tirosina), ii) conversión reversible de acetaldehído a etanol (glicólisis y gluconeogénesis) y iii) 1-alcohol a aldehído (degradación de ácidos grasos) (Fig. 40).



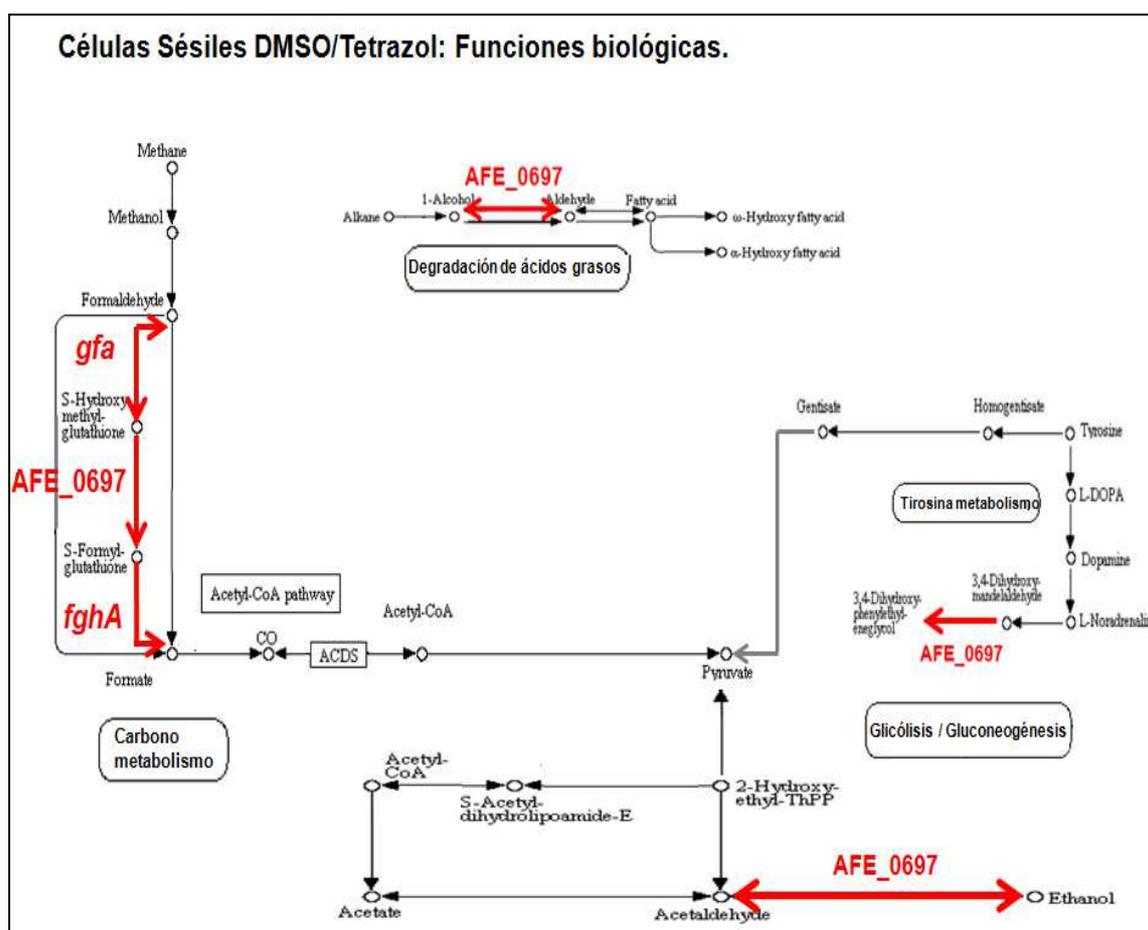
**Figura 37. Clasificación COG de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** La clasificación de los 10 genes se realizó de acuerdo al proceso o función celular en que participa cada gen. Según esta función, cada gen pertenece a una categoría dentro del grupo de genes ortólogos (COG). Los valores del  $\log_2 \frac{\text{sésiles DMSO}}{\text{sésiles tetrazol}} \geq 1,0$  corresponden a los genes reprimidos en células sésiles, mientras que los valores del  $\log_2 \frac{\text{sésiles DMSO}}{\text{sésiles tetrazol}} \leq -1,0$  corresponden a los genes sobre-expresados en células sésiles.



**Figura 38. Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** La clasificación de los 10 genes de acuerdo a la base de datos KEGG en células sésiles con tetrazol muestra que 3 genes poseen una función biológica descrita, 4 genes codifican proteínas hipotéticas y 3 sólo presentan un dominio putativo.



**Figura 39. Esquema de la participación del gen *afel* en el sistema Quorum Sensing.** El gen *afel* participa en la síntesis del autoinductor tipo I o AHL (Acil Homoserina Lactona). Este gen utiliza como sustrato una proteína cargadora de grupos acilos (Acil-ACP) y S-adenosilmetionina (SAM) para la síntesis de AHL. Las moléculas de AHL son capaces de unirse al regulador transcripcional tipo R (proteína R) provocando que éste estimule o inhiba la expresión de genes.



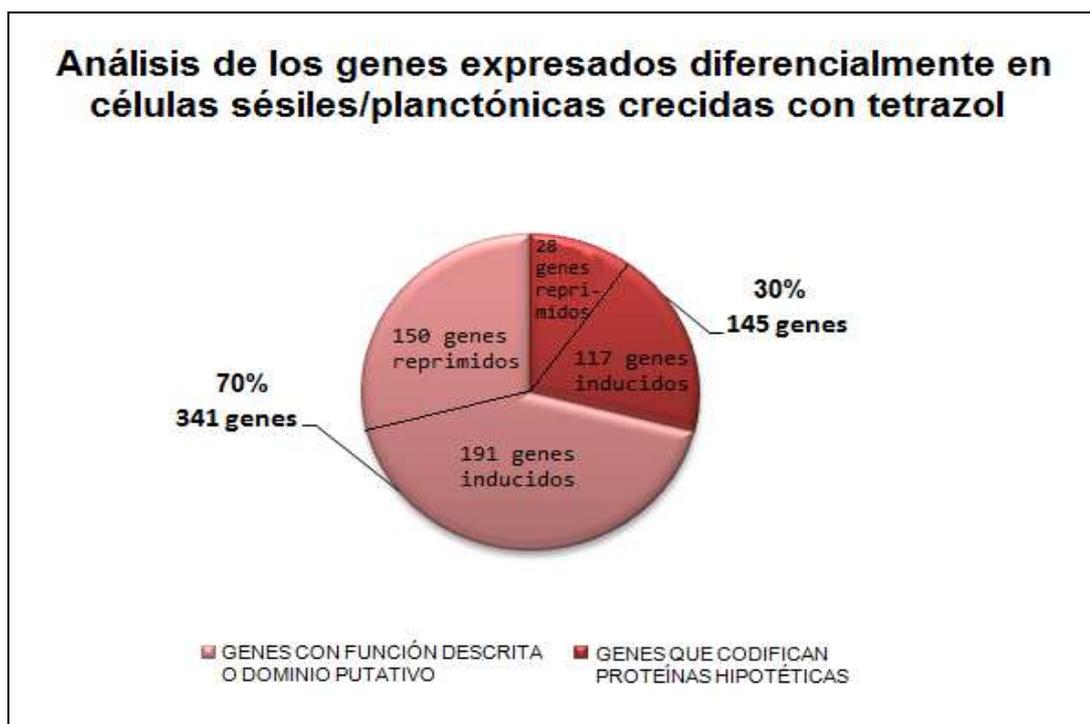
**Figura 40.** Vías metabólicas donde participan los genes con expresión diferencial en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol. Los genes *gfa*, *AFE\_0697* y *fghA* participan en el metabolismo del carbono, metabolismo de la tirosina, degradación de ácidos grasos y glicólisis y gluconeogénesis como se describe en el esquema. Estos genes se encuentran reprimidos (flechas rojas) en células sésiles con tetrazol.

En conclusión, los resultados al comparar la transcripción de genes de células sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sin tetrazol con la transcripción de células sésiles tratadas con este análogo sintético indicaron que sólo 10 genes presentaron una expresión diferencial (valores de expresión  $\geq 1.0$  o  $\leq -1.0$ ). Estos resultados revelaron además que el tetrazol afecta particularmente en la transcripción de genes que participan en el sistema QS (*afeI* y *orf3*, sobre-expresados cuatro a nueve veces más con tetrazol, Anexo 4). Esto sugiere que el tetrazol sólo participaría como inductor del sistema QS, puesto al comparar el transcriptoma global de células sésiles -que presentan el sistema QS estimulado- con y sin tetrazol, éste no provoca cambios significativos en la transcripción global de genes, excepto en los genes *afeI* y *orf3* que participan directamente en el sistema QS.

### **Transcripción global de células sésiles con tetrazol versus la transcripción global de células planctónicas con tetrazol**

Los genes con expresión diferencial significativa fueron analizados según el tipo celular (células sésiles o planctónicas). De acuerdo a esto, observamos la sobre-expresión o represión de los genes en base a la expresión en células sésiles, los valores  $\geq 1,0$  representan los genes sobre-expresados en este tipo celular (Anexo 5), mientras que los valores de expresión  $\leq -1,0$  corresponden a los genes reprimidos en células sésiles (Anexo 6).

Los resultados obtenidos al comparar el ARN total de células sésiles con tetrazol contra el ARN total de células planctónicas con tetrazol indicaron que 486 genes (15,4% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, Anexos 5 y 6) presentaron cambios significativos en sus niveles de ARNm en presencia de esta molécula. El 30% de los genes codifican proteínas hipotéticas (117 genes sobre-expresados y 28 reprimidos en células sésiles con tetrazol), mientras que el 70% son genes que exhiben una función descrita o un dominio putativo (191 genes sobre-expresados y 150 reprimidos en células sésiles con tetrazol) (Fig. 41).



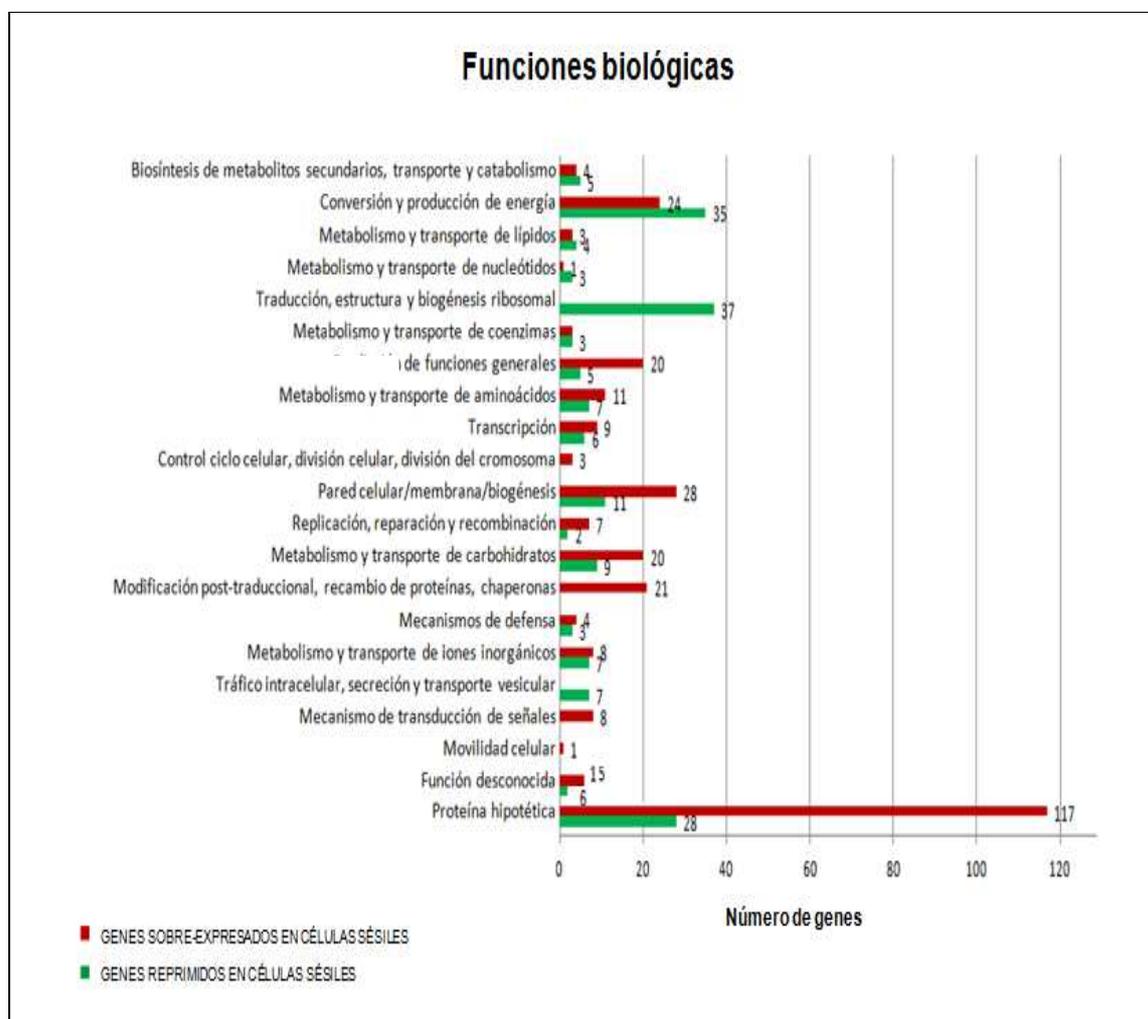
**Figura 41. Análisis de la expresión diferencial de los genes de células sésiles versus células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** Un total de 486 genes presentaron una expresión diferencial significativa. Un 70% presentan una función biológica descrita o un dominio putativo (191 genes inducidos y 150 reprimidos en células sésiles con tetrazol) y el 30% codifican proteínas hipotéticas (117 genes inducidos y 28 reprimidos en células sésiles con tetrazol).

Los 486 genes fueron clasificados según el proceso o función celular con la cual se encuentran relacionados según a la clasificación de COG. En células sésiles con tetrazol la mayor parte de estos genes se encuentran reprimidos en la conversión y la producción de energía, traducción, estructura y biogénesis ribosomal, y sobre-expresados en la biogénesis de la pared y membrana celular, la conversión y producción de energía, el metabolismo y transporte de carbohidratos, la modificación post-traduccional, recambio de proteínas y chaperonas (Fig. 42).

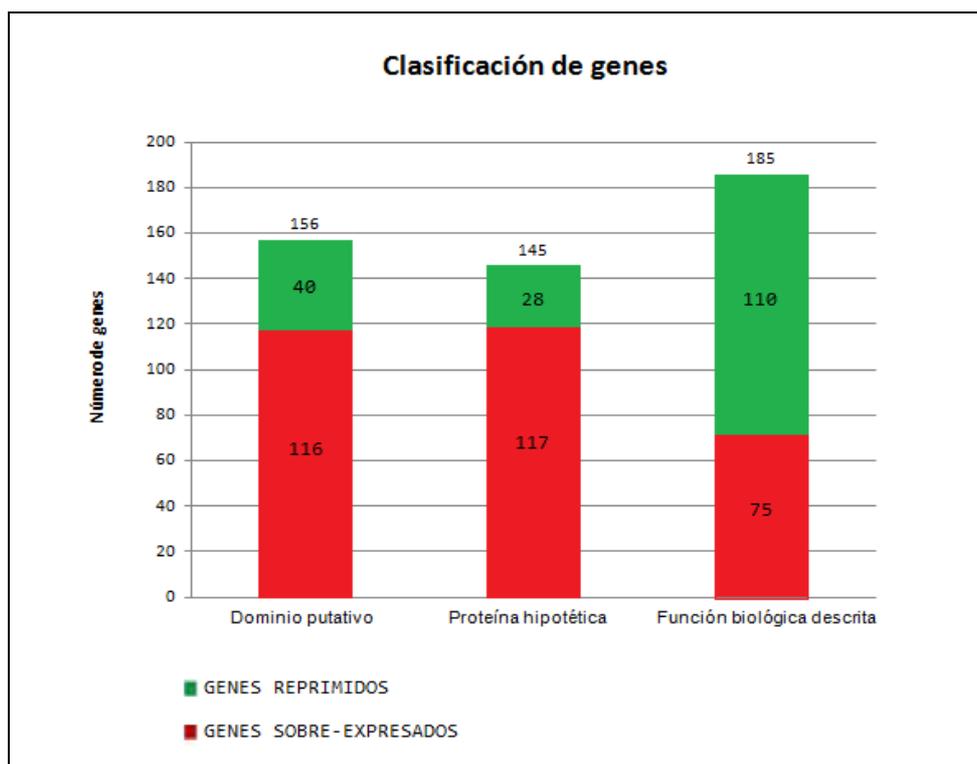
Para identificar el sistema metabólico en la cual participa cada gen y caracterizar la acción específica realizada por éstos, el mismo análisis descrito en células sésiles y planctónicas con tetrazol se realizó. Se clasificaron los 486 genes utilizando la base de datos KEGG. Esta clasificación indicó que 185 genes de los 486 genes analizados presentaron una función biológica descrita en esta base de datos, 145 genes codifican para proteínas hipotéticas y 156 presentaron sólo un dominio putativo (Fig. 43).

Los 185 genes que presentaron una función biológica descrita en la base de datos KEGG participan en 67 sistemas metabólicos, en los cuales 75 genes se encuentran sobre-expresados y 110 reprimidos en células sésiles. Los genes reprimidos participan en su mayoría en la estructura y biogénesis del ribosoma y reacciones redox, mientras que los genes sobre-expresados participan mayoritariamente en la glicólisis y gluconeogenesis, metabolismo del carbono y biosíntesis de aminoácidos (Anexos 5 y 6).

Dentro de los genes reprimidos en células sésiles, los genes AFE\_0315-0318, AFE\_0326-0331, AFE\_0333-0336, AFE\_0338-0346, AFE\_0350-0353 y AFE\_1904 participan en la estructura del ribosoma y el gen *rbfA* (AFE\_0392, factor A de unión a ribosoma) se encuentra asociado a la biogénesis ribosomal. En reacciones redox el gen *ppa* (AFE\_0492, pirofosfatasa) cataliza la ruptura del enlace de alta energía entre grupos fosfato



**Figura 42. Clasificación en base a la función biológica predicha de los genes diferencialmente expresados en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol.** La clasificación de los 486 genes se realizó de acuerdo al proceso o función celular en que participa cada gen. Según esta función, cada gen pertenece a una categoría dentro del grupo de genes ortólogos (COG). La expresión de los genes fue observada como sigue; los valores del  $\log_2^{\text{sésiles}/\text{planctónicas}} \geq 1,0$  corresponden a los genes sobre-expresados en células sésiles, mientras que los valores del  $\log_2^{\text{sésiles}/\text{planctónicas}} \leq -1,0$  corresponden a los genes reprimidos.



**Figura 43. Clasificación KEGG de los genes diferencialmente expresados al comparar la transcripción global de células sésiles contra la transcripción global de células planctónicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>, ambas con tetrazol.** La clasificación de los 486 genes indicó que 185 genes poseen una función biológica descrita (110 genes reprimidos y 75 sobre-expresados), 145 genes codifican proteínas hipotéticas (28 genes reprimidos y 117 sobre-expresados) y 156 genes sólo presentan un dominio putativo (40 genes reprimidos y 116 sobre-expresados) de acuerdo a la base de datos KEGG.

y los genes AFE\_2411 y AFE\_2618-2630 codifican las subunidades de los complejos multienzimáticos NADH-quinona oxidoreductasa, participando en la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q en la cadena respiratoria. Por último, los genes AFE\_3202-3209 codifican las subunidades del complejo multienzimático ATPasa tipo F y participan en la síntesis de ATP.

Dentro de los genes sobre-expresados en células sésiles que participan en la glicólisis y gluconeogénesis, los genes AFE\_0155 (proteína de la familia fosfoglicerato mutasa), *pyk* (AFE\_1801) y *gpml-1* favorecen la síntesis de piruvato, mientras que los genes AFE\_1812 (subunidad beta del componente E1 del complejo deshidrogenasa), AFE\_1813 (subunidad alfa del componente E1 del complejo deshidrogenasa) y AFE\_1893 (dihidrolipoamida deshidrogenasa) favorecen el consumo de piruvato. Los genes AFE\_1802 y AFE\_1807 (carbohidrato quinasa de la familia PfkB) favorecen la síntesis de gliceraldehído-3P. El gen AFE\_2324 (fosfoglucomutasa) y los genes AFE\_0697 y AFE\_2088 participan en la conversión reversible de  $\alpha$ -D-glucosa-1P a  $\alpha$ -D-glucosa-6P y de acetaldehído a etanol respectivamente. Dentro de los genes reprimidos en células sésiles que están asociados a la glicólisis y gluconeogénesis, los genes AFE\_1676 (proteína de la familia clase II aldolasa fructosa-difosfato), *tpiA* (AFE\_2633, triosafosfato isomerasa), *gap* (AFE\_3251, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa tipo I) y *pgk* (AFE\_3250, fosfoglicerato quinasa) inhiben la síntesis de gliceraldehído-3P a partir de  $\beta$ -D-fructosa-1,6P<sub>2</sub> y glicerato-3P. Los genes *pdhA* (AFE\_3070, piruvato deshidrogenasa E1 subunidad alfa), *pdhB* (AFE\_3069, piruvato deshidrogenasa E1 subunidad beta) y *pdhC* (AFE\_3068, dihidrolipoamida acetiltransferasa/dihidrolipoamida deshidrogenasa) inhiben el consumo de piruvato, mientras que el gen AFE\_2131 (proteína de la familia aldehído deshidrogenasa NAD) inhibe la conversión reversible de acetato a acetaldehído.

En el metabolismo del carbono los genes reprimidos en células sésiles como los genes AFE\_2553 (piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa), AFE\_2554 (heterodisulfuro reductasa subunidad B) y AFE\_2555 (proteína de unión de cluster

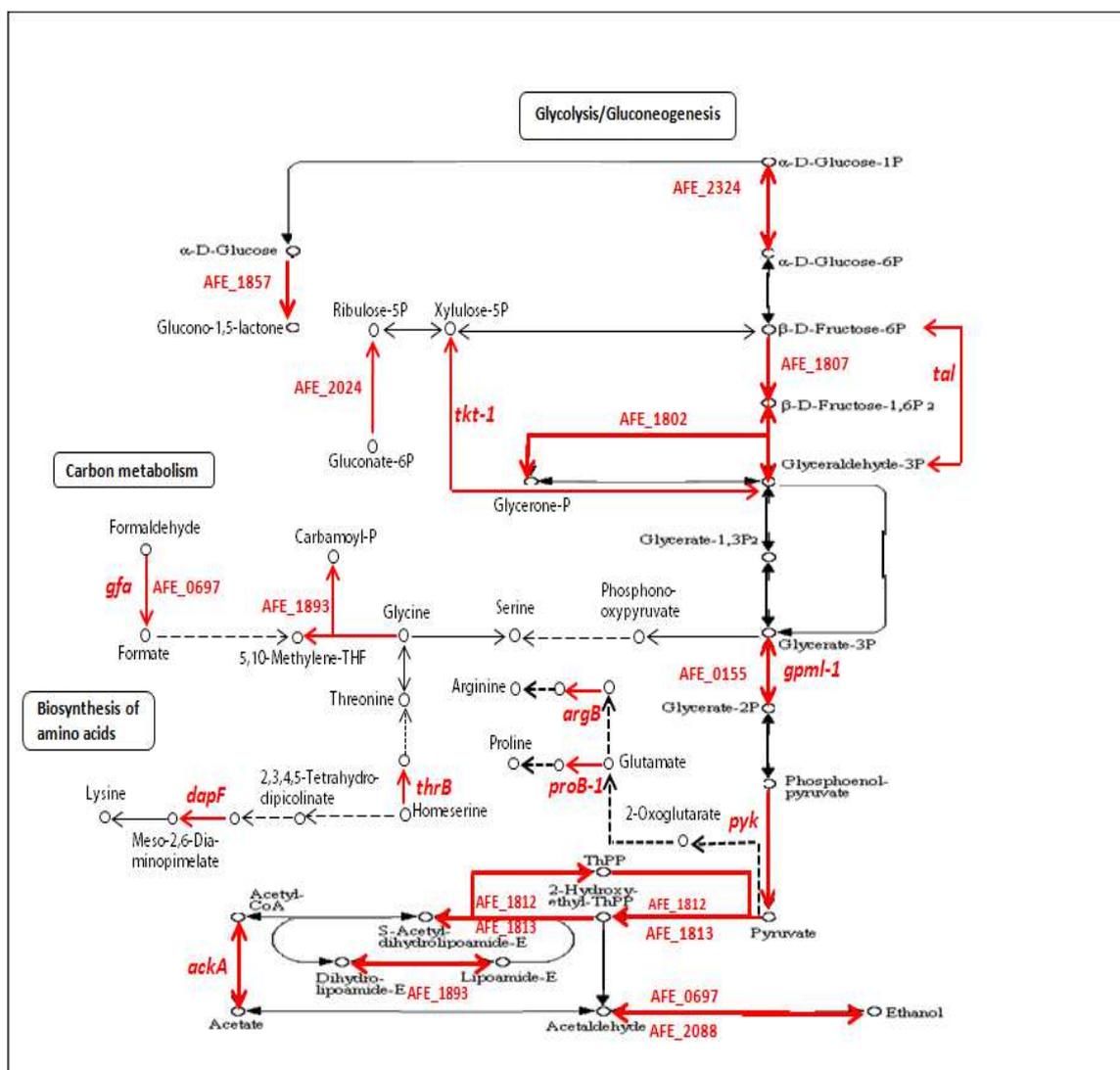
hierro/azufre) se encuentran inhibiendo el consumo de CoM-S-S-CoB, el gen *metF* (AFE\_0535, 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa) se encuentra inhibiendo el consumo de glicina, y los genes *rpe* (AFE\_3247, ribulosa-fosfato 3-epimerasa), *cbbP* (AFE\_0536, fosforibuloquinasa), *rbcL* (AFE\_1691, ribulosa bisfosfato carboxilasa) y *cbbS-2* (AFE\_1690, ribulosa bisfosfato carboxilasa, subunidad pequeña) inhiben el consumo de ribulosa-5P. Dentro de los genes sobre-expresados en células sésiles que participan en el metabolismo del carbono se encuentran los genes *tal* (AFE\_0419, transaldolasa) y *tkt-1* (AFE\_1843, transcetolasa) que favorecen la síntesis de fructosa-6P y xilulosa-5P, respectivamente, el gen AFE\_2024 (6-fosfogluconato deshidrogenasa) que favorece la síntesis de ribulosa-5P, los genes AFE\_1857 (glucosa-1 deshidrogenasa) y *ppsA* (AFE\_1816, fosfoenolpiruvato sintetasa) que favorecen el consumo de glucosa y piruvato, respectivamente. Por último, los genes sobre-expresados *gfa* y *ackA* (AFE\_1810, acetato quinasa) participan en la conversión reversible de formaldehído a formamida y acetyl-fosfato a acetato, respectivamente.

En la biosíntesis de aminoácidos dentro de los genes sobre-expresados en células sésiles se encuentran los genes *proB-1* (AFE\_2464, glutamato 5-quinasa) y *argB* (AFE\_0256, acetilglutamato quinasa) favorecen el consumo de glutamato, el gen *dapF* (AFE\_2743, diaminopimelato epimerasa) favorece la síntesis de lisina y el gen *thrB* (AFE\_3097, homoserina quinasa) favorece el consumo de homoserina. Dentro de los genes reprimidos en células sésiles los genes *serB* (AFE\_0368, fosfoserina fosfatasa) y *serC* (AFE\_0895, fosfoserina aminotransferasa) se encuentran inhibiendo la síntesis de serina, el gen *ilvD-1* (AFE\_1673, deshidratasa ácido-dihidroxi) inhibe la síntesis de 2-oxoisovalerato y 3-metil-2-oxopentanoato los cuales participan en la síntesis de valina e isoleucina, respectivamente. Por último, los genes *metE* (AFE\_0288, 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato/homocisteína S-metiltransferasa) y *metK* (AFE\_0532, S-adenosilmetionina sintetasa) participan en la síntesis y consumo de metionina, respectivamente.

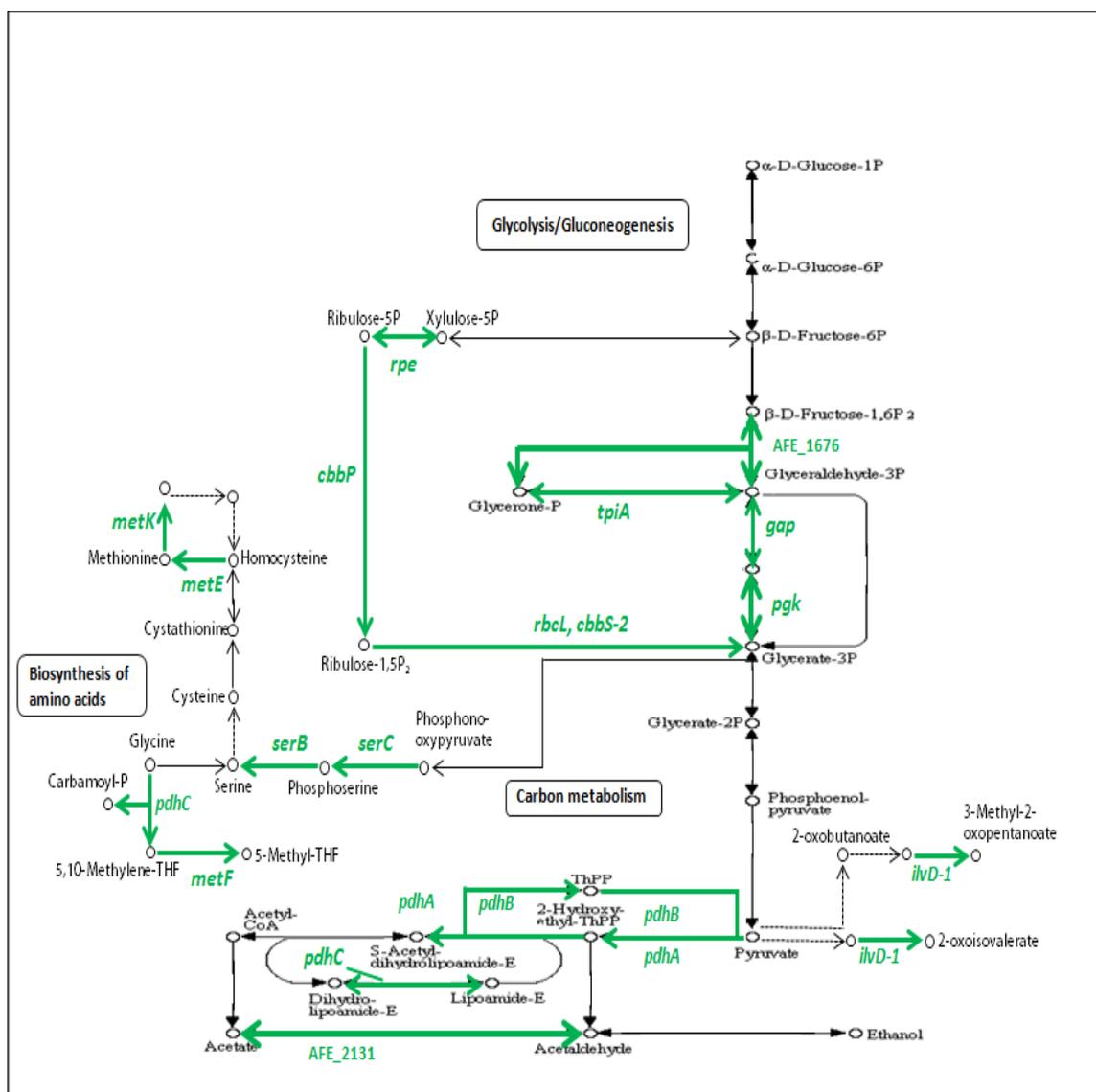
Los resultados anteriormente descritos indicaron que la mayor parte de los genes reprimidos y sobre-expresados en células sésiles participan particularmente en el metabolismo de la fructosa, glicólisis y gluconeogénesis. Se observó una alteración del flujo de carbono, favoreciendo la síntesis de piruvato, fructosa-6P y glucosa-1P principalmente al estudiar los genes sobre-expresados en células sésiles (Fig. 44), mientras que al estudiar los genes reprimidos se observó la inhibición del consumo de piruvato y la conversión de fructosa-1,6P<sub>2</sub> a glicerato-3P (Fig. 45). Además, se observó que muchos de estos genes también estarían participando en el metabolismo de la galactosa y la vía de la pentosa fosfato encontrándose vinculados con la síntesis y el consumo de glucosa-1P, uno de los sustratos para la síntesis de los precursores de EPS. De acuerdo a esto, se analizaron los genes reprimidos y sobre-expresados en células sésiles que participan en la vía de la pentosa fosfato, metabolismo de la fructosa, glicólisis y gluconeogénesis y el metabolismo de la galactosa.

En la vía de la pentosa fosfato se encuentran sobre-expresados en células sésiles los genes *tal*, AFE\_1802, AFE\_1807, *tkt-1* y AFE\_2024. Mientras, los genes *rpe* y AFE\_1676 se encuentran reprimidos. En el metabolismo de la fructosa los genes AFE\_1802 y AFE\_1807 se encuentran sobre-expresados, en cambio, los genes AFE\_1676 y *tpiA* están reprimidos. Todos estos genes reprimidos o sobre-expresados en estos dos sistemas metabólicos benefician principalmente la síntesis de fructosa 6-P, un sustrato para la síntesis de glucosa-6P y glucosa-1P.

En la glicólisis y gluconeogénesis los genes AFE\_1676, *tpiA*, *pgk* y *gap* se encuentran reprimidos en células sésiles. En tanto, los genes AFE\_1802, AFE\_1807 y AFE\_2324 se encuentran sobre-expresados. En el metabolismo de la galactosa el gen AFE\_2324 está sobre-expresado y el gen *galE* (AFE\_1342, UDP-glucosa 4-epimerasa) se encuentra reprimido. Todos estos genes reprimidos o sobre-expresados en estos dos últimos sistemas metabólicos, a excepción del gen *galE* (participa en la conversión reversible de



**Figura 44.** Vías metabólicas donde participan los genes sobre-expresados en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol. Los genes sobre-expresados que participan en la glicólisis y gluconeogénesis, el metabolismo del carbono y la biosíntesis de aminoácidos que favorecen la síntesis de piruvato, fructosa-6P y glucosa-1P son indicados. Las flechas rojas indican la acción de los genes sobre-expresados en células sésiles. Las flechas discontinuas indican la participación de varios genes para la obtención del producto.



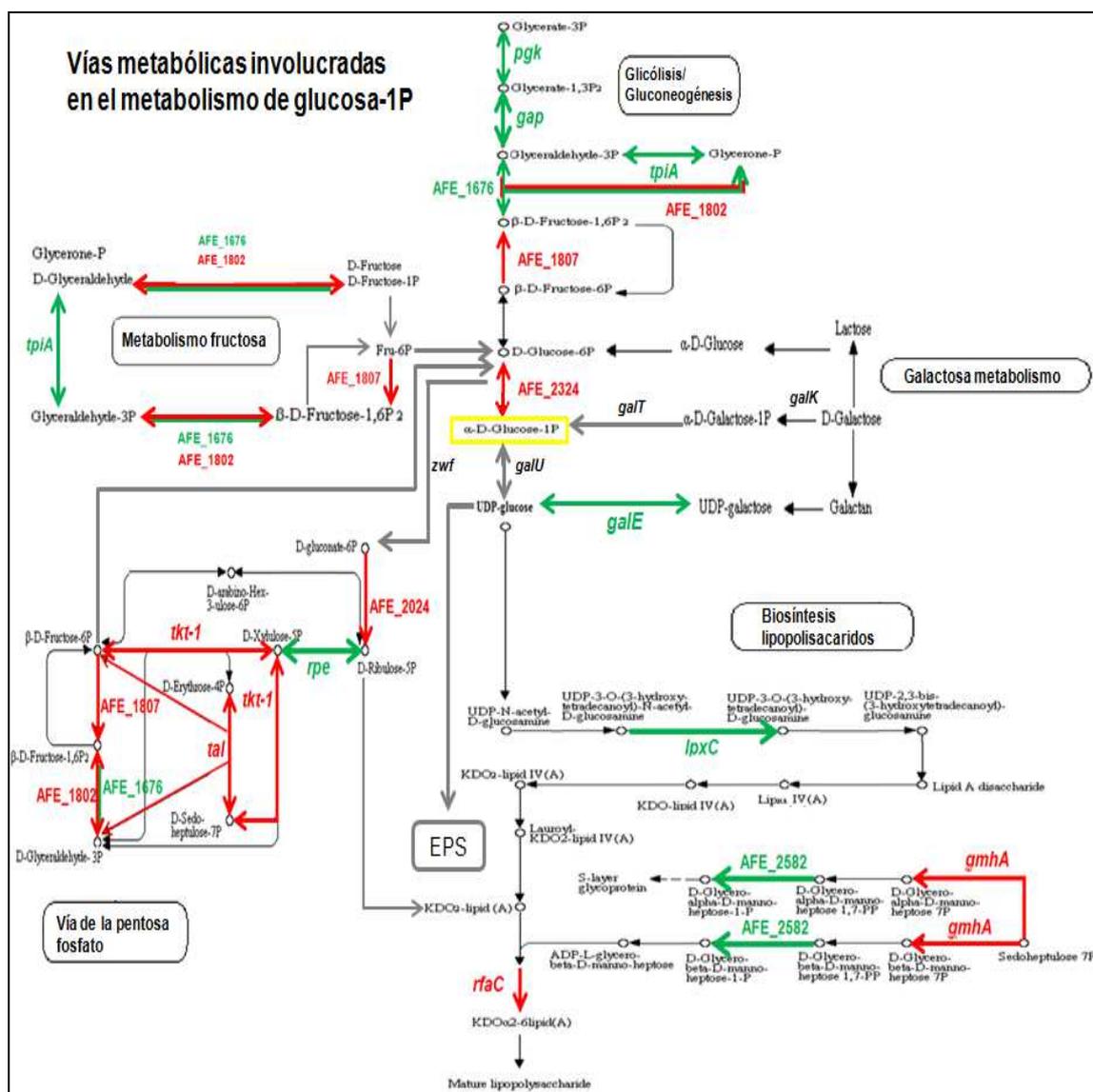
**Figura 45.** Vías metabólicas donde participan los genes reprimidos en células sésiles de *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup> con tetrazol. Los genes reprimidos que participan en la glicólisis y gluconeogénesis, el metabolismo del carbono y la biosíntesis de aminoácidos que inhiben el consumo de piruvato y la conversión de fructosa-1,6P<sub>2</sub> a glicerato-3P son indicados. Las flechas verdes indican la acción de los genes reprimidos en células sésiles. Las flechas discontinuas indican la participación de varios genes para la obtención del producto.

UDP-glucosa a UDP-galactosa), favorecen directamente la síntesis de glucosa-6P o glucosa-1P.

Por último, se analizaron los genes reprimidos y sobre-expresados que participan en la biosíntesis de lipopolisacáridos y se observó si este sistema metabólico se encuentra relacionado con los otros anteriormente descritos. Los genes *lpxC* (AFE\_0223, UDP-3-0-acil N-acetilglucosamina deacetilasa) y AFE\_2582 (proteína con dominio histidinol-fosfato fosfatasa), se encuentran reprimidos en células sésiles, inhibiendo el consumo de UDP-glucosa y favoreciendo que esta molécula participe en la síntesis de EPS, mientras que los genes *gmhA* (AFE\_0714, fosfoheptosa isomerasa) y *rfaC* (AFE\_0235, lipopolisacárido heptosiltransferasa 1) se encuentran sobre-expresados en células sésiles beneficiando la síntesis de KDO-lípidoA y de los lipopolisacáridos.

En resumen, los genes que presentan una expresión diferencial en células sésiles y participan en el metabolismo de la pentosa fosfato y de la fructosa benefician la síntesis de fructosa-6P, mientras que los genes que participan en el metabolismo de la galactosa y la glicólisis y gluconeogénesis favorecen la síntesis de glucosa-6P y glucosa-1P (Fig. 46).

En conclusión, los resultados revelaron que al comparar la transcripción global de las células sésiles tratadas con tetrazol contra la transcripción global de las células planctónicas con el mismo análogo sintético, 486 genes presentaron cambios significativos en sus niveles de ARNm. De estos genes, el 38% (185 genes) presentó una función biológica descrita (KEGG) y participan en 67 sistemas metabólicos, de los cuales cinco sistemas (vía de la pentosa fosfato, metabolismo de la fructosa, glicólisis y gluconeogénesis, el metabolismo de la galactosa y la biosíntesis de lipopolisacáridos) se encuentran relacionados con la síntesis y consumo de glucosa-1P, un sustrato que participa en la síntesis de los precursores de EPS. Por otro lado, al analizar la expresión diferencial de los genes que participan en estos cinco sistemas metabólicos, los resultados indicaron que 7 de los 8 genes (AFE\_1802, AFE\_1807, AFE\_2024, AFE\_2324, *tkt-1*, *tal*, *gmhA* y *rfaC*) sobre-



**Figura 46.** Vías metabólicas involucradas en el metabolismo de glucosa-1P. Cinco vías metabólicas se encuentran relacionadas con la síntesis y consumo de glucosa-1P; la vía de la pentosa fosfato, metabolismo de la fructosa, glicólisis y gluconeogénesis, metabolismo de la galactosa y biosíntesis de lipopolisacáridos. Las flechas rojas indican la acción de los genes sobreexpresados en células sésiles y las flechas verdes indican la acción de los genes reprimidos en este mismo tipo celular.

expresados en células sésiles con tetrazol favorecen la síntesis de glucosa-1P, mientras que 5 de los 8 genes (*pgk*, *gap*, *tpiA*, *rpe* y AFE\_1676) reprimidos en este mismo tipo celular inhiben el consumo de la fructosa-6P, el cual es uno de los sustratos para la síntesis de glucosa-1P (principal sustrato de los precursores de EPS).

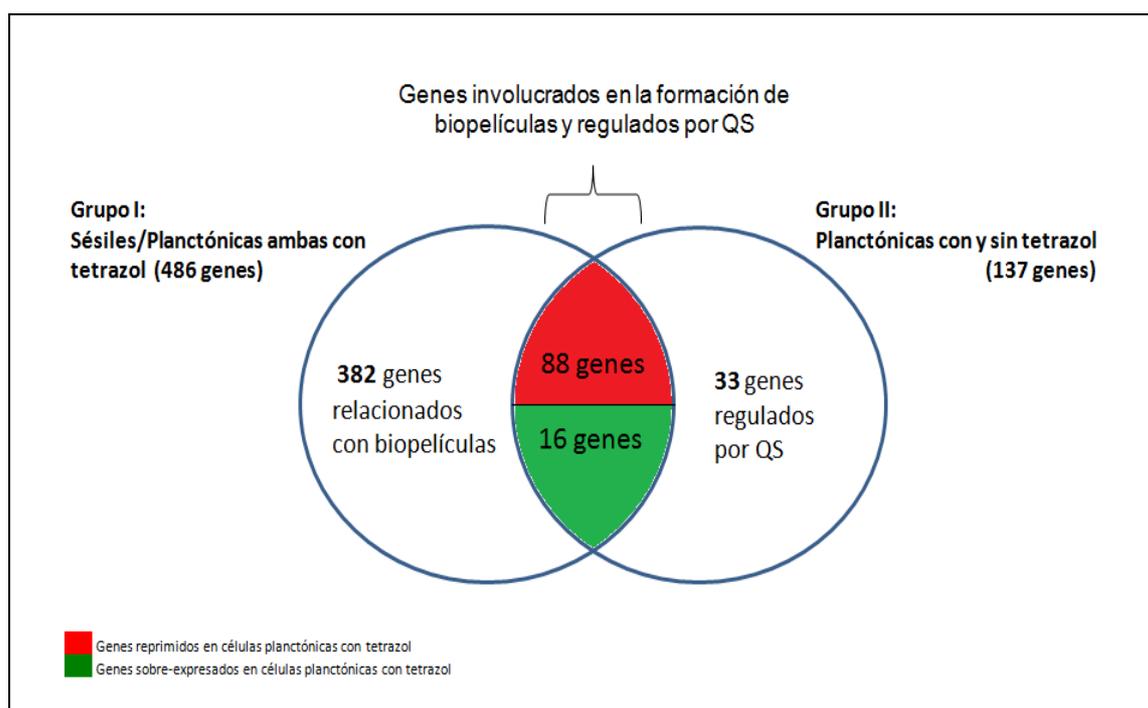
Para estudiar los resultados obtenidos en los análisis transcripcionales de i) las células planctónicas con y sin tetrazol, ii) las células sésiles con y sin tetrazol y iii) las células sésiles contra las células planctónicas ambas con tetrazol, decidimos desarrollar comparaciones entre estos tres grupos para identificar aquellos genes que presenten un patrón de expresión similar en al menos dos grupos. De esta forma, podríamos identificar aquellos genes regulados por el sistema QS que se encuentren implicados en la formación de biopelículas [genes con el mismo patrón de expresión en células planctónicas con y sin tetrazol y en células sésiles contra las células planctónicas (ambas con tetrazol)], los genes regulados por el sistema QS que no participan en la formación de biopelículas [todos los genes reprimidos o sobre-expresados en células planctónicas con y sin tetrazol menos aquellos genes con un patrón de expresión similar en células sésiles contra las células planctónicas (ambas con tetrazol)], los genes implicados en la formación de biopelículas que no son regulados por el sistema QS [todos los genes reprimidos o sobre-expresados en células sésiles contra las células planctónicas (ambas con tetrazol) menos aquellos genes con un patrón de expresión similar en células planctónicas con y sin tetrazol] y aquellos genes que no son regulados por el sistema QS y que no participan en la formación de biopelículas (todos aquellos genes que no presentan una expresión diferencial).

### **Comparación entre la transcripción global de células sésiles contra células planctónicas ambas con tetrazol y la transcripción global de células planctónicas con y sin tetrazol**

En el análisis de los resultados de la transcripción global de los genes de las células sésiles contra células planctónicas ambas con tetrazol (486 genes, desde ahora grupo I) y la

transcripción global de células planctónicas con y sin tetrazol (137 genes, desde ahora grupo II) fue posible obtener distinta información. En el estudio del grupo I se observaron los genes que se están reprimidos o sobre-expresados en células sésiles (tipo celular que presenta el sistema QS inducido) o planctónicas, mientras que en el grupo II se observaron aquellos genes diferencialmente expresados por efecto de tetrazol (molécula que induce el sistema QS) en células planctónicas. De acuerdo a esto, los genes que presenten un patrón de expresión similar en ambos grupos corresponderán a los genes regulados por el sistema QS que participan en la formación de biopelículas en células planctónicas.

Para comparar la transcripción global de genes del grupo I (células sésiles contra células planctónicas, ambas con tetrazol) con la transcripción global de genes del grupo II (células planctónicas con y sin tetrazol), se observó la expresión diferencial de genes del grupo I en base a la expresión diferencial de genes en células planctónicas. De esta forma, el cambio de los niveles de ARNm de los genes del grupo I podrá ser comparado con el de los genes del grupo II. De acuerdo a esto, se determinó que los valores de expresión del  $\log_2^{\text{sésiles}/\text{planctónicas}}$  del grupo I y el  $\log_2^{\text{DMSO}/\text{tetrazol}}$  de células planctónicas del grupo II  $\geq 1,0$  corresponderán a los genes reprimidos en células planctónicas con tetrazol, mientras que los valores de expresión  $\leq -1,0$  corresponderán a los genes sobre-expresados en este mismo tipo celular con tetrazol. Al comparar los resultados transcripcionales de las células planctónicas con tetrazol de los grupos I y II, se observó que 104 genes presentaron un cambio similar en sus niveles de ARNm en ambos grupos, es decir, los genes que presentaron una sobre-expresión en las células planctónicas con tetrazol del grupo II también presentaron una sobre-expresión en células planctónicas con tetrazol del grupo I al ser comparadas contra la expresión diferencial en células sésiles. De igual manera, los genes que presentaron una represión en las células planctónicas con tetrazol en el grupo II también se observaron reprimidos en el mismo tipo celular en el grupo I. Se observaron 88 genes reprimidos y 16 sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol en los dos grupos (Fig. 47). De acuerdo a esto, los 104 genes podrían estar regulados por el sistema QS y estar participando en la formación de biopelículas.

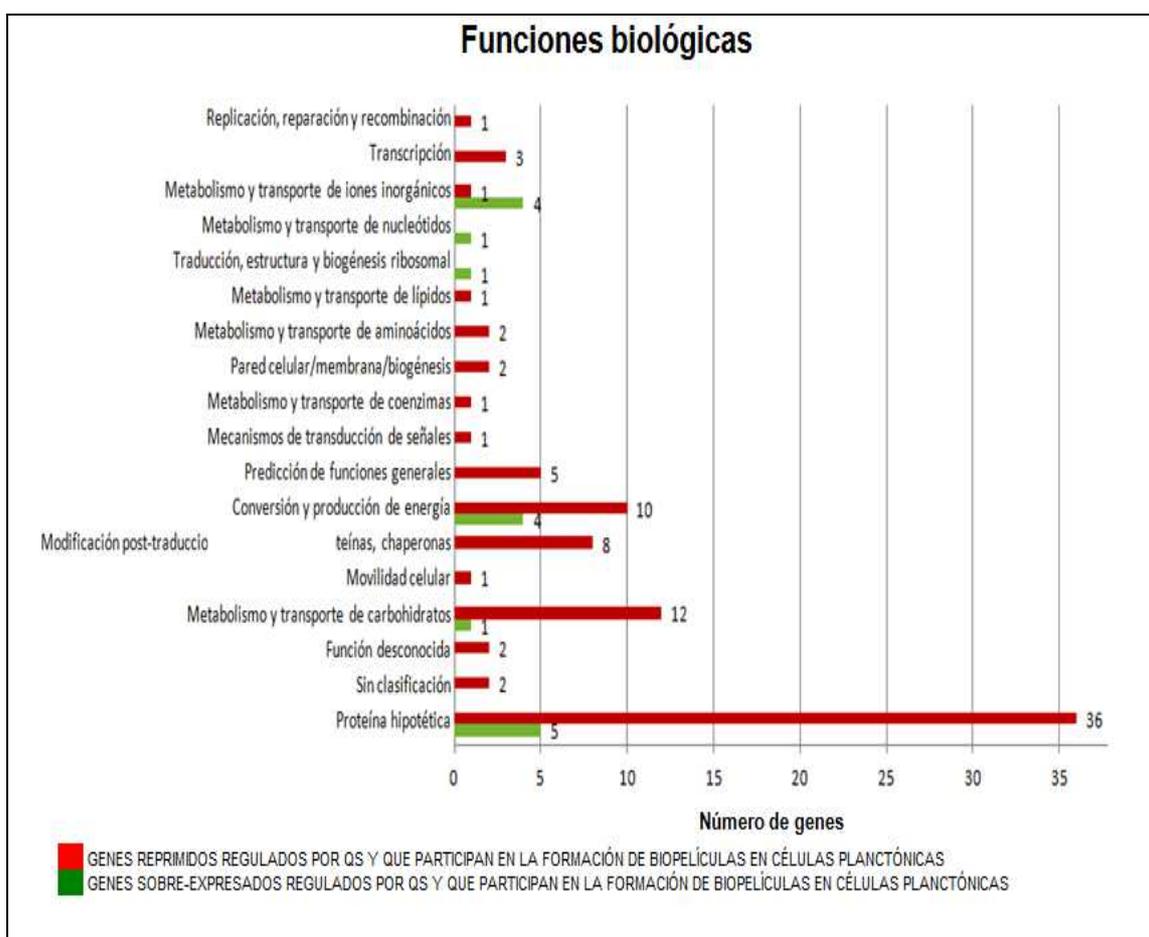


**Figura 47. Resultados del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I y II.** Un total de 104 genes presentan un patrón similar en el cambio de sus niveles de ARNm al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I y II. De estos genes, 16 se encuentran sobre-expresados (verde) y 88 están reprimidos (rojo) en células planctónicas con tetrazol en ambos grupos. Los 104 genes están regulados por el sistema QS y participan en la formación de biopelículas, mientras que 382 genes del grupo I sólo se encuentran relacionados en la formación de biopelículas y 33 genes del grupo II sólo están regulados por QS.

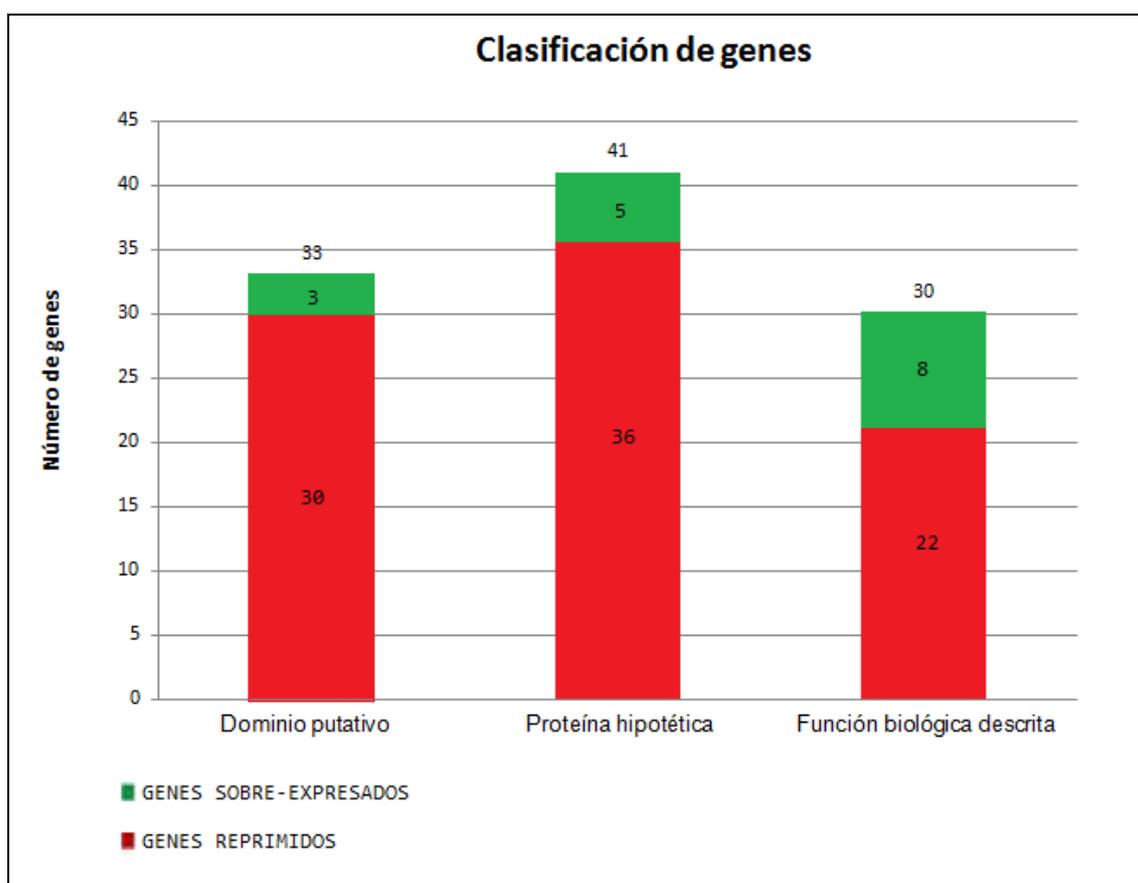
Los 104 genes que están regulados por el sistema QS y participan en la formación de biopelículas (Anexos 1 y 2) fueron analizados y clasificados para identificar el proceso o función celular con la cual se encuentran vinculados. De acuerdo a la clasificación de grupos de genes ortólogos (COG), la mayor parte de estos genes se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol y participan en procesos celulares como el metabolismo y transporte de carbohidratos, la conversión y producción de energía y la modificación post-traducciona, recambio de proteínas y chaperonas (Fig. 48).

Para identificar el sistema metabólico en la cual participan los 104 genes antes mencionados y caracterizar la acción específica realizada por éstos, se clasificaron los 104 genes utilizando la base de datos KEGG. Esta clasificación indicó que 30 de los 104 genes analizados presentaron una función biológica descrita en esta base de datos. Un gran porcentaje (71,1%) de estos 104 genes codifican proteínas hipotéticas (41 genes) o sólo presentan dominios putativos (33 genes) (Fig. 49, Anexos 1, 2, 5 y 6).

Los 30 genes que poseen una función biológica descrita en la base de datos KEGG participan en 34 sistemas metabólicos diferentes, principalmente en el metabolismo del almidón y la sacarosa, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del carbono, glicólisis y gluconeogénesis. De estos 30 genes, 22 se encuentran reprimidos y 8 sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol. Los valores de expresión (de acuerdo al  $\log_2^{\text{sésiles/planctónicas}}$  para el grupo I y el  $\log_2^{\text{DMSO/tetrazol}}$  de células planctónicas para el grupo II), la descripción de la proteína y la función biológica de cada uno de los 30 genes que se encuentran regulados por el sistema QS y participan en la formación de biopelículas se encuentran descritos en las Tablas 9 y 10.



**Figura 48. Clasificación COG de los genes relacionados con la formación de biopelículas y regulados por el sistema Quorum Sensing en *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.** La clasificación de los 104 genes regulados por QS que participan en la formación de biopelículas se realizó de acuerdo al proceso o función celular en que participa cada gen. Según esta función, cada gen pertenece a una categoría dentro del grupo de genes ortólogos (COG). Genes reprimidos (barras rojas) y genes sobre-expresados (barras verdes) en células planctónicas con tetrazol fueron clasificados.



**Figura 49. Clasificación KEGG de los genes relacionados con la formación de biopelículas y regulados por el sistema Quorum Sensing en *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>T</sup>.** La clasificación de los 104 genes indicó que 30 genes (22 genes reprimidos y 8 sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol) poseen una función biológica descrita, 41 genes (5 genes sobre-expresados y 36 reprimidos en células planctónicas con tetrazol) codifican proteínas hipotéticas y 33 genes (30 genes reprimidos y 3 genes sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol) sólo presentan un dominio putativo.

**Tabla 9.** Genes regulados por el sistema QS que participan en la formación de biopelículas y presentan una función biológica descrita y se encuentran sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol en los grupos I y II. Para cada gen y su secuencia codificadora se utilizaron dos oligonucleótidos. Se indica el valor de la expresión diferencial promedio de cada gen obtenido de cuatro hibridaciones (tres réplicas experimentales y un intercambio de tinte) para el grupo I y seis hibridaciones (cuatro réplicas experimentales y dos intercambios de tinte) para el grupo II adquiridos de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\leq -1,5$  y (■) valores  $\geq -1,5$  y  $\leq -1,0$ .

N°	ORF	Gen	Descripción de la proteína	Función biológica	Grupo I		Grupo II	
					promedio	estadística	promedio	estadística
1	AFE_1904_132-186a	<i>rpmF</i>	Proteína L32 ribosomal 50S	Ribosoma	■ -1,081	■ 3,73E-02	■ -1,077	■ 6,19E-04
	AFE_1904_132-186b				■ -1,058	■ 4,29E-02	■ -1,058	■ 6,19E-04
2	AFE_1929_175-229	<i>ndk</i>	Nucleósido difosfato quinasa	Metabolismo de la purina, Metabolismo de la pirimidina	■ -1,281	■ 1,67E-02	■ -0,934	■ 4,54E-04
	AFE_1929_322-376				■ -1,01	■ 1,50E-02	■ -1,227	■ 4,54E-04
3	AFE_1939_860-914	<i>pstS-1</i>	Proteína de unión a sustrato transportador ABC fosfato	Transportadores ABC, Sistema de dos componentes	■ -3,195	■ 6,81E-03	■ -1,961	■ 2,31E-03
	AFE_1939_990-1044				■ -2,075	■ 5,77E-03	■ -1,098	■ 2,20E-02
4	AFE_1940_802-856	<i>pstC-2</i>	Transportador ABC fosfato permeasa	Transportadores ABC	■ -2,158	■ 6,82E-03	■ -1,544	■ 3,55E-03
	AFE_1940_902-956				■ -2,207	■ 5,45E-03	■ -1,424	■ 2,49E-03
5	AFE_2131_1122-1176	Proteína de la familia (NAD) aldehído deshidrogenasa	de pentosa y glucuronato, Metabolismo de ascorbato y aldarato, Degradación de ácidos grasos, Metabolismo del propanoato, Valina, leucina y isoleucina	degradación, Degradación de cloroalkano y cloroalkeno, beta-alanina	■ -1,14	■ 7,37E-03	■ -1,093	■ 1,63E-02
	AFE_2131_1342-1396				■ -1,468	■ 1,79E-02	■ -0,984	■ 1,79E-03
6	AFE_3207_413-467	<i>atpF</i>	ATP sintasa F0, subunidad B	Fosforilación oxidativa	■ -1,793	■ 4,10E-03	■ -1,082	■ 8,45E-03
	AFE_3207_85-139				■ -1,681	■ 4,10E-03	■ -0,97	■ 2,45E-03
7	AFE_3208_192-246	<i>atpE</i>	ATP sintasa F0, subunidad C	Fosforilación oxidativa	■ -1,438	■ 7,25E-03	■ -1,408	■ 3,36E-04
	AFE_3208_65-119				■ -1,768	■ 7,02E-03	■ -0,939	■ 9,09E-04
8	AFE_3209_429-483	<i>atpB</i>	ATP sintasa F0, subunidad A	Fosforilación oxidativa	■ -1,313	■ 1,35E-02	■ -1,735	■ 3,92E-04
	AFE_3209_530-584				■ -1,172	■ 3,24E-02	■ -1,38	■ 1,03E-03

**Tabla 10.** Genes regulados por el sistema QS que participan en la formación de biopelículas y presentan una función biológica descrita y se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol en los grupos I y II. Para cada gen y su secuencia codificadora se utilizaron dos oligonucleótidos. Se indica el valor de la expresión diferencial promedio de cada gen obtenido de cuatro hibridaciones (tres réplicas experimentales y un intercambio de tinte) para el grupo I y seis hibridaciones (cuatro réplicas experimentales y dos intercambios de tinte) para el grupo II adquiridos de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\geq 1,5$  (■) valores  $\geq 1,0$  y  $\leq 1,5$ .

N°	ORF	Gen	Descripción de la proteína	Función biológica	Grupo I		Grupo II	
					promedio	estadística	promedio	estadística
1	AFE_0155_154-208		Proteína de la familia fosfoglicerato mutasa	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glicólisis / Gluconeogenesis Metabolismo de metano, Metabolismo de carbono, Biosíntesis de aminoácidos	1,977	1,16E-02	1,252	4,28E-02
	AFE_0155_536-590				2,428	8,69E-03	1,905	2,80E-02
2	AFE_0419_495-549	<i>tal</i>	Transaldolasa	Vía de la pentosa fosfato, Metabolismo del carbono Biosíntesis de aminoácidos	1,915	4,10E-03	1,1	1,27E-02
	AFE_0419_595-649				1,794	6,12E-03	1,322	2,48E-02
3	AFE_0696_110-164	<i>gfa</i>	Proteína activadora de formaldehído dependiente de glutatión	Metabolismo de metano, Metabolismo de carbono	1,261	5,77E-03	1,203	3,23E-03
	AFE_0696_227-281				1,169	6,82E-03	1,474	3,06E-02
4	AFE_0808_719-773		Oxidoreductasa, subunidad de unión a FAD	Metabolismo de purina	2,913	2,72E-02	1,385	2,85E-02
	AFE_0808_948-1002				2,664	1,03E-02	1,929	4,37E-02
5	AFE_0809_1969-2023		Oxidoreductasa, subunidad de unión a molibdopterín	Metabolismo de purina	2,872	7,27E-03	1,78	2,32E-02
	AFE_0809_2151-2205				2,845	1,74E-02	1,092	8,41E-04
6	AFE_1799_2258-2312		Proteína de la familia alfa-glucano fosforilasa	Metabolismo de azúcar y almidón	2,109	1,73E-02	1,077	6,19E-04
	AFE_1799_2377-2431				1,857	1,29E-02	1,311	2,04E-04
7	AFE_1801_1309-1363	<i>pyk</i>	Piruvato quinasa	Glicólisis / Gluconeogenesis, Metabolismo de la purina, Metabolismo del piruvato Metabolismo de carbono, Biosíntesis de aminoácidos	2,014	4,93E-02	1,297	3,89E-03
	AFE_1801_612-666				2,074	1,59E-02	2,245	1,35E-01
8	AFE_1802_294-348		Aldolasa	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Metabolismo de la fructosa y manosa, Fijación del carbono en organismos fotosintéticos, Metabolismo del metano y carbono, Biosíntesis de aminoácidos	2,354	2,12E-02	1,205	1,83E-02
	AFE_1802_822-876				1,993	3,58E-02	1,124	1,86E-03
9	AFE_1815_455-509	<i>gpml-1</i>	Fosfogliceromutasa	Glicólisis / Gluconeogenesis, Glicina, serina y treonina metabolismo Metabolismo del metano y carbono, Biosíntesis de aminoácidos	2,32	1,50E-02	1,629	3,49E-03
	AFE_1815_745-799				1,761	4,51E-02	0,911	2,78E-03
10	AFE_1854_267-321		Piridina nucleótido-disulfuro	Fosforilación oxidativa	3,269	1,78E-02	1,349	6,47E-04

	AFE_1854_900-954		oxidoreductasa		2,845	2,45E-02	1,49	2,77E-03
11	AFE_1857_486-540		Glucosa 1-deshidrogenasa	Vía de la pentosa fosfato, Metabolismo del carbono	2,151	1,22E-02	1,068	6,70E-04
	AFE_1857_605-659				2,597	1,47E-02	1,525	3,20E-03
12	AFE_2024_274-328		6-fosfogluconato deshidrogenasa	Vía de la pentosa fosfato, Metabolismo de glutatión	2,276	1,00E-02	1,109	1,63E-02
	AFE_2024_515-569			Metabolismo del carbono	2,08	1,38E-02	1,209	3,09E-03
13	AFE_2081_2153-2207		Proteína de la familia Alfa-amilasa	Metabolismo de azúcar y almidón	3,033	1,53E-02	1,467	1,67E-04
	AFE_2081_2344-2398				2,879	8,27E-03	1,493	2,51E-03
14	AFE_2082_558-612		Proteína de la familia Alfa-amilasa	Metabolismo de azúcar y almidón	3,041	1,23E-02	1,253	1,17E-03
	AFE_2082_882-936				2,807	1,59E-02	1,597	2,22E-02
15	AFE_2083_267-321		Grupo 1 glicosil transferasa	Metabolismo de azúcar y almidón	2,986	2,30E-02	1,233	6,19E-04
	AFE_2083_657-711				2,882	4,55E-02	1,637	1,20E-02
16	AFE_2088_775-829		Proteína de la familia alcohol deshidrogenasa de unión a zinc	Glicólisis/Gluconeogenesis, Degradación de ácidos grasos, Degradación de cloroalkano y cloroalkeno, Tirosina metabolismo	2,378	1,55E-02	0,94	4,62E-03
	AFE_2088_875-929			Degradación del naftaleno, Degradación de compuestos aromáticos.	2,41	1,53E-02	1,086	1,51E-03
17	AFE_2464_447-501	<b>prob-1</b>	Glutamato 5-quinasa	Arginina y prolina metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos	2,733	1,22E-02	1,036	6,19E-04
	AFE_2464_594-648				2,025	1,09E-02	1,023	1,66E-03
18	AFE_2836_1869-1923	<b>glgB</b>	Proteína 1,4-alfa-glucano-racimo	Metabolismo de azúcar y almidón	1,331	3,04E-02	1,018	1,85E-01
	AFE_2836_2041-2095				1,485	4,10E-03	1,257	4,76E-02
19	AFE_2931_2329-2383	<b>recC</b>	Exodeoxiribonucleasa V subunidad gamma	Recombinación homologa	1,593	1,03E-02	1,206	6,65E-04
	AFE_2931_3238-3292				1,347	3,47E-02	1,108	1,10E-02
20	AFE_3086_2008-2062		ATPasa tipo P de eflujo de protones de la membrana plasmática	Fosforilación oxidativa	1,519	2,42E-02	1,085	1,48E-01
	AFE_3086_2207-2261				1,614	1,70E-02	1,106	4,77E-03
21	AFE_3283_231-285	<b>hynS</b>	[Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad pequeña	Degradación del nitrotolueno	2,879	5,77E-02	1,539	1,24E-01
	AFE_3283_695-749				2,979	4,13E-02	1,593	4,01E-02
22	AFE_3286_1372-1426	<b>hynL</b>	[Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad grande	Degradación del nitrotolueno	2,896	1,50E-02	1,586	2,48E-03
	AFE_3286_1498-1552				2,756	1,09E-02	1,844	8,88E-03

La mayor parte de estos 30 genes con función biológica descrita se encuentran directamente vinculados con la formación de biopelículas, encontrándose 6 genes sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol. Los genes *pstS-1* (AFE\_1939) y *pstC-2* (AFE\_1940) codifican transportadores de grupos fosfatos del tipo ABC y participan en la formación de biopelículas (O' May y col., 2009). El gen AFE\_2131 participa en la conversión reversible de acetaldehído a acetato, siendo el acetaldehído un importante mediador para la formación de biopelículas (Mikko y col., 2014). Los genes *atpF* (AFE\_3207), *atpE* (AFE\_3208) y *atpB* (AFE\_3209) colaboran en la síntesis de ATP generada por un gradiente de protones y participan en el metabolismo energético requerido para la formación de biopelículas (Ikonomidis y col., 2008; Xu y col., 2012).

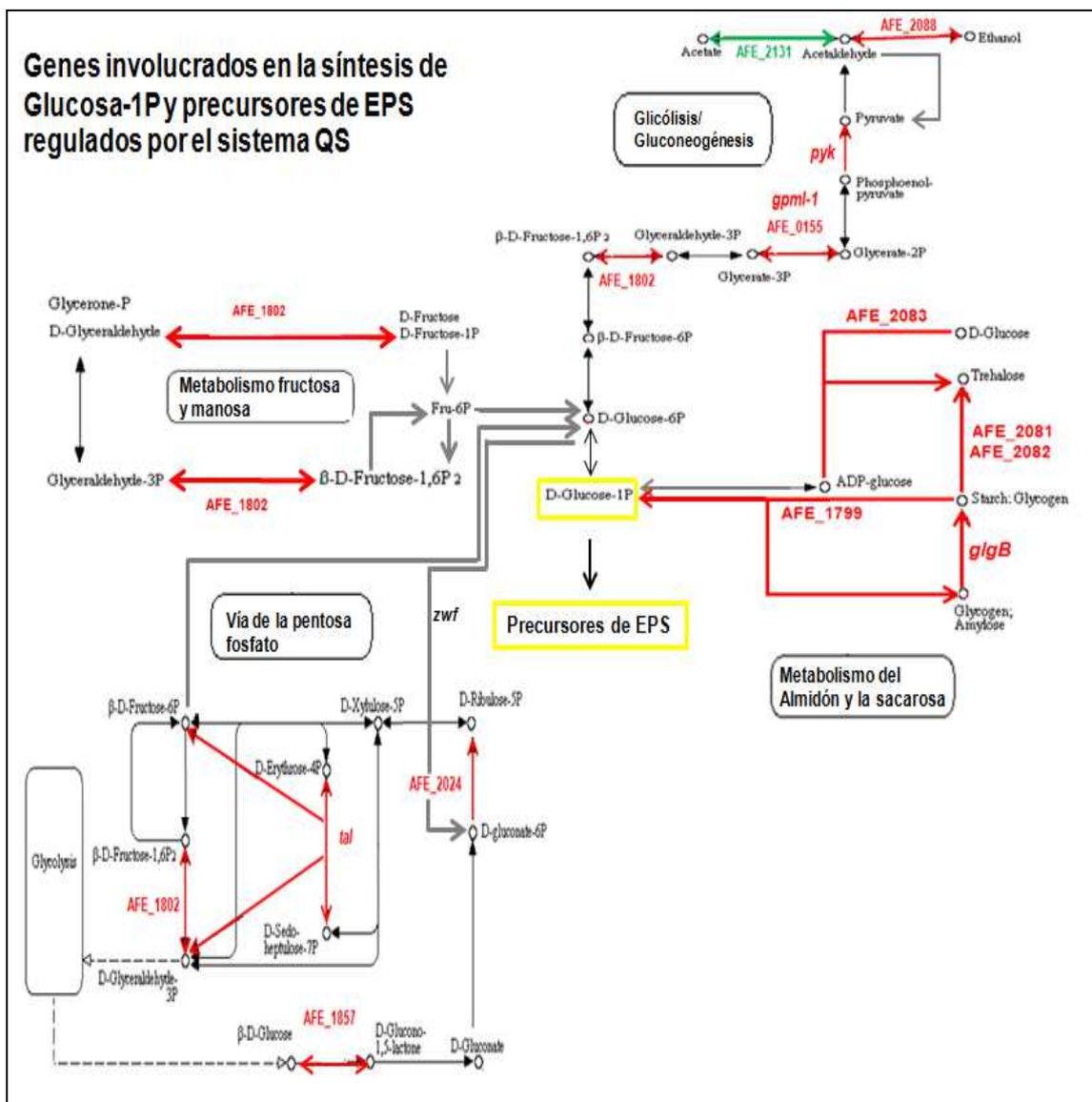
Por otro lado, 16 de los 30 genes con función biológica descrita, regulados por el sistema QS y vinculados con la formación de biopelículas se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol. El gen *gfa* (AFE\_0696) se encuentra relacionado con el consumo de formaldehído, un compuesto que favorece el crecimiento y desarrollo de las biopelículas (Ong y col., 2006). El gen *proB-1* (AFE\_2464, glutamato-5-quinasa) participa en el consumo de glutamato para la síntesis de prolina, siendo glutamato un aminoácido que puede ser utilizado como un sustrato para la producción de energía en la formación de biopelículas (Yeom y col., 2013). Muy recientemente, se ha propuesto que los aminoácidos, incluyendo glutamato, pueden tener otro rol como una señal para la maduración de biopelículas y eventual desarme de éstas (Wong y col., 2015). El gen AFE\_3086 que está asociado al flujo de protones en la membrana plasmática y participa en el metabolismo energético requerido para la formación de biopelículas (Ikonomidis y col., 2008; Xu y col., 2012). Los genes AFE\_1802, *tal* (AFE\_0419), AFE\_1857 y AFE\_2024 se encuentran involucrados con la síntesis y consumo de fructosa-6P, un sustrato para la síntesis de glucosa-6P y glucosa-1P (sustratos para la síntesis de los precursores de EPS, Quatrini y col., 2007). Todos estos genes se encuentran inhibiendo el consumo de fructosa-6P, lo cual beneficia la biosíntesis de EPS en células planctónicas con tetrazol. Los genes AFE\_0155, *pyk* (AFE\_1801) y *gpml-1* (AFE\_1815) participan en la síntesis de piruvato desde la glucosa-1P, por lo que al encontrarse reprimidos en células planctónicas con tetrazol

favorecen la acumulación de los precursores de EPS. En cambio, el gen AFE\_2088 (que también se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol) participa en la síntesis de piruvato desde acetaldehído. Por otro lado, los genes AFE\_1799 y *glgB* (AFE\_2836) al encontrarse reprimidos inhiben la síntesis de ADP-glucosa, un precursor de la trehalosa, mientras que los genes AFE\_2081, AFE\_2082 y AFE\_2083 inhiben la síntesis de trehalosa desde ADP-glucosa y maltodextrina (Fig. 50, Barreto y col., 2005).

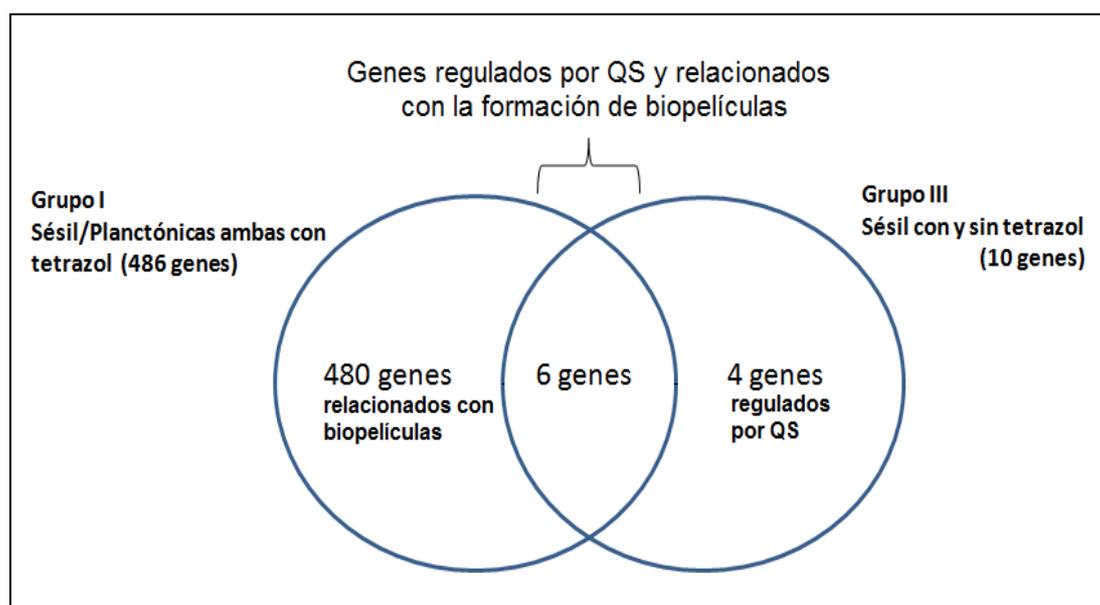
### **Comparación entre la transcripción global de células sésiles contra células planctónicas, ambas con tetrazol y la transcripción global de células sésiles con y sin tetrazol**

Para comparar la transcripción global de los genes del grupo I (486 genes) y la transcripción global de células sésiles con y sin tetrazol (10 genes diferencialmente expresados, desde ahora grupo III), se observó la expresión diferencial de genes del grupo I en base a la expresión diferencial en células sésiles. De esta forma, los cambios en los niveles de ARNm de los genes del grupo I fueron comparados con los genes del grupo III. De acuerdo a esto, se determinó que en el grupo I los genes sobre-expresados en células sésiles con tetrazol corresponderan a valores de expresión definidos por el  $\log_2^{\text{sésiles}} / \text{planctónicas} \geq 1,0$  y  $\leq -1,0$  para genes reprimidos. En cambio, para el grupo III los genes reprimidos en células sésiles corresponderan a valores de expresión definidos por el  $\log_2^{\text{DMSO}} / \text{tetrazol} \leq 1,0$  y los genes sobre-expresados a  $\leq -1,0$ .

Al comparar los resultados transcripcionales del grupo I y el grupo III se observaron 6 genes que presentaron una expresión diferencial en ambos grupos. De estos genes, 4 exhiben cambios similares en sus niveles de ARNm en ambos grupos, mientras que 2 genes presentaron un patrón de expresión diferente. (Fig. 51 y Tabla 11).



**Figura 50. Genes regulados por el sistema QS involucrados con la síntesis de glucosa-1P y precursores de EPS.** Los genes regulados por el sistema QS involucrados en el consumo de glucosa-1P y precursores de EPS en células planctónicas con tetrazol se encuentran mayoritariamente reprimidos (flechas rojas), a excepción del gen AFE\_2131 que se encuentra sobre-expresado (flecha verde).



**Figura 51. Resultados del análisis de la transcripción global de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I y III.** Un total de 6 genes presentan cambios significativos en sus niveles de ARNm en ambos grupos. De estos genes, 4 presentan cambios similares en ambos grupos, mientras que 2 genes presentan una expresión diferencial distinta en los dos grupos. Los 6 genes comunes en ambos grupos se encuentran regulados por el sistema QS y participan en la formación de biopelículas, mientras que los 4 genes del grupo III se encuentran regulados por el sistema QS y los 480 genes del grupo I sólo se encuentran relacionados con la formación de biopelículas.

**Tabla 11.** Genes que presentan una expresión diferencial al comparar los grupos I y III. Para cada gen y su secuencia codificadora se utilizaron dos oligonucleótidos. Se indica el valor de la expresión diferencial promedio de cada gen obtenido de cuatro hibridaciones (tres réplicas experimentales y un intercambio de tinte) para el grupo I y seis hibridaciones (cuatro réplicas experimentales y dos intercambios de tinte) para el grupo III adquiridos de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\geq 1,5$  y (■) valores  $\geq 1,0$  y  $\leq 1,5$  indican los genes sobre-expresados en el grupo I y reprimidos en el grupo III, mientras que (■) valores  $\leq -1,5$  y (■) valores  $\geq -1,5$  y  $\leq -1,0$  indican sobre-expresión de genes en el grupo III.

N°	ORF	Gen	Descripción de la proteína	Función biológica	Grupo III		Grupo I	
					promedio	estadística	promedio	estadística
1	AFE_0696_110-164	<i>gfa</i>	Proteína activadora de formaldehído dependiente de glutatión	Metabolismo de metano, Metabolismo de carbono	1,032	5,68E-02	1,261	5,77E-03
	AFE_0696_227-281				1,015	8,16E-02	1,169	6,82E-03
2	AFE_0697_766-820	S-(hidroximetil)glutatión deshidrogenasa clase III alcohol deshidrogenasa	Glicólisis / Gluconeogenesis, Degradación de ácidos grasos, Tirosina metabolismo, Degradación de cloroalkano y cloroalkeno, Degradación del naftaleno, Metabolismo del metano y el carbono, Degradación de compuestos aromáticos	1,099	1,72E-02	1,782	5,45E-03	
	AFE_0697_1027-1081			0,993	1,31E-02	1,593	4,10E-03	
3	AFE_0707_502-556	Proteína hipotética	Dominio: TPR	-1,025	6,31E-03	2,911	7,03E-03	
	AFE_0707_905-959			-0,916	1,59E-02	2,753	9,05E-03	
4	AFE_0709_171-225	Proteína hipotética		-1,194	1,48E-03	2,922	4,36E-03	
	AFE_0709_35-89			-1,287	1,63E-01	2,819	5,77E-03	
5	AFE_0710_440-494	Proteína de unión a grupo de hierro-azufre, familia Rieske	Dominio: Rieske, NifU.	-0,718	3,48E-02	2,572	4,10E-03	
	AFE_0710_651-705			-1,069	5,95E-02	2,542	1,00E-02	
6	AFE_1998_141-195	<i>orf3</i>	Proteína hipotética	-2,245	1,45E-03	1,976	4,00E-02	
	AFE_1998_338-392			-1,98	1,84E-03	1,932	7,71E-03	

De los 6 genes inducidos por QS que participan en la formación de biopelículas, 4 de ellos se observaron transcritos preferencialmente en células sésiles; el gen AFE\_0710 presentó un dominio putativo relacionado con la unión a grupos de hierro-azufre (familia Rieske), mientras que los otros 3 genes (AFE\_707, AFE\_0709 y *orf3*) codifican proteínas hipotéticas. Cabe destacar que el gen *orf3* (AFE\_1998) codifica una proteína hipotética que participa en el sistema QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 20).

Por otro lado, los genes *gfa* (AFE\_0696) y AFE\_0697 no muestran un cambio similar en sus niveles de ARNm en ambos grupos y se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol (grupo III) y sobre-expresados en células sésiles con tetrazol al ser comparadas contra células planctónicas con tetrazol (grupo I, Tabla 11). El gen *gfa* participa en la conversión reversible de formaldehído a S-hidroximetilglutación, mientras que el gen AFE\_0697 participa en el consumo de S-hidroximetilglutación y la síntesis de S-formilglutación (Fig. 52). En conjunto, ambos genes están relacionados con el consumo de formaldehído, un compuesto que favorece el crecimiento y desarrollo de las biopelículas (Ong y col., 2006). Por otro lado, al estudiar los resultados de expresión diferencial de ambos genes en la Tabla 11, se observó que ellos se encuentran sobre-expresados en el grupo I, es decir, presentaron una alta expresión en células sésiles con tetrazol al ser comparadas contra su expresión en células planctónicas con tetrazol favoreciendo la acumulación de formaldehído. Por el contrario, ambos genes se encuentran reprimidos en el grupo III, es decir, presentaron una represión en células sésiles con tetrazol al compararlas contra su expresión en células sésiles sin tetrazol, no favoreciendo la acumulación de formaldehído. Además, se sabe que el gen *gfa* se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol (grupo II, anexo 2). De acuerdo a lo anterior, los genes *gfa* y AFE\_0697 podrían estar siendo reprimidos por el tetrazol en células sésiles y planctónicas inhibiendo la conversión de formaldehído a formato. Por otro lado, según los análisis en el grupo I estos genes podrían estar siendo regulados por otro sistema distinto a QS al encontrarse sobre-expresados en células sésiles con tetrazol cuando se compara contra células planctónicas con la misma molécula.

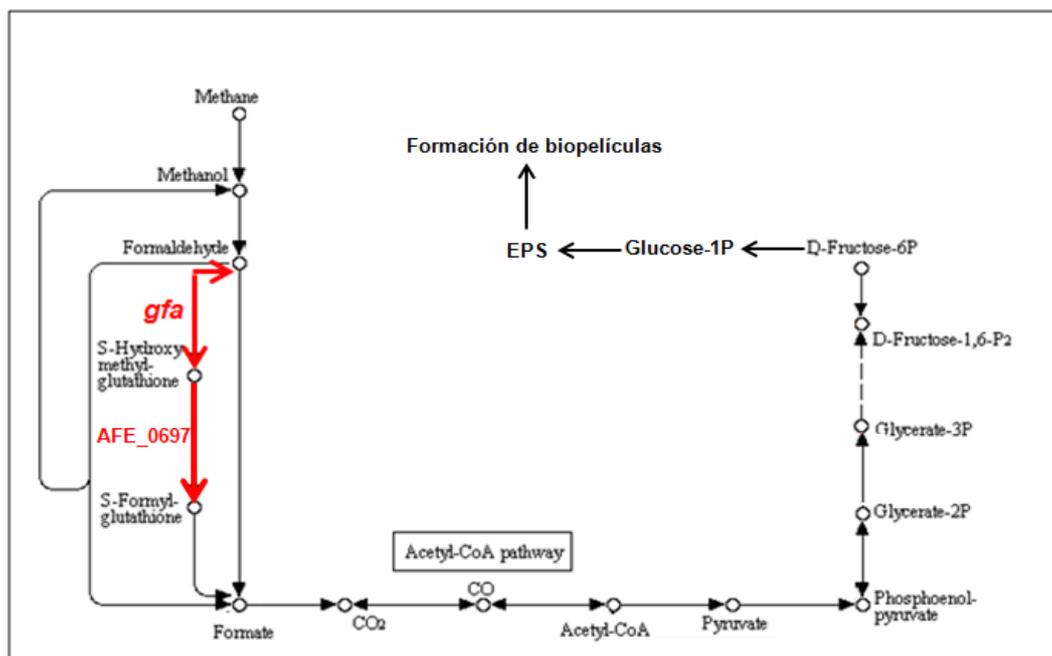


Figura 52. Descripción de la participación de los genes *gfa* y AFE\_0697 en la formación de biopelículas. Se observa que el gen *gfa* participa en la conversión reversible de formaldehído a S-hidroximetilglutathión y que el gen AFE\_0697 participa en la síntesis de S-formilglutathión.

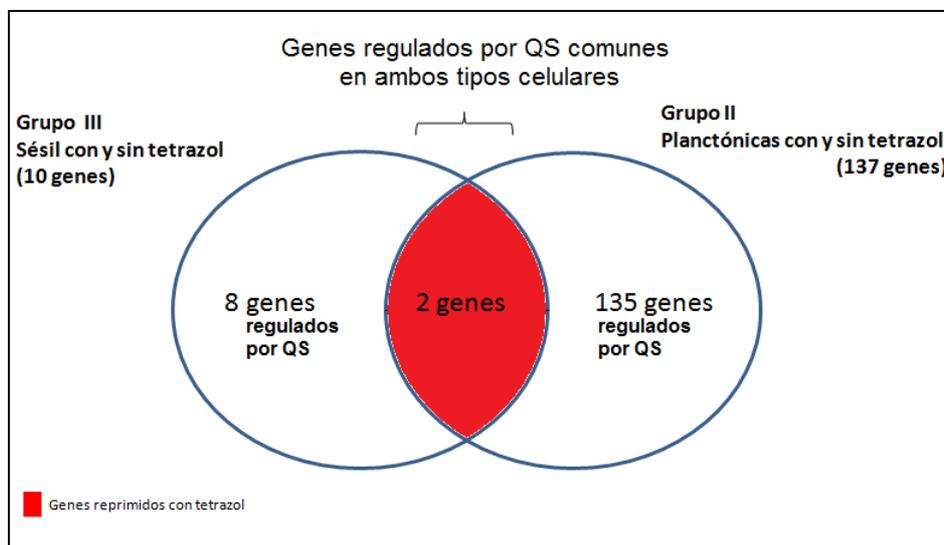
### **Comparación entre la transcripción global del grupo II y la transcripción global del grupo III**

Para comparar la transcripción global de genes de células planctónicas con tetrazol del grupo II (137 genes) y la transcripción global de células sésiles con el mismo inductor del grupo III (10 genes) se determinó que los genes reprimidos corresponderán a valores de expresión (definidos por el  $\log_2^{\text{DMSO}/\text{tetrazol}} \geq 1,0$  y  $\leq -1,0$  para los genes sobre-expresados en ambos grupos.

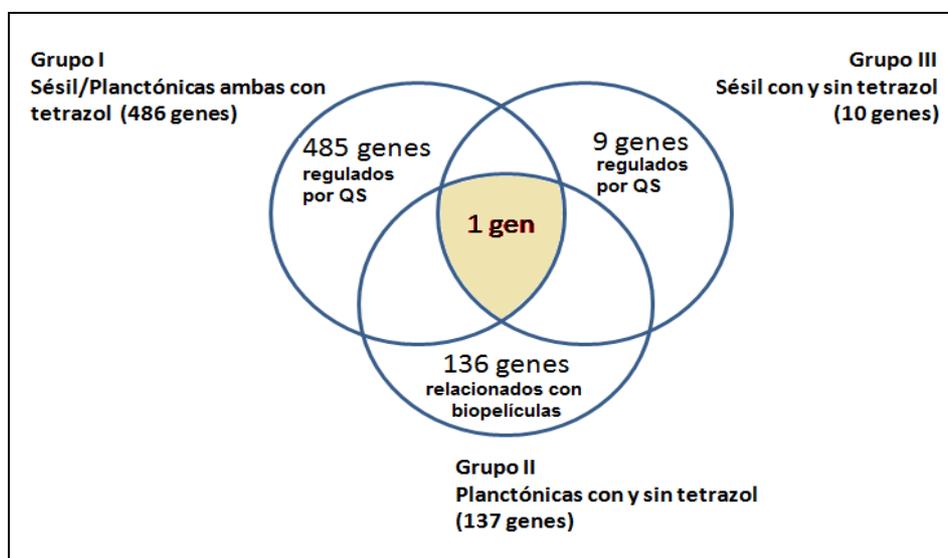
Los resultados obtenidos al realizar la comparación transcripcional entre los grupos II y III indicaron que 2 genes presentan cambios similares en sus niveles de ARNm en ambos grupos (Fig. 53). Los genes AFE\_0030 (proteína hipotética) y *gfa* se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol (grupo III) y también en células planctónicas tratadas con esta misma molécula (grupo II). Ambos genes presentan un mismo patrón de represión en los dos grupos, lo que indica que podrían estar reprimidos por tetrazol (ó el sistema QS) en ambos tipos celulares.

### **Comparación entre la transcripción global de los grupos I, II y III**

Al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I, II y III se observó que sólo el gen *gfa* es común y presenta una expresión diferencial en los tres grupos (Fig. 54). El gen *gfa*, de acuerdo a los análisis de las comparaciones anteriores, se encuentra reprimido en células planctónicas y sésiles con tetrazol, grupo II y III respectivamente, mientras que en el grupo I se encuentra sobre-expresado en células sésiles con tetrazol. Esto sugiere que este gen podría estar regulado de forma independiente al sistema QS y los cambios de sus niveles de ARNm podrían variar según el tipo celular (planctónicas o sésiles) en el que se estudie.



**Figura 53. Resultado del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos II y III.** Un total de 2 genes (*AFE\_0030* y *gfa*) se encuentran regulados por tetrazol y presentan una expresión diferencial en ambos grupos. Se observa que 145 genes son regulados por QS.



**Figura 54. Resultado del análisis de la transcripción de genes al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I, II y III.** Sólo 1 gen (*gfa*) presenta una expresión diferencial en los tres grupos.

## Conclusión de los análisis de microarreglos de ADN

Los resultados obtenidos en los diferentes análisis de microarreglos de ADN realizados para identificar los genes regulados por el sistema QS (regulón QS), y en particular aquellos genes relacionados con la formación de biopelículas (específicamente los vinculados con la síntesis de precursores de EPS) indicaron que:

Se identificaron 137 genes que responden al efecto generado por la molécula de tetrazol (regulón QS) en células planctónicas (grupo II). De estos genes, 58 codifican proteínas hipotéticas, 45 sólo presentaron dominios putativos y 34 se encontraron descritos de acuerdo a su función biológica. Dentro de estos 34 genes descritos, 14 están relacionados con la síntesis de precursores de EPS (Fig. 35).

Se identificaron 10 genes que responden al efecto de tetrazol en células sésiles (grupo III). De estos genes, 4 codifican proteínas hipotéticas, 3 sólo presentaron dominios putativos y 3 genes (AFE\_0697, *gfa* y AFE\_0698) se encontraron descritos de acuerdo a su función biológica, participando en la conversión de formaldehído a formato (Fig. 40).

Se identificaron 486 genes vinculados con la formación de biopelículas y que presentaron una expresión diferencial al comparar la transcripción global de células sésiles con tetrazol y la transcripción global de células planctónicas con tetrazol (grupo I). De estos genes, 145 codifican proteínas hipotéticas, 156 sólo presentaron dominios putativos y 185 se encontraron descritos de acuerdo a su función biológica. Dentro de estos 185 genes descritos, 16 se encontraron relacionados con la síntesis de precursores de EPS (Fig. 46).

Se identificaron 145 genes pertenecientes al regulón QS (Fig. 47, 51 y 53, Anexos 1, 2, 3 y 4). Dentro del regulón QS 14 genes (0,4 % del genoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>) están relacionados con la síntesis de precursores de EPS (Fig. 50).

### 4.3 Construcción de un mutante nulo del gen *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> para analizar su efecto en la adherencia sobre el mineral

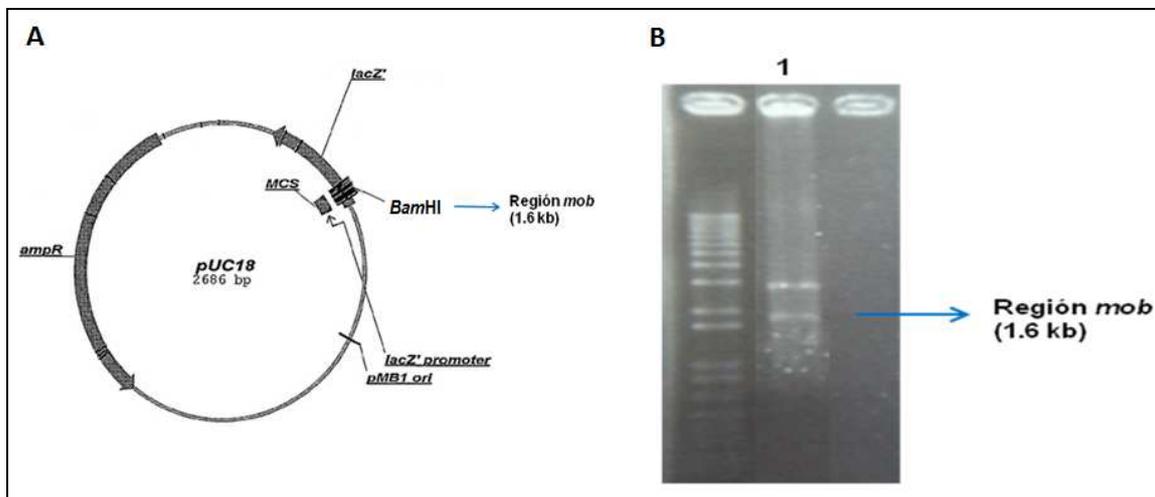
#### 4.3.1 Construcción de un vector suicida mediante ingeniería genética

##### 4.3.1.1 Construcción de los vectores suicida pSM1a y pSM1b

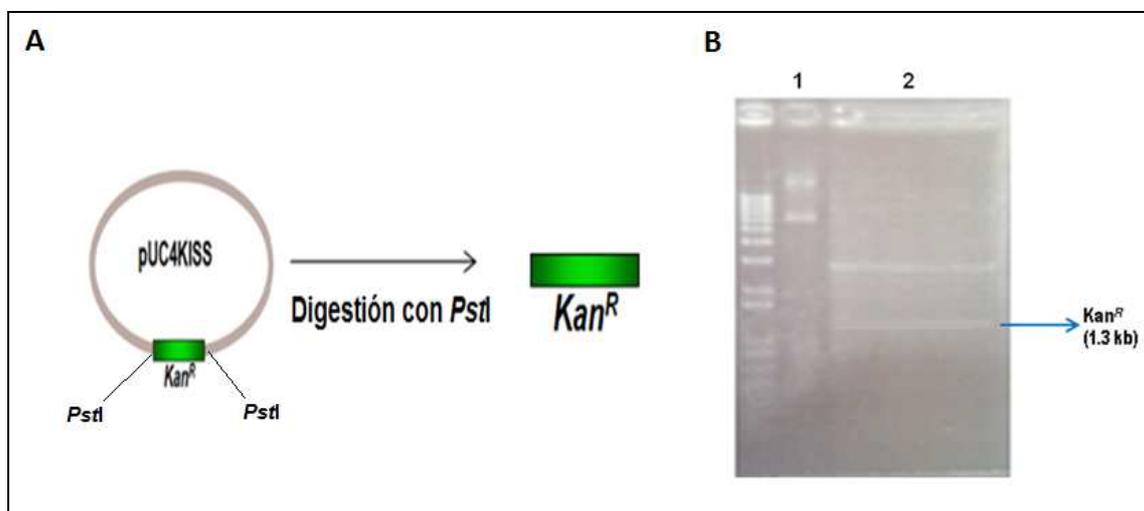
###### pSM1a

La construcción del vector suicida pSM1a se realizó mediante la inserción del gen de resistencia a kanamicina y de un gen *afeI* trunco en el vector pUC18mob (Liu y col., 2000). Este vector se encontraba disponible en el laboratorio de la Dra. Bonnefoy con la región mob inserta. Debido a que esta región es indispensable para la movilización del plásmido, lo primero que se realizó fue verificar la presencia de esta región en el vector (Fig. 55). Posteriormente, para insertar el gen de resistencia a kanamicina (1.3 kb) en el vector pUC18mob, se realizó una digestión del plásmido pUC4KISS con la enzima de restricción *PstI* para escindir el gen de resistencia (Fig. 56). Con esta misma enzima también se cortó el vector pUC18mob para posteriormente ligarlo con el gen de resistencia. El producto de esta reacción de ligación pUC18mob Kan<sup>R</sup> fue verificado en geles de agarosa (Fig. 57).

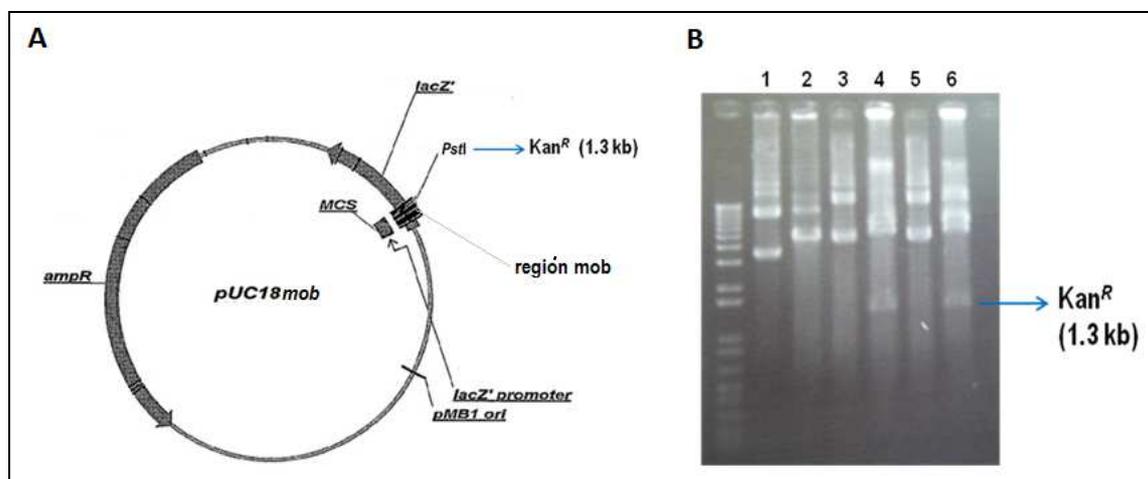
La construcción del gen *afeI* trunco (253 pb, Fig. 58A) fue obtenido por PCR y posteriormente se ligó en el vector pCR-Blunt-TOPO. El producto de esta reacción de ligación (pCR-Blunt-TOPO $\Delta$ *afeI*) se introdujo en células quimiocompetentes JM109 de *E. coli* para su replicación. Para escindir el gen *afeI* trunco se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (Fig. 58B). Finalmente, se cortó el plásmido pUC18mob Kan<sup>R</sup> con la enzima *EcoRI* para ligar el gen *afeI* trunco y obtener el vector suicida pSM1a (pUC18mob $\Delta$ *afeI* Kan<sup>R</sup>, Fig. 59).



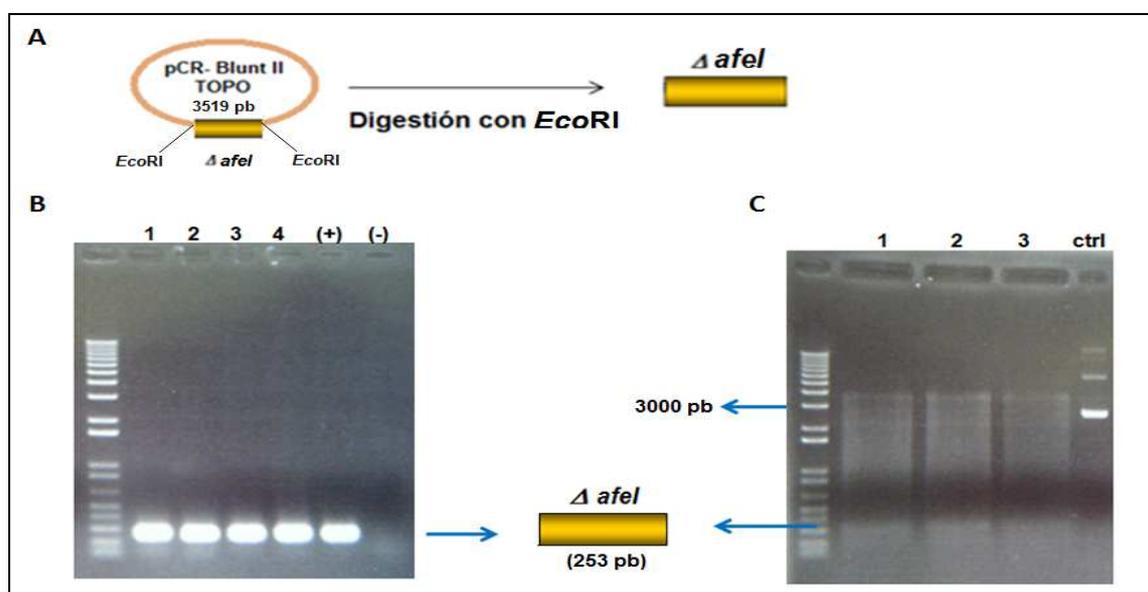
**Figura 55. Verificación de la presencia de la región mob (1.6 kb) en el vector pUC18 (2.6 kb).** A, mapa del plásmido y sitios de inserción de la región mob. B, se realizó una digestión con la enzima de restricción *Bam*HI a un clon positivo (1).



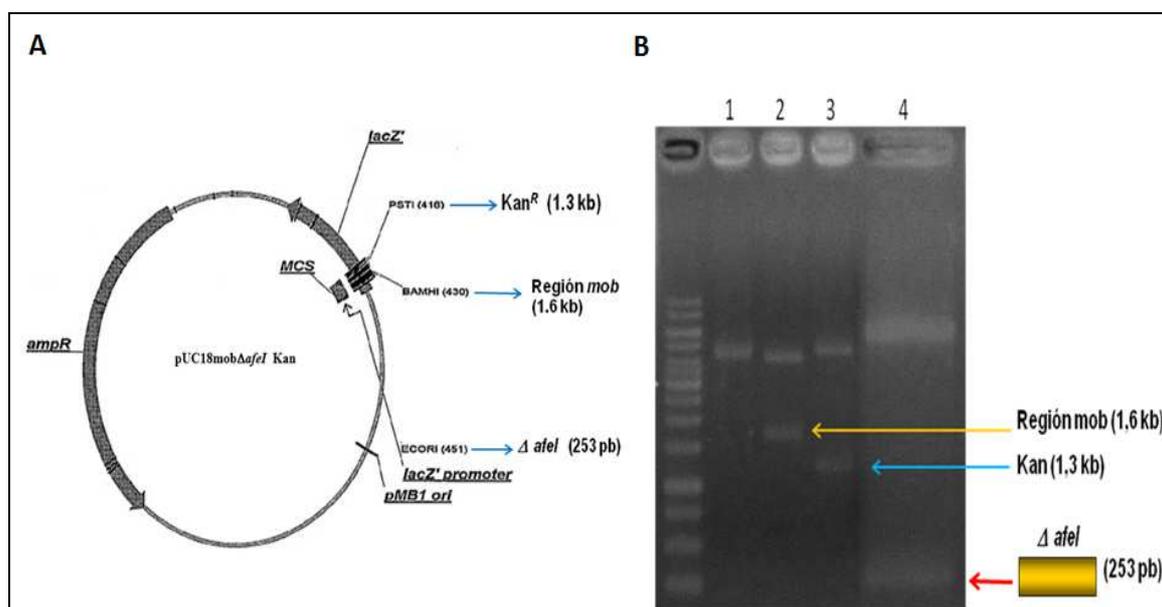
**Figura 56. Obtención del gen de resistencia a kanamicina desde el plásmido pUC4KISS.** A, para escindir el gen de resistencia a kanamicina se realizó una digestión con la enzima de restricción *Pst*I. B, pUC4KISS sin digerir (1) y plásmido pUC4KISS digerido (2).



**Figura 57. Verificación de la inserción del gen de resistencia a kanamicina en el vector pUC18mob.** A, mapa del plásmido pUC18mob y sitio de inserción del gen de kanamicina. B, para verificar la inserción del gen de resistencia a kanamicina se realizó una digestión con la enzima de restricción *PstI* a los clones positivos. 1, vector pUC18mob sin digerir, 2, pUC18mob digerido con *PstI*. 3 y 5, clones positivos sin digerir, y 4 y 6, clones positivos digeridos con *PstI*.



**Figura 58. Verificación y obtención del gen *afel* trunco desde el vector pCR-Blunt II TOPO.** A, mapa del vector pCR-Blunt II TOPO (3519 pb). Para escindir la construcción trunca del gen *afel* (253 pb) obtenida por PCR desde el vector de clonamiento pCR-Blunt-TOPO, se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. B, PCR con ADN genómico de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> y los partidores AFEI11 y AFEI22 para construir el gen trunco *afel*. C, digestión con *EcoRI* en tres clones positivos de pCR-Blunt-TOPOΔ*afel*, **ctrl**, pCR-Blunt-TOPOΔ*afel* sin digerir. (+) y (-) son controles positivo y negativo del PCR respectivamente.



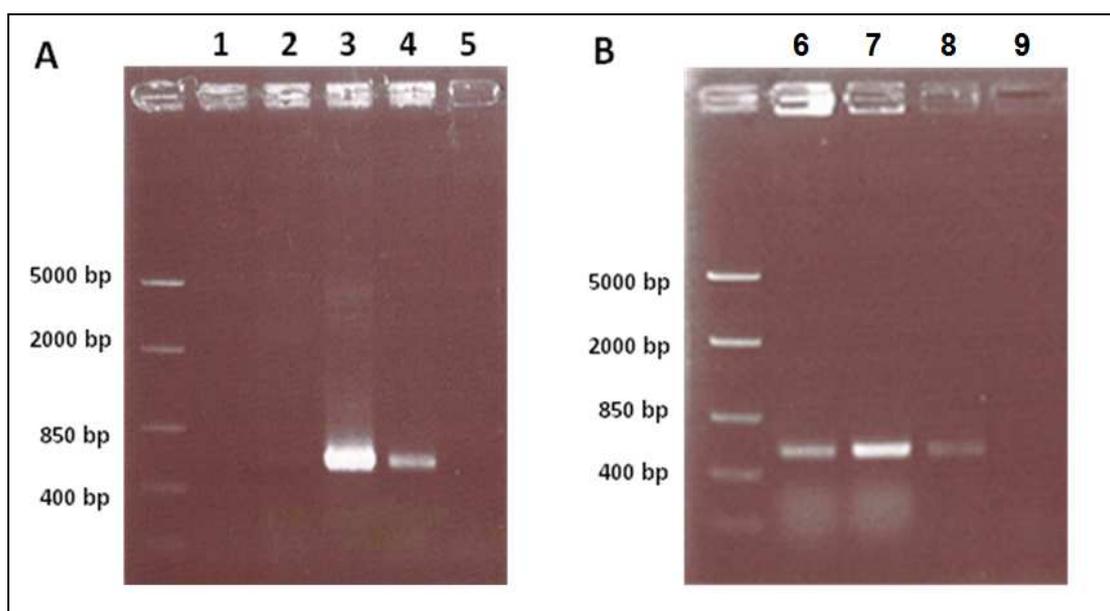
**Figura 59. Verificación de la construcción del vector suicida pSM1a (pUC18mob $\Delta$ afeI Kan).** A, mapa del vector pSM1a. B, para verificar la presencia de la región mob, el gen de resistencia a kanamicina y el gen trunco *afeI*, se realizaron tres digestiones con *Bam*HI, *Pst*I y *Eco*RI respectivamente a un clon positivo de pSM1a. 1, pSM1a (5,8 kb), 2, pSM1a digerido con *Bam*HI, 3, pSM1a digerido con *Pst*I y 4, pSM1a digerido con *Eco*RI.

## pSM1b

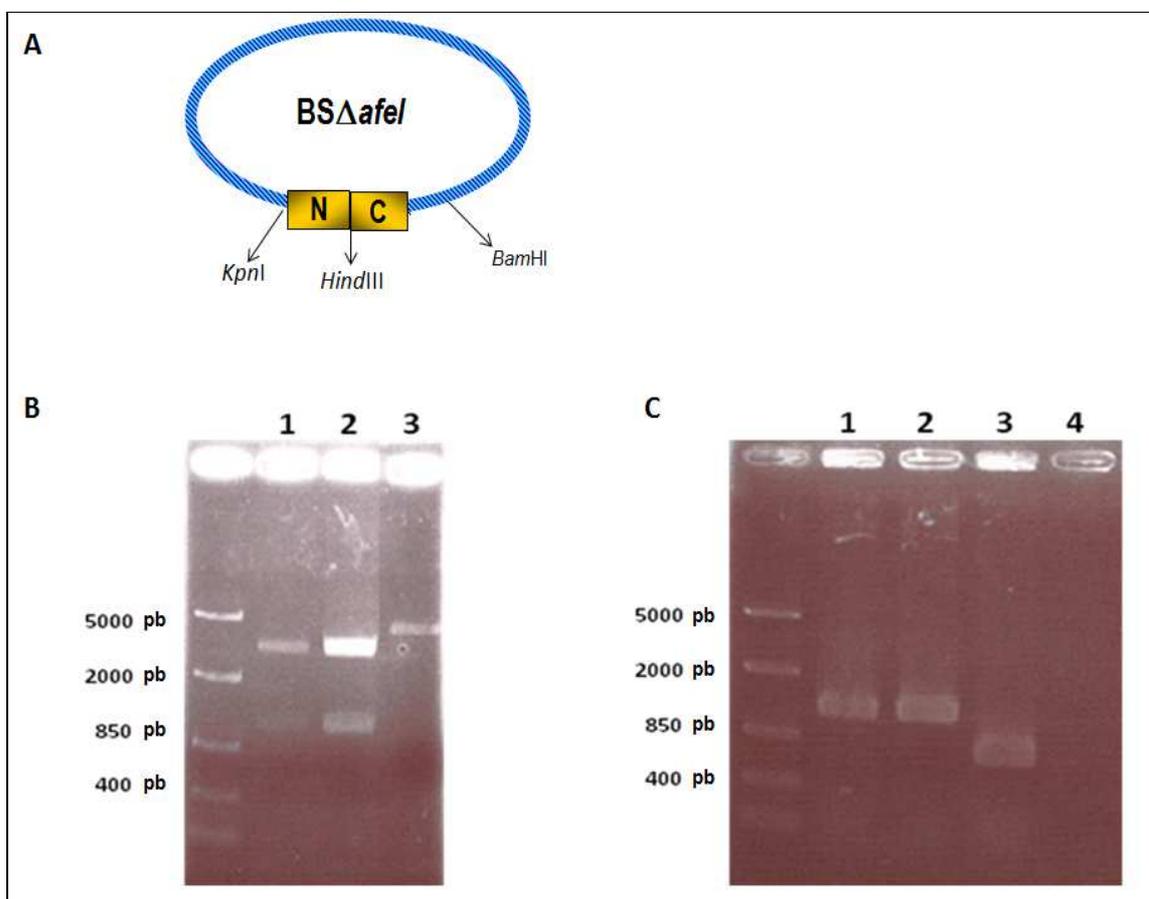
La construcción del vector suicida pSM1b se realizó mediante la inserción de: i) el gen de resistencia a kanamicina (2 kb) flanqueado por los extremos N-terminal y C-terminal del gen *afeI* ( $\Delta afeI$ ) y ii) de la región *mob* (1.6 kb) en el plásmido Bluescript (BS). Para construir el fragmento correspondiente al gen de Kanamicina flanqueado por  $\Delta afeI$ , primero se obtuvo mediante PCR la amplificación de los extremos N-terminal y C-terminal del gen *afeI*, denominadas regiones N y C respectivamente (Fig. 60). Posteriormente, se procedió a insertar estas dos regiones en el plásmido BS a través de sitios de restricción específicos existentes tanto en el plásmido como en las mismas regiones N y C, tal como se describe en materiales y métodos (pág. 53, Fig. 17, 18 y 61). Finalmente, se efectuó una digestión del plásmido BS $\Delta afeI$  con la enzima *HindIII* y *BamHI* para insertar el gen de resistencia a kanamicina y la región *mob* respectivamente. Así, se logró obtener el vector suicida pSM1b (BS*mob* $\Delta afeI$ ::Kan) (Fig. 62). De esta forma, se esperaba que el gen  $\Delta afeI$  mediante una doble recombinación homóloga fuese capaz de interrumpir el gen silvestre *afeI* (Fig. 16, Materiales y Métodos).

### 4.3.2 Intento de obtención del mutante *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>

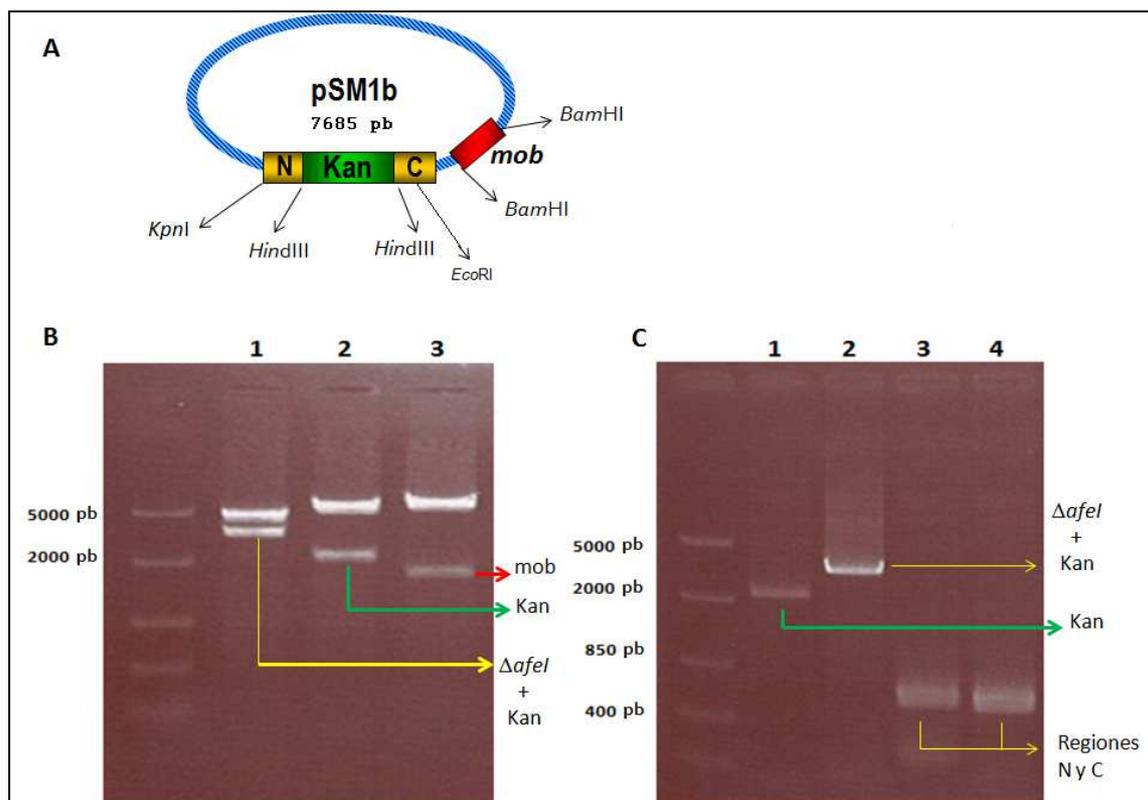
Los primeros experimentos de conjugación se realizaron utilizando el vector suicida pSM1a en la cepa S17.1 de *E. coli*, la cual se usó como cepa dadora. En tanto, la cepa de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se utilizó como cepa receptora. Todos los experimentos fueron efectuados en medio DOP sólido de conjugación (medio de “mating”) a un pH 4,5 y 5,2. Además, se realizaron distintos tiempos de conjugación (de 3 a 5 días) y distintas proporciones de cepa dadora y receptora (1:1, 1:2 y 2:1).



**Figura 60. Verificación de la inserción de la región N y C en el plásmido BS.** Para confirmar la presencia de las regiones N (A) y C (B) en plásmido BS se realizó una reacción de PCR con los oligos AFEIN1 y AFEIN2 para la región N y los oligos AFEIC1 y AFEIC2 para la región C. Carriles 1 y 2, clones negativos para la región N; 3, clon positivo del fragmento N y 4, control positivo del PCR. Carriles 6 y 7 clones positivos para la región C; 8 control positivo del PCR. Carriles 5 y 9 son controles negativos.



**Figura 61. Verificación de la construcción del gen trunco  $\Delta$ *afeI* (región N-C) en el plásmido BS.** **A**, mapa del plásmido BS $\Delta$ *afeI*. **B**, digestión con la enzima *KpnI* y *BamHI* para escindir y comprobar la correcta construcción del gen trunco  $\Delta$ *afeI* correspondiente a las regiones N y C [1.1 kb] en dos clones positivos (carriles 1 y 2). Digestión con *HindIII* del plásmido BS $\Delta$ *afeI* (4 kb) control positivo de digestión (carril 3). **C**, PCR para amplificar la región N-C de los clones positivos antes mencionados (carriles 1 y 2). Controles positivo de la región N (3) y negativo (4) del PCR.



**Figura 62. Verificación de la construcción del vector suicida pSM1b (Bluescript *mob* $\Delta afel$ ::Kan).** A, mapa del vector suicida pSM1b. B, para verificar la presencia del gen de resistencia a kanamicina flanqueado por el gen trunco *afel* (3127 pb), el gen de resistencia a kanamicina (2014 pb) y la región *mob* (1600 pb), cuatro digestiones fueron realizadas para un clon positivo. 1, *KpnI* y *EcoRI*; 2, *HindIII*; 3, *BamHI*. C, PCR para verificar la presencia del gen de resistencia a kanamicina (1), del gen de resistencia a kanamicina flanqueado por el gen trunco *afel* (2), del fragmento de 570 pb N-terminal de *afel* (3) y del fragmento de 543 pb C-terminal de *afel* (4).

---

Finalmente, la recuperación de cada experimento de conjugación se incubó en medio DOP sólido (con FeSO<sub>4</sub> al 0.2 %) y líquido (con azufre en polvo) con y sin kanamicina (100 y 200 µg/ml) durante 10 a 15 días. Al no obtener resultados al utilizar el vector pSM1a, se utilizó el mismo esquema experimental con el vector suicida pSM1b.

Los resultados obtenidos en los experimentos de conjugación utilizando el vector pSM1b están descritos en la Tabla 12. Se obtuvieron microcolonias resistentes a kanamicina (100 y 200 µg/ml) a los tres y cinco días de incubación en las placas de conjugación. Las microcolonias fueron muy pequeñas. No fue posible verificar por PCR la presencia del gen *afeI* deletado ó interrumpido en ninguna de ellas. Utilizando la misma técnica se intentó verificar la presencia del gen de kanamicina en las microcolonias obtenidas, pero no se obtuvieron resultados positivos. En forma paralela, se realizó la replicación de estas microcolonias en nuevas placas de medio sólido y en cultivos de medio líquido DOP con y sin kanamicina para descartar la posible degradación del antibiótico ó la aparición de mutantes espontáneas resistentes a kanamicina. Sin embargo, no se observó crecimiento celular en ninguno de los medios (líquido y sólido). Esto puede explicarse debido a que las microcolonias obtenidas murieron durante su crecimiento, razón por la cual presentaron un pequeño tamaño y por lo que no crecieron cuando fueron replicadas en medio sólido y líquido. Por otro lado, se descartó que las microcolonias obtenidas correspondieran al crecimiento de microcolonias de la cepa dadora de *E. coli* debido a que el medio de conjugación al no ser idóneo para su desarrollo, podría haber retardado su crecimiento. Para ello se realizó una nueva replicación de las microcolonias resistentes a kanamicina en placas de agar LB (medio idóneo para el crecimiento de *E. coli*) y no se observó crecimiento.

No se obtuvieron resultados positivos al recuperar los conjugantes en medio líquido en ninguna condición.

**Tabla 12.** Resultados de los experimentos de conjugación con el vector pSM1b.

Proporción cepa dadora/receptora	Recuperación / 30°C	Kanamicina (µg/ml)	Tiempo de conjugación			
			3 días		5 días	
			N° de colonias resistentes (pH 4,5)	N° de colonias resistentes (pH 5,2)	N° de colonias resistentes (pH 4,5)	N° de colonias resistentes (pH 5,2)
1:1	Medio sólido	100	96	2	6	0
		200	0	0	1	0
2:1	Medio sólido	100	498	7	251	5
		200	0	1	15	0
1:2	Medio sólido	100	75	0	0	3
		200	0	0	0	0

#### 4.4 Identificación del sitio de unión de AfeR en la región reguladora del gen *afeI*

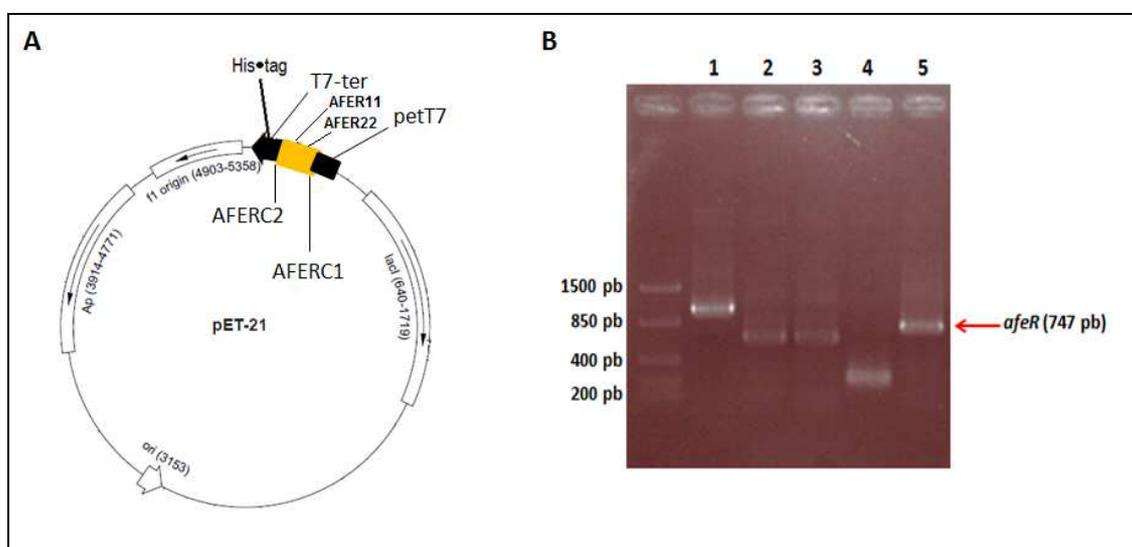
##### 4.4.1 Construcción de un vector de expresión para AfeR

La construcción del vector de expresión para AfeR se realizó en el plásmido pET21 debido a que dicho plásmido contiene un promotor fuerte (T7) inducible y una región que codifica un His•tag al término de su sitio de multiclonamiento. De esta forma, al insertar el gen *afeR* mediante los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* en el sitio de multiclonamiento, dicho gen al expresarse generará una proteína AfeR con una cola de histidina que ayudará a la purificación. El fragmento de ADN correspondiente al gen de *afeR* se obtuvo mediante una reacción de PCR con los partidores AFERC1 y AFERC2 (Tabla 7, pag. 62), los cuales permitieron obtener la amplificación de dicho gen flanqueado con los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI*. Para verificar la correcta inserción del gen *afeR* en el plásmido pET21 se efectuó una reacción de PCR con los partidores descritos en la Tabla 7 (Fig. 19 y 63).

##### 4.4.2 Expresión y purificación de AfeR

El plásmido pET21/*afeR* fue insertado en la cepa Rosetta (DE3)/pLysS de *E. coli* debido a que esta cepa contiene el fago lisogénico  $\lambda$  DE3 que expresa el gen de la ARN polimerasa del fago T7, el cual se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5* y puede ser inducido con IPTG. De esta manera, fue posible inducir la expresión de AfeR.

Las condiciones de expresión y purificación de AfeR están descritas en materiales y métodos. En el proceso de purificación, la muestra de AfeR fue cargada en una columna HisTrap<sup>TM</sup> Talon<sup>®</sup> crude (cobalto) y fue eluída con distintas concentraciones de imidazol, obteniéndose 5 fracciones (F5, F50, F150, F250 y F500 corresponden a las fracciones eluídas con 5, 50, 150, 250 y 500 mM de imidazol respectivamente). Se midió la concentración de proteínas en cada fracción y se observó que sólo las fracciones F50 y F150 contenían una concentración de proteínas adecuada para los siguientes análisis. Para verificar la presencia de AfeR en las fracciones F50 y F150, se realizaron análisis mediante



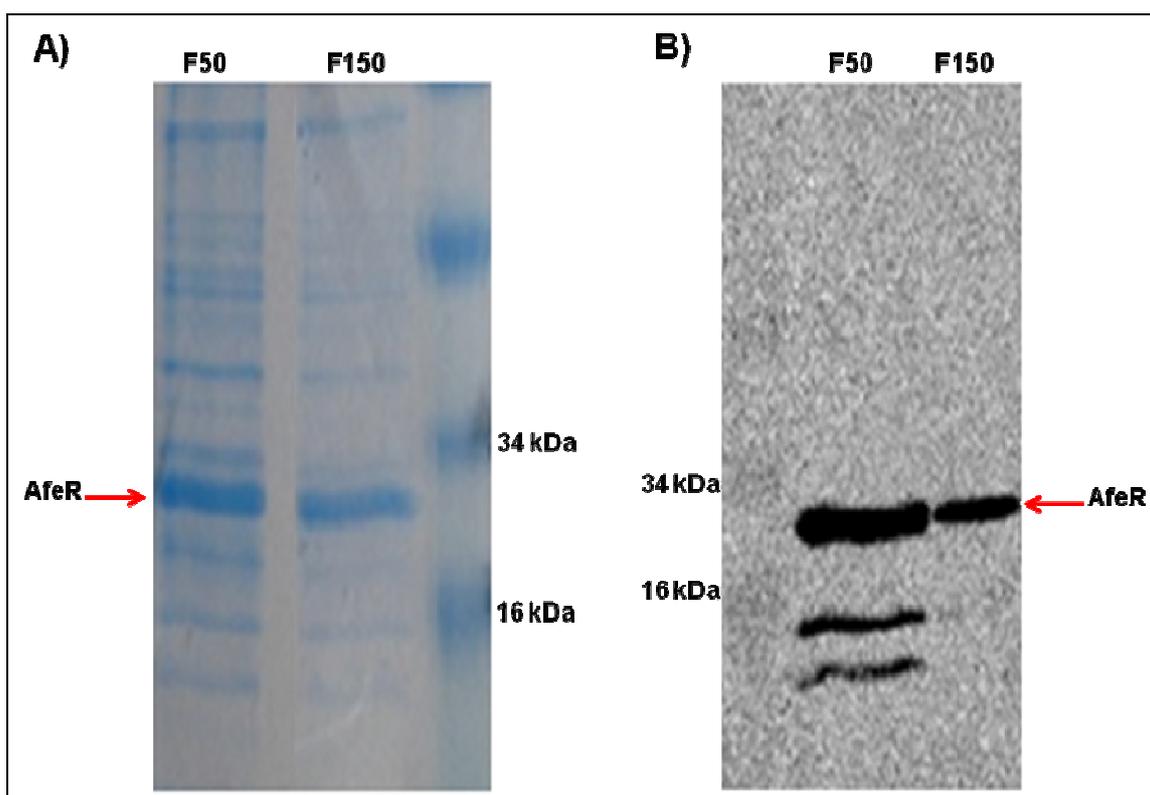
**Figura 63. Verificación de la correcta inserción del gen *afeR* en el plásmido pET21.** **A**, mapa del vector pET21/*afeR*. **B**, PCR utilizando los partidores: **1**, petT7 - T7 ter (inserto completo, 966 pb); **2**, petT7 - AFER11 (598 pb); **3**, AFER22 - T7ter (590 pb); **4**, AFER11 - AFER22 (control positivo, 222 pb) y **5**, AFERC1 - AFERC2 (*afeR*).

SDS-PAGE y Western Blot con anticuerpos anti 6His-tag. Ambas fracciones (F50 y F150) contenían una proteína con un peso molecular similar al de AfeR (27 kDa aproximadamente) reconocida por los anticuerpos anti His-tag (Fig. 64).

Los resultados obtenidos indican que se obtuvo la proteína AfeR parcialmente purificada debido a que se observaron varias bandas al realizar un SDS-PAGE, mientras que en la fracción F50 se observan tres bandas detectadas por Western blot, lo que sugiere que hubo una degradación desde el NH<sub>2</sub>-terminal (Fig. 64). Sin embargo, la fracción F150 presentó sólo una banda correspondiente al tamaño del regulador transcripcional (Fig. 64B). Para comprobar la obtención de AfeR en la muestra purificada, se utilizó la banda que coincide con el tamaño de AfeR obtenida en el gel de acrilamida de la fracción F150 para secuenciarla (Fig. 64A). Los análisis de secuenciación (MALDI-TOF) confirmaron la presencia de AfeR en la fracción F150.

#### **4.4.3 Identificación mediante un ensayo de cambio de movilidad electroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assays” - EMSA) de la secuencia de ADN donde se une AfeR**

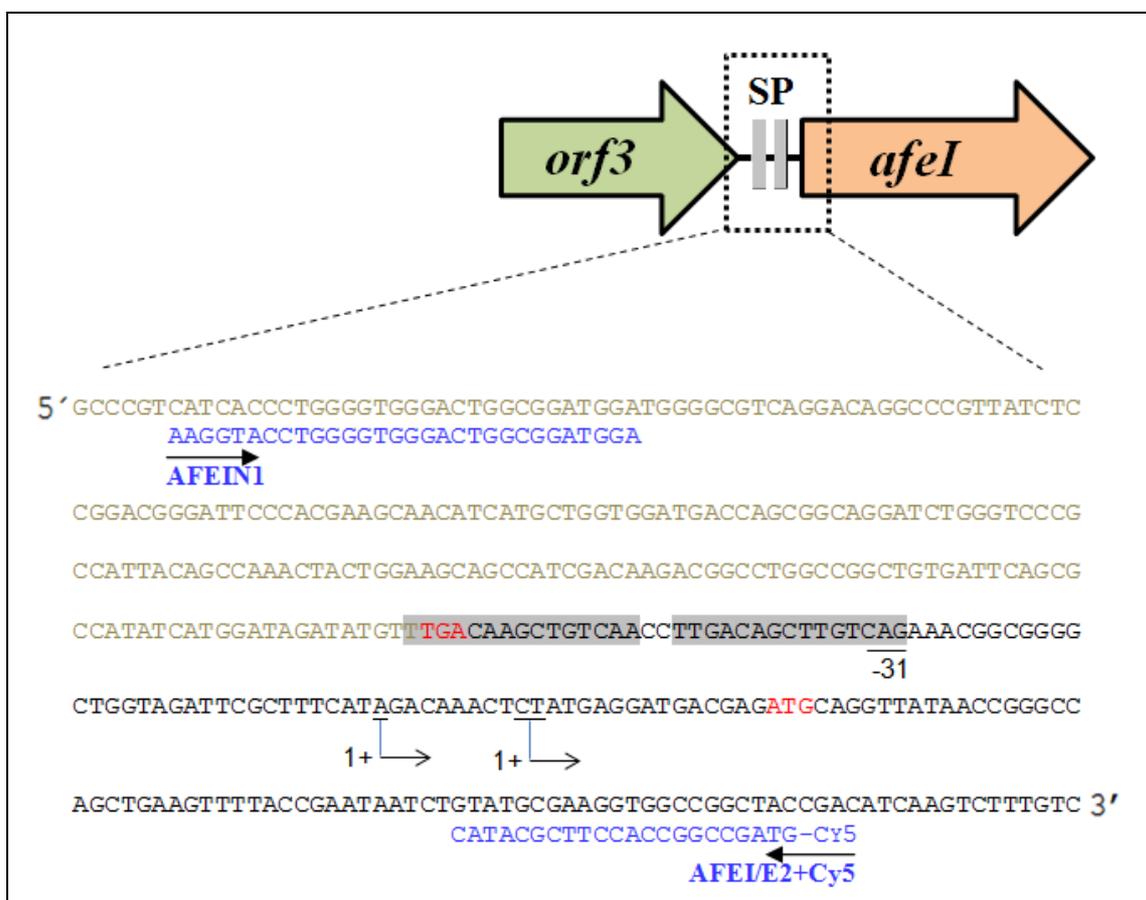
Para identificar el sitio de unión de AfeR en el genoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, se utilizó la técnica de EMSA para analizar las interacciones entre AfeR-ácido nucleico. De esta forma, cuando AfeR se acople a una región de ADN provocará un cambio en el peso molecular de esta región, lo cual modificará su capacidad de migración en un gel de electroforesis permitiendo su identificación. Una vez conocida dicha secuencia de ADN, será posible mediante análisis bioinformáticos identificar otros genes que presenten la misma secuencia y sean regulados por AfeR.



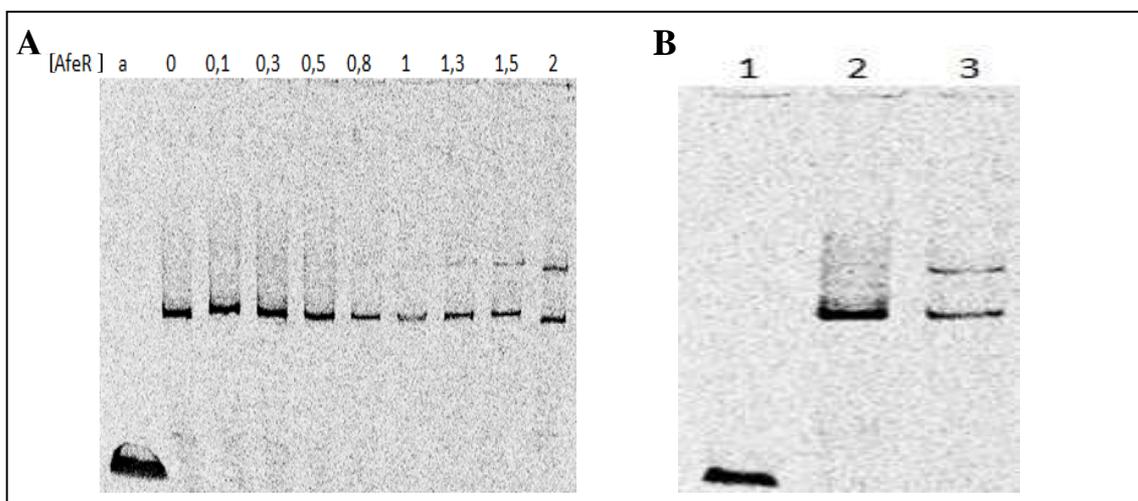
**Figura 64. SDS-PAGE de la purificación parcial de AfeR.** A, Tinción con azul de Coomassie. B, Western blot (immunodetección) con anticuerpos anti 6His•tag. El tamaño teórico de AfeR es de 27,530 kDa.

En los experimentos de EMSA se analizó la unión de AfeR en la región reguladora del gen *afeI*, puesto que dicho gen participa en el sistema QS y se encuentra sobre-expresado al inducir dicho sistema (Fig. 30 y Anexo 4). Los ensayos de EMSA se realizaron con 2,3 ng de un fragmento de ADN (360 pb, Fig. 65) correspondiente a la región reguladora del gen *afeI* y distintas concentraciones de la proteína AfeR (parcialmente purificada, F150) para identificar la concentración de proteína necesaria para lograr el efecto de retardo del fragmento de ADN. Una vez conocida la concentración de proteína idónea para realizar los experimentos de EMSA, se procedió a ejecutar un ensayo de competición de ADN para verificar la especificidad de unión entre AfeR y el fragmento de ADN.

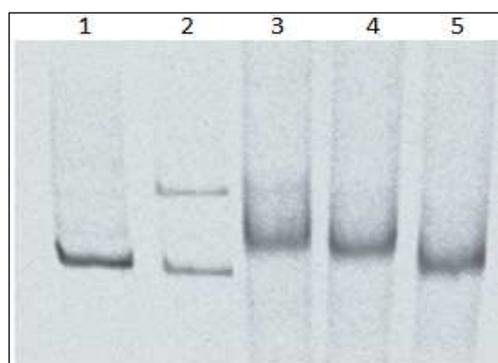
Los resultados indicaron que AfeR es capaz de unirse al fragmento de ADN de 360 pb correspondiente a la región reguladora de *afeI*. En adición, se determinó que una concentración de proteína de 1,3  $\mu$ M es suficiente para generar un retardo en la migración del fragmento de ADN estudiado (Fig. 66). Por otro lado, se observó que AfeR no es capaz de unirse al fragmento interno del gen *rrs* de *Thiomonas arsenitoxydans* y se verificó que éste regulador transcripcional es capaz de unirse específicamente al fragmento de ADN de la región reguladora de *afeI* debido a que al realizar el ensayo de competición de ADN se observó una disminución del retardo del fragmento de ADN marcado (marcaje con Cy5, Materiales y Métodos) al utilizar distintas concentraciones del mismo fragmento no marcado (Fig. 67).



**Figura 65. Secuencia de ADN de la región reguladora del gen *afeI* utilizada en los ensayos de “Electrophoretic Mobility Shift Assay”.** La secuencia de ADN (360 pb) utilizada en los ensayos de EMSA se obtuvo por PCR usando los oligos AFEIN1 y AFEI/E2+Cy5. Se observa que dicha secuencia contiene las secuencias palindrómicas (SP, en gris) de la región reguladora del gen *afeI* (cajas *afe*) y una región correspondiente al extremo 3' del gen *orf3*. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (1+) del gen *afeI*, en rojo el sitio de término de la traducción del gen *orf3* (TGA) y el de inicio del gen *afeI*.



**Figura 66. Unión de AfeR a la región reguladora del gen *afeI*.** **A**, EMSA con distintas concentraciones de AfeR y el fragmento de ADN (2,3 ng) de la región reguladora del gen *afeI*. Control negativo (a) corresponde a una región de ADN (2,3 ng) del gen *rrs* que codifica el rRNA 16S de *Thiomonas arsenitoxydans* + 2  $\mu$ M de AfeR. **B**, EMSA para verificar el resultado obtenido en el gel A. 1, control negativo como en (a); 2, fragmento de ADN; 3, fragmento de ADN + 2  $\mu$ M de AfeR.



**Figura 67. “Electrophoretic Mobility Shift Assay” para verificar la especificidad de unión de AfeR en la región reguladora del gen *afeI*.** Todos los ensayos se realizaron con 2  $\mu$ M de AfeR, excepto el carril 1. Los ensayos se realizaron como sigue: **1**, 2,3 ng de ADN marcado sin AfeR; **2**, 2,3 ng de ADN marcado con 2  $\mu$ M de AfeR; **3**, 2,3 ng de ADN marcado + 2,3 ng de ADN no marcado; **4**, 2,3 ng de ADN marcado + 6,9 ng de ADN no marcado; **5**, 2,3 ng de ADN marcado + 23 ng de ADN no marcado.

## 5. DISCUSIÓN

En el proceso de biolixiviación, la mayor parte de las bacterias que pertenecen al consorcio biominero utilizan como sustrato energético el hierro y el azufre que se encuentran en los sulfuros metálicos (Rawlings 2005). La energía utilizada por estos microorganismos es obtenida mediante la solubilización de los sulfuros metálicos producto del ataque químico que realiza el ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y los protones sobre los minerales (Sand y col., 2001; Rawlings, 2002; Rohwerder y col., 2003). Para aumentar la eficiencia en la obtención de energía, los microorganismos deben adherirse a la superficie del mineral, para lo cual deben producir SPE e iniciar el proceso de formación de biopelículas (Sand y col., 2006).

En distintas bacterias, el QS se encuentra relacionado con diferentes procesos metabólicos, siendo la formación de biopelículas uno de ellos (Karatan y Watnick, 2009). En nuestra bacteria modelo *At. ferrooxidans* ATCC 23270<sup>T</sup> se ha caracterizado la presencia de un sistema QS tipo AI-1 funcional y la presencia de determinadas AHLs (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). Esta información, nos permitió diseñar y desarrollar una serie de estrategias experimentales [ensayos de adherencia, microarreglos de ADN y ensayos de cambio de movilidad electróforética (EMSA)] con el fin de dilucidar el efecto biológico que generan las AHLs en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, específicamente en la capacidad de adherencia sobre sustrato mineral.

**Ensayos de adherencia.** Para determinar la regulación de la formación de biopelículas, ensayos de adherencia sobre cupones de azufre fueron desarrollados con el objetivo de identificar el rol biológico de cada análogo sintético de AHL analizado, en particular aquellos que generan un efecto positivo sobre la adherencia a sustrato mineral de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. En los experimentos de adherencia se generó un ambiente artificial donde el sistema QS se encuentra inducido, puesto que al utilizar en los cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> un análogo sintético de AHL capaz de unirse al regulador transcripcional AfeR se induce la formación del complejo AfeR-AHL que estimula la expresión o represión

de genes pertenecientes al regulón QS (Fig. 3, pág. 16). En cada ensayo de adherencia se utilizaron cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> que contenían una concentración de AHLs de 5  $\mu$ M y se observó mediante microscopía de fluorescencia la adherencia celular sobre los cupones de azufre a distintos tiempos de incubación.

Con las condiciones experimentales antes descritas, en los primeros ensayos de adherencia sobre los cupones de azufre observamos que las moléculas sintéticas OH-C12-AHL y OH-C14-AHL no afectan el crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 22, pág. 69) y favorecen la adherencia de esta bacteria sobre los cupones de azufre (Fig. 21, pág. 68). Estos resultados han sido publicados, así como el efecto de una mezcla de AHL (C14-AHL, OH-C14-AHL y oxo-C14-AHL) en la formación de biopelículas sobre cupones de azufre y pirita (González y col., 2013). Por otro lado, estos resultados revelaron que el efecto positivo de la adherencia celular sobre los cupones de azufre es visible a nivel fenotípico desde el tercer día de crecimiento e incubación con OH-C12-AHL o OH-C14-AHL a diferencia del control biótico sin AHL exógena que se observó desde el quinto día (Fig. 23, pág. 70). Esta observación es apoyada por lo descrito en *Erwinia carotovora* y *Yersinia pseudotuberculosis* donde la concentración de AHL incrementa desde la fase exponencial llegando a su máximo en la fase estacionaria temprana (Yates y col., 2002; Byers y col., 2002).

Para determinar el efecto de otros análogos sintéticos de AHL descritos como activadores o inhibidores del sistema QS se realizaron nuevos ensayos de adherencia sobre cupones de azufre. Los análogos imidazolium y tetrazol fueron utilizados (Fig. 26 y 27, respectivamente, págs. 73 y 74). Sabbah y col. (2012) demostraron mediante ensayos de bioluminiscencia que las moléculas de tetrazol que poseen una cadena alquil corta como grupo radical actúan como inductores del sistema QS. En *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> el tetrazol fue la molécula que mejor respuesta generó en la adherencia celular sobre los cupones de azufre, generando una mayor adherencia que la inducida por OH-C14-AHL durante el tercer día de incubación (Fig. 27 y 28, págs. 74 y 76).

Otros ensayos de adherencia fueron realizados con el análogo sintético imidazolium, el cual generó una inhibición del crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> (Fig. 24, pág. 72) y a su vez una disminución significativa en la adherencia de esta bacteria sobre los cupones de azufre (Fig. 26, pág. 73), principalmente en los días 3 y 5 de incubación de los cultivos. Este hecho coincide con lo descrito por des Essarts y col. (2013) quienes identificaron que la molécula 29-L-C03 (análogo estructural del imidazolium) actúa como un inhibidor del sistema QS a una concentración de 25  $\mu$ M y no afecta el crecimiento celular de *Pectobacterium*. Estos autores describieron que el efecto de inhibición del sistema QS provocado por las moléculas que presentan una estructura similar a imidazolium (29-L-C03, 29-L-B02, 29-L-A11 y 29-L-A06) depende de la concentración de molécula y de la fase de crecimiento celular, concluyendo que estas moléculas sólo exhiben una actividad de inhibición del sistema QS en *Pectobacterium* cuando se utilizan concentraciones sub-letales.

Todos los resultados descritos permitieron concluir que el sistema QS de tipo AI-1 tiene un papel en la regulación de la adherencia sobre sustrato mineral y por ende en la formación de biopelículas en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. Debido a esto, es de gran interés realizar nuevos estudios para identificar un análogo sintético que actúe como inhibidor del sistema QS y que no afecte el crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. De esta forma, sería posible obtener este sistema en sus dos condiciones (estimulado o reprimido), lo cual permitiría estudiar y comparar los resultados de mejor manera.

**Ensayos de qRT-PCR.** Los experimentos de qRT-PCR se desarrollaron con el objetivo de identificar en qué tiempo de la curva de crecimiento de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> podrían analizarse los niveles de transcripción de los genes que conforman el regulón QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia de un análogo sintético que estimule el sistema QS. Para ello, en presencia de las moléculas OH-C14-AHL y tetrazol se analizó mediante qRT-PCR los niveles de transcripción del gen *afeI* debido a que este gen codifica para la AHL sintasa que participa en el sistema QS descrito en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> y que su expresión se encuentra regulada por dicho sistema (Rivas y col., 2005).

Los experimentos se realizaron con ARN total de células planctónicas obtenidos en distintos tiempos de incubación. Se observó que el gen *afeI* presenta un aumento de los niveles de ARNm inducido por la molécula OH-C14-AHL desde las 48 horas post-inducción (Fig. 29, pág. 79). En los resultados posteriores descritos (Figura 30, pág. 81), el análogo sintético tetrazol, el cual provoca un mejor efecto sobre la adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> que OH-C14-AHL, induce un aumento significativo de los niveles de ARNm del gen *afeI* al tercer día post-inducción. Otros análisis de qRT-PCR realizados con ARN total de células sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> crecidas con tetrazol en condiciones similares a los experimentos en las células planctónicas (Anexo 7), revelaron que el gen *afeI* se encuentra sobre-expresado en el tercer día de incubación con tetrazol, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos de adherencia.

En conclusión podemos mencionar que al inducir células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con un análogo exógeno, tal como tetrazol, la expresión de *afeI* aumenta significativamente durante el tercer día post-inducción con tetrazol, lo cual sugiere que la transcripción del regulón QS debería ser efectiva.

**Microarreglos de ADN.** Para determinar la contribución del sistema QS sobre la expresión de los genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se realizaron experimentos de microarreglos de ADN, donde se utilizaron muestras de ARN total extraídas en el inicio de la fase exponencial de crecimiento de células planctónicas y sésiles de tres cultivos independientes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> con y sin tetrazol. Esta molécula fue seleccionada como un análogo sintético que genera un aumento en los niveles de ARNm del gen *afeI* e induce la adherencia de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> sobre los cupones de azufre. Los análisis del transcriptoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> fueron realizados de acuerdo a tres tipos de hibridaciones; i) ARN total de células sésiles versus el ARN total de células planctónicas, ambas con tetrazol (hibridación del grupo I), ii) ARN total de células planctónicas con y sin tetrazol (hibridación del grupo II) y iii) ARN total de células sésiles con y sin tetrazol (hibridación del grupo III).

Los resultados del análisis del transcriptoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> obtenidos mediante la técnica de microarreglos de ADN indicaron que al comparar la expresión global de los genes de células sésiles contra la expresión global de células planctónicas ambas con tetrazol (grupo I), 486 genes presentan una diferencia significativa en sus niveles de ARNm (15,4% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, anexos 5 y 6). Esto indicó que 486 genes se expresan diferencialmente en células sésiles y podrían estar directa o indirectamente relacionados con la formación de biopelículas. De estos genes, 145 corresponden a proteínas hipotéticas, 156 sólo presentan un dominio putativo y 185 genes se encuentran descritos en la base de datos KEGG de acuerdo a la acción que desarrollan y participan en 67 sistemas metabólicos (Fig. 43, pág. 100).

Por otro lado, al comparar la expresión global de los genes de células planctónicas con y sin tetrazol (grupo II) se observaron 137 genes que poseen una diferencia significativa en sus niveles de ARNm en presencia de tetrazol (4,3% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, anexos 1 y 2). Esto indicó que 137 genes son regulados por el sistema QS en células planctónicas con tetrazol. De éstos genes, 58 corresponden a genes que codifican proteínas hipotéticas, 45 genes sólo presentan un dominio putativo y 34 tienen una función biológica descrita según la base de datos KEGG (Fig. 34, pág. 87). Finalmente, al comparar la expresión global de los genes de células sésiles con y sin tetrazol (grupo III) se identificaron solamente 10 genes que presentan una diferencia significativa en sus niveles de ARNm en presencia de tetrazol (0,3% del total de genes de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, anexos 3 y 4). De éstos, 4 genes codifican proteínas hipotéticas, 3 sólo presentan un dominio putativo y 3 genes poseen una función biológica descrita (Fig. 38, pág. 94).

Los resultados del grupo II y III sugieren que el tetrazol induce un cambio en los niveles de ARNm de algunos genes en células sésiles y planctónicas, provocando este cambio en un mayor número de genes en células planctónicas. Esto puede explicarse debido a que tetrazol induce el sistema QS y en células sésiles este sistema se encuentra ya estimulado. De acuerdo a esto, el tetrazol provocaría un cambio en los niveles de ARNm de

pocos genes en células sésiles, tal como se observa al analizar los resultados en células sésiles con y sin tetrazol.

### **Análisis de resultados de la transcripción global de los genes de células sésiles y planctónicas, ambas con tetrazol (grupo I)**

Los resultados obtenidos al comparar la expresión global de los genes de células sésiles y planctónicas, ambas con tetrazol (grupo I), indicaron que 486 genes presentan una diferencia significativa en sus niveles de ARNm en células sésiles. De estos genes, 185 se encuentran descritos de acuerdo a la acción que desarrollan según la clasificación KEGG. Gran parte de estos 185 genes participan en el metabolismo del carbono, la estructura ribosomal y conversión y producción de energía. De acuerdo a lo anterior, 33 genes participan en el metabolismo del carbono, de los cuales 17 se encuentran reprimidos (Anexo 6) y 16 sobre-expresados en células sésiles con tetrazol (Anexo 5). Los genes reprimidos inhiben el consumo de piruvato, la síntesis de serina, el consumo de ribulosa-5P y la síntesis de la coenzima M y B (Fig. 45, pág. 105), mientras que los genes sobre-expresados favorecen el consumo de formaldehído, la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato, síntesis de piruvato y síntesis de ribulosa-5P. Estos resultados sugieren que en las células sésiles con tetrazol se favorece la síntesis de ciertos carbohidratos como ribulosa-5P y fructosa-1,6-bisfosfato que son utilizados como sustratos para la síntesis de glucosa-1P.

En la estructura del ribosoma participan 28 genes que se encuentran reprimidos en las células sésiles, mientras que en la biogénesis ribosomal sólo hay un gen reprimido (Anexo 6). Estos resultados sugieren que la síntesis de proteínas podría estar siendo afectada en células sésiles con tetrazol, lo cual podría derivar en una tasa de crecimiento menor.

Los genes vinculados con la conversión y producción de energía son 26, de los cuales 23 se encuentran reprimidos y 3 sobre-expresados en células sésiles con tetrazol. Dentro de los genes reprimidos, la mayor parte de ellos participan en la conformación del complejo

multienzimático NADH deshidrogenasa (AFE\_2411 y AFE\_2618-2630) y en el complejo ATP sintasa (AFE\_3202-3209), mientras que el gen AFE\_3086 que participa en la salida de protones se encuentra sobre-expresado. Estos resultados sugieren que en células sésiles con tetrazol la transferencia de electrones a través del complejo NADH deshidrogenasa y la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa se encuentran inhibidas. Van Acker y col. (2013) demostraron mediante un análisis transcripcional un cambio considerable en la expresión de genes de células sésiles de *Burkholderia cenocepacia* J2315 tratadas con altas dosis de tobramicina, indicando particularmente que los genes (BCAL0030-0037) que codifican el complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintasa y los genes (BCAL2331-2343) que codifican el complejo NADH deshidrogenasa se encuentran reprimidos. La inhibición de NADH deshidrogenasa y la formación del complejo ATPasa podría evitar la formación de ROS y por lo tanto del estrés oxidativo.

Dentro de los 185 genes que presentan una función biológica descritos en el grupo I (comparación de la expresión global de genes de células sésiles y planctónicas ambas con tetrazol) existen 16 genes que se encuentran relacionados con la síntesis de glucosa-1P (Fig. 46, pág. 107). El 50% de estos genes están sobre-expresados en células sésiles con tetrazol, favoreciendo la síntesis de fructosa-6P, glucosa-6P y glucosa-1P principalmente. En cambio, el otro 50% está reprimido inhibiendo el consumo de los sustratos que participan en la vía de síntesis de la fructosa-6P, glucosa-6P y glucosa-1P.

Por otro lado, los genes *lpxC* (AFE\_0223, UDP-3-O-acil N-acetilglucosamina deacetilasa) y AFE\_2582 (proteína con dominio histidinol-fosfato fosfatasa) se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol, no favoreciendo la síntesis de lipopolisacáridos. Esto puede ocurrir porque el control de la expresión del gen *lpxC* es regulado por la actividad de una metaloproteasa codificada por el gen *ftsH* que es capaz de degradar las deacetilasas. Existen evidencias genéticas que demuestran que la actividad de esta proteasa sobre la degradación de deacetilasas es alterada cuando existen reservas de la proteína carrier acil acilada (acil-ACP) (Ogura y col., 1999). En nuestras condiciones experimentales, al agregar una concentración exagerada de la molécula tetrazol en los medios de cultivos, las

células tanto planctónicas como sésiles no requieren de la síntesis de AHL endógena, por lo que los sustratos SAM y acil-ACP (Fig. 4, pág. 18) necesarios para la síntesis de AHL podrían acumularse. Estas reservas, particularmente la de acil-ACP, pueden alterar la actividad proteasa de FtsH lo que provocaría una menor degradación de la proteína codificada por el gen *lpxC* y explicaría la represión de este gen en nuestros resultados (Sorensen y col., 2006). En relación al gen AFE\_2582, su represión puede no afectar significativamente en la síntesis de lipopolisacáridos debido a que la acción de la proteína que codifica este gen puede ser ejercida por otras proteínas que realizan su misma función (familia HPP) o que presentan un dominio semejante como es el caso del gen AFE\_0987, una proteína hipotética que presenta un dominio putativo histidinol-fosfato fosfatasa similar al del gen AFE\_2582. Otra razón que puede explicar la represión del gen AFE\_2582 podría estar relacionada con la síntesis de KDO-lípidoA la cual es posible por al menos dos vías; i) a partir de ribulosa-5P (Ghalambor y col., 1966) y ii) a partir de UDP-N-acetil-D-glucosamina. De acuerdo a nuestros resultados podemos concluir que la síntesis de KDO-lípidoA en células sésiles con tetrazol ocurre a partir de ribulosa-5P debido a que en la vía de la pentosa fosfato se observó que la síntesis de ésta molécula es favorecida (Fig. 46, pág. 107). Esta conclusión indicaría que la síntesis de KDO-lípidoA a partir de UDP-N-acetil-D-glucosamina se encontraría inhibida, lo cual se confirma con la represión del gen *lpxC*, favoreciendo la acumulación de glucosa-1P y UDP-glucosa para ser utilizadas como precursores de EPS. Según esta información y debido a que la síntesis de KDO-lípidoA es favorecida, se explica que el gen AFE\_2582 se encuentre reprimido en células sésiles con tetrazol, inhibiendo la acumulación del producto generado a partir de KDO-lípidoA (Fig. 46, pág. 107).

### **Análisis de resultados de la transcripción global de los genes de células planctónicas con y sin tetrazol (grupo II)**

Dentro de los resultados del grupo II (análisis de los niveles de ARNm de células planctónicas con y sin tetrazol) un gran porcentaje de los genes que presentan un cambio de

expresión significativa codifican proteínas hipotéticas (42%, Fig. 32, pág. 85). Este resultado se correlaciona con los observados en Wagner y col. (2003) donde mediante experimentos de microarreglos de ADN estudiaron la expresión global de genes regulados por el sistema QS en un doble mutante para *lasI* y *rhII* (PAO-JP2) en presencia y ausencia de moléculas de acil homoserina lactonas exógenas. Ellos identificaron que un 34% del total de genes analizados codifican proteínas hipotéticas.

Los 34 genes asociados a una función biológica descritos en el grupo II participan o se encuentran relacionados con 37 sistemas metabólicos (glicólisis, gluconeogénesis, metabolismo del carbono, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del almidón y la sacarosa, entre otros) encontrándose mayoritariamente reprimidos. De estos 34 genes, sólo 14 se encuentran relacionados con la biosíntesis de EPS y por ende con la formación de biopelículas (Fig. 35, pág. 89). La mayor parte de estos genes se encuentran reprimidos y están vinculados con el consumo de glucosa-1P, uno de los principales sustratos para la síntesis de los precursores de EPS (Barreto y col., 2005). Este resultado indica que la biosíntesis de los precursores de EPS (principalmente glucosa-1P) se encuentra favorecida con tetrazol en células planctónicas. De los 20 genes restantes que no están vinculados con la síntesis de precursores de EPS, el gen AFE\_3086 (proteína de la membrana plasmática de salida de protones tipo P ATPasa) utiliza la hidrólisis de ATP para transportar protones a través de la membrana, los genes *atpF* (AFE\_3207, ATP sintasa F0 subunidad B), *atpE* (AFE\_3208, ATP sintasa F0 subunidad C) y *atpB* (AFE\_3209, ATP sintasa F0 subunidad A) participan en la translocación de protones a través de la membrana. Estos tres últimos genes (*atpF*, *atpE* y *atpB*) se encuentran sobre-expresados (Anexo 1), favoreciendo el transporte de protones, mientras que el gen AFE\_3086 se encuentra reprimido (Anexo 2) inhibiendo la hidrólisis de ATP. Esto sugiere que en las células planctónicas con tetrazol la translocación de protones se encuentra favorecida generando una fuerza motriz que podría beneficiar el transporte de moléculas, como AHL, a través de la membrana citoplasmática (Ikonomidis y col., 2008; Varga y col., 2012). Los genes AFE\_0808 y AFE\_0809 (oxidoreductasas) y *ndk* (AFE\_1929, nucleósido difosfato quinasa) participan en el metabolismo de las purinas, donde el gen *ndk* se encuentra sobre-expresado y vinculado con la síntesis de nucleósidos

trifosfatos (NTPs). Los NTPs podrían ser requeridos en una etapa temprana de la biosíntesis de EPS en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> tal como ocurre en *Pseudomonas aeruginosa* donde el GTP es necesario para la incorporación de mannuronato en alginato (Kapatral y col., 2000). Otra posibilidad es que el UTP sea requerido para la síntesis de polisacáridos. Esto sugiere que el gen *ndk* podría favorecer la formación de biopelículas. Por otro lado, los genes *hynS* (AFE\_3283) y *hynL* (AFE\_3286) codifican la subunidad pequeña y grande respectivamente de la hidrogenasa de Ni/Fe y se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol (Anexo 2). Se ha descrito que la transcripción y niveles de hidrogenasas del tipo Hyp en células sésiles se encuentra disminuída (Clark y col., 2012). Esto nos sugiere que las células planctónicas con tetrazol presentan una coordinación transcripcional acorde al de una célula sésil, puesto que muestran una expresión reprimida en sus hidrogenasas del tipo Hyp. Los genes *pstS-1* (AFE\_1939, proteína de unión a sustrato transportador ABC fosfato) y *pstC-2* (AFE\_1940, transportador ABC fosfato permeasa) participan como transportadores ABC. Estos genes se encuentran sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol y participan en el transporte de grupos fosfatos (Anexo 1). Se ha descrito que el sistema de transporte de grupos fosfatos es de gran importancia en la formación de biopelículas y virulencia en *Proteus mirabilis* (O'May y col., 2009). Esta información apoya nuestra propuesta sobre las células planctónicas con tetrazol que presentan una coordinación transcripcional acorde al de una célula sésil, puesto que los genes que participan en el transporte de grupos fosfatos se encuentran sobre-expresados tal como ocurre en células sésiles. Por último, el gen *bioD-1* (AFE\_1675, detiobiotina sintetasa) se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol. Este gen se encuentra relacionado con la vía de síntesis de detiobiotina en la cual se consume la molécula de S-adenosil-L-metionina, un sustrato para la síntesis de AHL (Hanzelka y Greenberg, 1996). Este gen al encontrarse reprimido disminuye la síntesis de detiobiotina, y a su vez el consumo de S-adenosil-L-metionina, lo cual sugiere que se estaría favoreciendo la reserva de sustratos involucrados en la síntesis de AHL (Schaefer y col., 1996; Watson y col., 2002).

### **Análisis de resultados de la transcripción global de los genes de células sésiles con y sin tetrazol (grupo III)**

En los resultados obtenidos al comparar la expresión global de genes de células sésiles con y sin tetrazol (grupo III), podemos destacar que sólo 10 genes presentan un cambio en los niveles de ARNm con tetrazol. De estos 10 genes, se observó que los genes *afeI* (AFE\_1999, AHL sintasa) y *orf3* (AFE\_1998, proteína hipotética) que participan en el sistema QS están sobre-expresados en células sésiles con tetrazol (Anexo 4). Este resultado indica que *afeI* es inducido por tetrazol y apoya nuestra hipótesis sobre la regulación positiva del sistema QS mediante análogos sintéticos de AHL. Del resto de los genes, sólo 3 presentan una función biológica descrita según la base de datos KEGG, *gfa* (AFE\_0696, proteína activadora de formaldehído dependiente de glutatión), AFE\_0697 [S-(hidroximetil) glutatión deshidrogenasa] y *fghA* (AFE\_0698, S-formilglutatión hidrolasa) participan en el metabolismo del carbono y se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol (Anexo 3). Estos 3 genes participan en el consumo de formaldehído para la generación de formato, y se ha descrito que la molécula de formaldehído favorece la formación de biopelículas (Ong y col., 2006). Estos resultados sugieren que al encontrarse los genes *gfa*, AFE\_0697 y *fghA* reprimidos se estaría reprimiendo el consumo de formaldehído y por ende favoreciendo la formación de biopelículas en células sésiles con tetrazol.

### **Comparaciones entre los grupos I, II y III**

Para identificar los genes que se encuentran regulados por el sistema QS y que estarían participando en la formación de biopelículas, se compararon los resultados transcripcionales obtenidos en el grupo I (comparación de la expresión global de células sésiles y planctónicas, ambas con tetrazol) contra los resultados de los grupos II (comparación de la expresión global de células planctónicas con y sin tetrazol) y III (comparación de la expresión global de células sésiles con y sin tetrazol). De esta forma, se determinaron

aquellos genes que se expresan diferencialmente sólo en células sésiles y se encuentran relacionados con la formación de biopelículas (grupo I) y aquellos que responden al efecto provocado por la molécula de tetrazol y se encuentran regulados por el sistema QS (grupos II y III).

Al comparar los resultados transcripcionales de los grupos I (comparación de la expresión global de células sésiles y planctónicas, ambas con tetrazol) y II (comparación de la expresión global de células planctónicas con y sin tetrazol) se encontraron 104 genes que presentan el mismo patrón de expresión (sobre-expresados o reprimidos) en ambos grupos (Anexos 3, 5 y 6). Esta comparación reveló que estos 104 genes estarían participando en la formación de biopelículas y se encuentran regulados por el sistema QS. De estos 104 genes, 41 corresponden a proteínas hipotéticas, 33 sólo presentan un dominio putativo y 30 genes tienen una función biológica descrita en la base de datos KEGG (Fig. 49, Tabla 9 y 10, págs. 113-115). De los 30 genes descritos en la base de datos KEGG, el 70% de ellos participan en el metabolismo del almidón y la sacarosa, conversión y producción de energía, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo del carbono, glicólisis y gluconeogénesis. En el metabolismo del almidón y la sacarosa los genes AFE\_1799 (proteína de la familia alfa-glucano fosforilasa) y *glgB* (AFE\_2836, proteína de ramificación 1,4-alfa-glucano) inhiben la síntesis de ADP-glucosa (precursor de trehalosa), mientras que los genes AFE\_2081, AFE\_2082 (proteínas de la familia alfa-amilasa) y AFE\_2083 (glicosil transferasa) inhiben la síntesis de trehalosa a partir de ADP-glucosa y maltodextrina. La inhibición de la síntesis de ADP-glucosa por parte de la acción del gen AFE\_1799 involucra también la inhibición de la síntesis de glucosa-1P, lo cual no estaría favoreciendo la síntesis de precursores de EPS en células planctónicas con tetrazol (Fig. 50, pág. 119). En la conversión y producción de energía el gen AFE\_3086 se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol, mientras que los genes, *atpF*, *atpE* y *atpB* se encuentran sobre-expresados. Los cinco genes participan en la síntesis de ATP. En la biosíntesis de aminoácidos el gen *proB-1* (AFE\_2464, glutamato 5-quinasa) se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol inhibiendo el consumo de piruvato. En el metabolismo del carbono los genes AFE\_0155 (proteína de la familia fosfoglicerato mutasa), *pyk* (AFE\_1801, piruvato quinasa), AFE\_1802 (aldolasa), *gpml-1*

(AFE\_1815, fosfogliceromutasa), AFE\_1857 (glucosa-1 deshidrogenasa) y AFE\_2024 (6-fosfogluconato deshidrogenasa) se relacionan con el consumo de glucosa, mientras que los genes *gfa* (AFE\_0696) y AFE\_0697 participan en la conversión de formaldehído a formato y se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol. Por último, en la glicólisis y gluconeogenesis el gen AFE-2088 (proteína de unión a zinc de la familia alcohol deshidrogenasa) se encuentra reprimido en células planctónicas con tetrazol, mientras que el gen AFE\_2131 (aldehído deshidrogenasa de la familia NAD) se encuentra sobre-expresado. El gen AFE\_2131 participa en la conversión reversible de acetaldehído a acetato, mientras que el gen AFE\_2088 participa en la conversión reversible de etanol a acetaldehído. Esto indicaría que al estar el gen AFE\_2131 sobre-expresado se estaría favoreciendo la síntesis de piruvato en células planctónicas con tetrazol (Fig. 50, pág. 119).

Estos resultados sugieren que los genes que presentan cambios significativos en sus niveles de ARNm y que presentan un patrón de expresión similar en los grupos I y II se encuentran vinculados con el metabolismo de la glucosa-1P. Esto sugiere que la principal vía para la síntesis de EPS en células de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se encontraría relacionada con el metabolismo de glucosa-1P, puesto que en células planctónicas la mayor parte de los genes que contribuyen con el consumo de esta molécula se encuentran reprimidos, favoreciendo la biosíntesis de los precursores de EPS (Fig. 35, pág. 89). En cambio, en células sésiles estos mismos genes se encuentran sobre-expresados beneficiando la síntesis de glucosa-1P que es utilizada en la síntesis de piruvato (Fig. 44, pág. 104).

La comparación de los resultados transcripcionales de los grupos I (comparación de la expresión global de células sésiles y planctónicas, ambas con tetrazol) y III (comparación de la expresión global de células sésiles con y sin tetrazol) indicó que seis genes presentaron un cambio significativo en sus niveles de ARNm en ambos grupos. Sin embargo, sólo cuatro de ellos [AFE\_0707 y AFE\_0709 (codifican proteínas hipotéticas), AFE\_0710 (codifica una proteína de unión hierro-azufre) y *orf3*] exhibieron un patrón de expresión similar en los dos grupos, indicando que estos genes estarían regulados por el sistema QS y estarían participando en la formación de biopelículas (Tabla 11, pág. 121). Los dos genes (*gfa* y

AFE\_0697) que no presentan un patrón de expresión similar en ambos grupos participan en el consumo de formaldehído para la síntesis de formato (Goenrich y col., 2002). Se ha descrito que el gen *gfa* se induce bajo condiciones de estrés de formaldehído y que su actividad se basa principalmente en su regulación transcripcional (Gutheil y col., 1997). Por otro lado, se ha demostrado que concentraciones altas de formaldehído favorecen la formación de biopelículas, mientras que concentraciones superiores a 202.2 mg/L inhiben la producción de biomasa y generan el deterioro de la morfología de la biopelícula (Ong y col., 2006). Sin embargo, se ha descrito un sistema de desintoxicación de formaldehído en *Neisseria meningitidis* que favorece la formación de biopelículas (Chen y col., 2013). Esta información y nuestros resultados sugieren que el gen *gfa* podría estar regulado por un sistema de represión del sistema QS, pues posiblemente se encuentra reprimido en células sésiles con tetrazol en el grupo III porque el tetrazol provocaría una disminución de sus niveles de ARNm que sólo es posible observar cuando se comparan los niveles de ARNm entre células sésiles (Tabla 11, pág. 121). Este mismo efecto provocado por tetrazol es posible observarlo en el grupo II (Anexo 2).

La comparación de los resultados transcripcionales de los grupos II (comparación de la expresión global de células planctónicas con y sin tetrazol) y III (comparación de la expresión global de células sésiles con y sin tetrazol) indicó que sólo dos genes presentaron un patrón de expresión similar, el gen AFE\_0030 (codifica una proteína hipotética) y *gfa*. Ambos genes se encuentran reprimidos en presencia de tetrazol en ambos grupos. Esto apoya nuestra teoría sobre la disminución de los niveles de ARNm de *gfa* generada por tetrazol. Por último, al comparar los resultados transcripcionales de los tres grupos (I, II y III), sólo el gen *gfa* presenta cambios significativos en sus niveles de ARNm.

En resumen, y de acuerdo a lo observado en los resultados transcripcionales de los grupos II y III, concluimos que 145 genes conforman el regulón QS (136 genes del grupo II y 9 genes del grupo III), mientras que al realizar las diferentes comparaciones entre los resultados transcripcionales de los grupos I, II y III 108 genes presentaron cambios significativos en sus niveles de ARNm y un patrón de expresión semejante en al menos dos

grupos. En otras palabras, nuestras condiciones experimentales permitieron identificar 108 genes pertenecen al regulón QS y estarían participando en la formación de biopelículas puesto que exhibieron una transcripción análoga frente a dos condiciones donde el sistema QS se encuentra estimulado y tienen una expresión transcripcional diferencial entre células sésiles y planctónicas.

De acuerdo a nuestras conclusiones, sería interesante poder realizar estos experimentos de microarreglos de ADN en un sistema dónde la síntesis de AHL endógena se encuentre reprimida, como un mutante nulo para el gen *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>. De esta forma, se podrían corroborar los resultados obtenidos en este trabajo de investigación y sería posible revertir la carencia de AHL del mutante nulo al utilizar análogos sintéticos de AHLs, tal como se realizó en este estudio.

**Construcción de un mutante *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.** Para determinar la contribución del sistema QS en la regulación de la transcripción de genes en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> se contempló la construcción de un mutante nulo para el gen *afeI* que codifica AfeI, una AHL sintasa (Farah y col., 2005). Para la obtención del mutante *afeI* se construyó mediante ingeniería genética el vector suicida pSM1a que es capaz de interrumpir el gen silvestre *afeI* mediante una recombinación homóloga con el gen trunco *afeI* (253 pb) que posee (Fig. 13, pág. 52). Los resultados de los experimentos de conjugación con este vector suicida fueron negativos. Esto puede explicarse debido a que el tamaño del gen trunco *afeI* (253 pb) utilizado es muy pequeño e insuficiente para lograr una recombinación homóloga que sea capaz de insertar el vector pSM1a completo en el genoma de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>.

De acuerdo a los resultados negativos anteriormente descritos, se realizó la construcción de un segundo vector suicida, el vector pSM1b (Fig 16, pág. 55), el cual contiene dos regiones que corresponden a los fragmentos N y C-terminal del gen *afeI* que son el doble del tamaño del gen trunco *afeI* utilizado en el vector pSM1a. Aunque los

ensayos de conjugación realizados con el vector pSM1b permitieron la obtención de microcolonias resistentes a kanamicina (Tabla 12, pág. 136).

Para determinar el motivo por el cual no se obtuvieron resultados positivos, se realizó una comparación entre las técnicas que utilizamos en nuestros experimentos y las técnicas utilizadas para la obtención del mutante *tetH* de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> descritas por Yu y col. (2014). Al realizar esta comparación se observaron al menos cuatro diferencias: i) el tamaño del fragmento homólogo al gen *afeI* utilizado en nuestros estudios es mucho menor que los fragmentos homólogos utilizados en la obtención del mutante *tetH*, ii) la cepa dadora, aunque es la misma utilizada (S17 de *E. coli*) en ambos estudios, fue crecida en medio LB (pH 7,0) y no fue adaptada al medio de cultivo DOP a un pH más ácido (pH 4,5 o 5,2) como en nuestros estudios, iii) el tiempo de conjugación es mayor (5 a 7 días) en los experimentos descritos por Yu y col. (2014) que los utilizados por nosotros (3 a 5 días), y iv) la selección de los clones positivos resistentes a kanamicina fueron recuperados en 10 ml de medio líquido Fe<sup>2+</sup> sin antibiótico y luego fueron cultivados en medio 9K con azufre y kanamicina. En cambio, en nuestros estudios la selección de los clones resistentes a kanamicina fueron plaqueados nuevamente en placas de agar DOP con y sin kanamicina o cultivados en 10 ml de medio 9K con perlas de azufre con el mismo antibiotico.

De las cuatro diferencias antes descritas, las dos primeras pueden ser las principales causas por las cuales se obtuvieron resultados negativos en la construcción del mutante *afeI*. La construcción del mutante *afeI* podría ser más eficiente al inducir una doble recombinación homóloga y utilizar fragmentos homólogos más largos debido a que proporcionarían muchas más oportunidades para generar un evento de recombinación (Maloy y col., 1994). Por otra parte, al adaptar la cepa dadora de *E. coli* a un medio más ácido (pH 4,5 o 5,2) que su pH óptimo (pH 7,0) puede haber provocado una leve acidificación intracelular, lo cual puede haber dañado o interrumpido procesos bioquímicos (Garlant-Miller y Kaspar, 1994; Chung y col., 2006) que afecten su capacidad de transferir el vector suicida hacia la cepa dadora. Otra posibilidad, es que el mutante *afeI* en

*At. ferrooxidans*<sup>T</sup> no sea viable, aunque la obtención de mutantes nulos del gen I ha sido descrita en otras bacterias Gram-negativas (Wagner y col., 2003; Whiteley y col., 1999).

De acuerdo a lo anterior, sería de gran interés realizar la construcción de un mutante *afeI* en *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> utilizando la técnica de mutagénesis basada en la endonucleasa I-SecI tal como descrito Wang y col. (2012). De esta forma, se podrían realizar estudios transcriptómicos del mutante en presencia y ausencia de análogos sintéticos de AHL.

**Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA).** Para la obtención y purificación del regulador transcripcional AfeR se utilizó OH-C14-AHL (5  $\mu$ M) para favorecer la estabilidad y la conformación activa del dímero de AfeR como un complejo AfeR-AHL, el cual es necesario para unirse a la secuencia de ADN palindrómica. Zhu y Winans (1999) en sus ensayos de EMSA analizaron la estabilidad de TraR de *Agrobacterium tumefaciens* en presencia y ausencia de AHL, demostrando que la presencia de este autoinductor aumenta la estabilidad y abundancia de TraR.

Los ensayos de EMSA fueron realizados con el objetivo de identificar la secuencia de ADN palindrómica donde AfeR, en su forma dimerizada, es capaz de unirse (Fig. 3, pág. 16). Los resultados obtenidos en los ensayos de EMSA revelaron que el complejo AfeR-AHL es capaz de unirse a una secuencia de ADN de 360 pb que contiene la secuencia de las cajas *afe* predichas (ver Fig. 8 y 65, págs. 33 y 141) y descritas por Farah y col., (2005) (Fig. 66, pág. 142). Por otra parte, mediante ensayos de EMSA con esta secuencia de ADN de 360 pb se identificó la concentración mínima (1,3  $\mu$ M) del complejo AfeR-AHL necesaria para observar el retardo de su migración con nuestras condiciones experimentales (Fig. 66, pág. 142). Además, se verificó la especificidad de unión de AfeR-AHL con la misma secuencia de ADN (Fig. 67, pág. 142). Estos resultados son similares a los observados por Qin y col. (2007) en *Vibrio fischeri* donde el complejo LuxR-AHL se une a la secuencia de las cajas *lux*. Sin embargo, cabe señalar que las concentraciones de LuxR-AHL utilizadas en los ensayos de EMSA son menores (nM) que las utilizadas en nuestros experimentos ( $\mu$ M). Esto puede explicarse por la estabilidad del complejo LuxR-AHL, la cual puede ser mayor

que la del complejo AfeR-AHL. La diferencia en la estabilidad de ambos complejos puede deberse a la utilización de distintas moléculas de AHL, puesto que para la obtención del complejo LuxR-AHL se utilizó oxo-C6-AHL y para el complejo AfeR-AHL se utilizó OH-C14-AHL. El tipo de AHL utilizado puede afectar la tasa de disociación entre el autoinductor y el regulador transcripcional. Zhu y Winans (1999) mediante ensayos de diálisis prolongada demostraron que la estabilidad del complejo TraR-AHL (tiempo de disociación en días) en *Agrobacterium tumefaciens* es muy superior a la del complejo LuxR-AHL (tiempo de disociación en segundos) en *V. fischeri* de acuerdo a lo descrito por Kaplan y Greenberg (1985).

Una vez identificada la secuencia de ADN donde el complejo AfeR-AHL es capaz de unirse, se realizó un análisis “*in silico*” mediante alineamientos realizados con ClustalW (Thompson y col., 1994) para verificar la presencia de las cajas *afe* en la región promotora de los 145 genes que conforman el regulón QS de acuerdo a los resultados obtenidos en los microarreglos de ADN (Anexos 1, 2, 3 y 4). Los análisis indicaron que ninguno de los 145 genes contenía en su región promotora la secuencia de las cajas *afe* predichas. Sin embargo, al menos seis genes [AFE\_0572, AFE\_0707, AFE\_1418, AFE\_1853, *orf3* (codifican proteínas hipotéticas) y AFE\_2209 (regulador transcripcional de la familia TetR)] presentaron en su región promotora una secuencia palindrómica correspondiente a una de las cajas *afe* (Anexo 8). Por otra parte, se compararon estos resultados (regulón QS, 145 genes) con los descritos por Banderas y Guiliani (2013) quienes realizaron una predicción bioinformática de aquellos genes que presentan las cajas *afe* y por lo tanto cuya expresión debería ser regulada por AfeR y por ende por el sistema QS. Sus análisis se basaron en la búsqueda e identificación de posibles sitios de unión de AfeR que presenten una similitud con la secuencia palindrómica de ADN identificada río arriba del gen *afeI* (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). La comparación de los resultados reveló que sólo dos genes [AFE\_0582 y *orf3* (AFE\_1998), ambos codifican proteínas hipotéticas] contienen un sitio de unión para AfeR (análisis bioinformático) y se encuentran regulados por QS (análisis transcriptómico). Esto sugiere que posiblemente AfeR regula la actividad de otros reguladores transcripcionales que actúan sobre la expresión de los 142 genes restantes que

conforman el regulón QS. Esta idea es apoyada por los resultados descritos por Schuster y col. (2004) que demostraron que la expresión del gen PA1897 es activada cuando el regulador transcripcional LasR se encuentra sobre-expresado. Sin embargo, estudios “*in vitro*” indicaron que LasR no es capaz de unirse a la región promotora del gen PA1897, concluyendo mediante otros análisis que el regulador transcripcional QscR activa directamente la expresión del gen PA1897 y se encuentra regulado por LasR.

## 6. CONCLUSIONES

- Los resultados de adherencia en cultivos de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> indican que OH-C14-AHL y tetrazol aceleran la respuesta de adherencia de las células bacterianas sobre el sustrato mineral en comparación con cultivos sin estos análogos sintéticos. Estas dos moléculas de AHLs al estimular la adherencia, también estimulan la síntesis de EPS y por ende la formación de biopelículas.
- Los análisis transcriptómicos de células sésiles y planctónicas de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol permitieron identificar 145 genes que conformarían el regulón QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup>, lo cual representa el 4,6% del genoma de esta bacteria.
- Dentro del regulón QS de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> existen 108 genes que se encuentran relacionados con la formación de biopelículas y de ellos 14 genes participan en la síntesis y consumo de precursores de EPS.
- Los ensayos de EMSA permitieron identificar una secuencia de ADN de 360 pb, que contiene las cajas *afe* predichas, donde el complejo AfeR-AHL es capaz de unirse.

## Bibliografía

- Acuña J., Rojas J., Amaro A.M., Toledo H. and Jerez C.A. **1992**. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: comparison with the *Escherichia coli* chemosensory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **75**: 37-42.
- Aiba H., Adhya S., de Crombrughe. **1981**. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *B. J. Biol. Chem.* **256**; 11905–11910.
- Amaro A.M., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I. and Jerez C.A. **1991**. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:910-5.
- Aparna M. and Yadav S. **2008**. Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.* **12**, 526-530. doi: 10.1590/S1413-86702008000600016.
- Appia-Ayme C., Quatrini R., Denis Y., Denizot F., Silver S., Roberto F., Veloso F., Valdes J., Cárdenas J.P., Esparza M., Orellana O., Jedlicki E., Bonnefoy V. and Holmes D.S. **2006**. Microarrays and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* **83**: 273-280.
- Appia-Ayme C., Guiliani N., Ratouchniak J. and Bonnefoy V. **1999**. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa(3)*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(11): 4781-4787.
- Arkesteyn G.J.M.W. **1979**. Pyrite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* with special reference to the sulphur moiety of the mineral. *Antonie van Leeuwenhoek* **45**(3): 423-435.
- Asahi Y., Noiri Y., Igarashi J., Asai H., Suga H. and Ebisu S. **2010**. Effects of N-acyl homoserine lactone analogues on *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation. *J. Periodontal Res.* **45**(2): 255-261.
- Atkinson S., Throup J.P., Stewart G.S. and Williams P. **1999**. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol. Microbiol.* **33**: 1267-1277.
- Auger S., Krin E., Aymerich S. and Gohar M. **2006**. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 937-941.
- Baker B.J. and Banfield J.F. **2003**. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology.* **44**; 139-152.
- Banderas A. and Guiliani N. **2013**. Bioinformatic prediction of gene functions regulated by Quorum Sensing in the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int.J. Mol. Sci.* **14**: 16901-16916.

- Barreto M., Jedlicki E. and Holmes D.S. **2005**. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. And Environ. Microbiol.* **71**(6): 2902-2909.
- Baumler D.J., Jeong K.C., Fox B.G., Banfield J.F. and Kaspar C.W. **2005**. Sulfate requirement for heterotrophic growth of “*Ferroplasma acidarmanus*” strain fer1. *Res Microbiol* **156**: 492-498.
- Beck von Bodman S. and Farrand S.K. **1995**. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **177**:5000-5008.
- Blunt B.J., Frew S.E. and McNally B. **1997**. Cell-cell communication and the lux operon in *Vibrio fischeri*. Department of biological sciences, Carnegie Mellon University, n.d. Web.
- Borlee B.R., Geske G.D, Blackwell H.E and Handelsman J. **2010**. Identification of synthetic inducer and inhibitors of the quorum-sensing regulator LasR in *Pseudomonas aeruginosa* by high-throughput screening. *App. Env. Microbiology* **76**(24): 8255-8258.
- Breed A.W., Dempers C.J., Searby G.E., Gardner M.N., Rawlings D.E. and Hansford G.S. **1999**. The effect of temperature on the continuous ferrous-iron oxidation kinetics of a predominantly *Leptospirillum ferrooxidans* culture. *Biotechnol. Bioeng* **65**(1): 44-53.
- Brierley C.L. **1984**. Microbiological mining: Technology status and commercial opportunities. *World Biotech. Rep.***1**: 599-609.
- Brock T.D., Brock K.M., Belly R.T. and Weiss R.L. **1972**. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.* **84**(1): 54-68.
- Bruscella P., Appia-Ayme C., Levican G., Ratouchniak J., Jedlicki E., Holmes D.S. and Bonnefoy V. **2007**. Differential expression of two *bcl* complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology* **153**(Pt1): 102-110.
- Bryant R.D., McGroarty K.M., Costerton J.W. and Laishley E.J. **1983**. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Canadian Journal of Microbiol.* **29**(9): 1159-1170.
- Bustin S.A. **2000**. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
- Byers J., Lucas C., Salmond G. and Welch M. **2002**. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J. Bacteriol.* **184**: 1163-1171.
- Callahan S.M. and Dunlap P.V. **2000**. LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **182**:2811-22.
- Castang S., Chantegrel B., Deshayes C., Dolmazon R., Gouet P., Haser R., Reverchon S., Nasser W., Hugouvieux-Cotte-Pattat N. and Doutheau A. **2004**. N-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**:5145-9.

- Castro M. **2013**. Caracterización de la vía del c-di-GMP y de su relación con los fenotipos de adherencia y motilidad en la bacteria biominera *Acidithiobacillus caldus* el desafío de construir el mutante nulo  $\Delta$ ACA 1413. Tesis Doctor en Ciencias. Santiago-Chile. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Chakraborty R. and Roy P. **1992**. Chemotaxis of chemolithotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* toward thiosulfate. *FEMS. Microbiology Letters* **98**(1-3): 9-12.
- Chan Y.Y., Bian H.S., Chin Tan T.M., Mattmann M.E., Geske G.D., Igarashi J., Hatano T., Suga H., Blackwell H.E. and Chua K.L. **2007**. Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **189**: 4320-4324.
- Chen N.H., Couñago R.M., Djoko K.Y., Jennings M.P., Apicella M.A., Kobe B. and McEwan A.G. **2013**. A glutathione-dependent detoxification system is required for formaldehyde resistance and optimal survival of *Neisseria meningitidis* in biofilms. *Antioxid. Redox Signal.* **18**(7): 743-755.
- Chen H., Teplitski M., Robinson J.B., Rolfe B.G. and Bauer W.D. **2003**. Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J. Bacteriol.* **185**: 5029-36.
- Christensen A.B., Riedel K., Eberl L., Flodgaard L.R., Molin S., Gram L. and Givskov M. **2003**. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology* **149**(Pt 2): 471-83.
- Chung H.J., Bang W. and Drake M.A. **2006**. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. **5**: 52-64.
- Clark D.A. and Norris P.R. **1996**. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*. **142**: 785-790.
- Clark M.E., He Z., Redding A.M., joachimiak M.P., Zhou J.Z., Arkin A.P., Mukhopadhyay A. and Fields M.W. **2012**. Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. *BMC Genomics* **13**:138 doi: 10.1186/1471-2164-13-138.
- Coram N.J. and Rawlings D.E. **2002**. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(2): 838-845.
- Costerton J.W., Stewart P.S. and Greenberg E.P. **1999**. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**(5418): 1318-1322.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. and Lappin-Scott H.M. **1995**. Microbial biofilms. *Annu Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- Cramton S. and Gotz F. **2004**. Biofilm development in *Staphylococcus*. In *Microbial Biofilms*, ed. M. Ghannoum and G.A. O'Toole (Washington, DC: ASM, 2004): 64-84.

- Croxatto A., Chalker V.J., Lauritz J., Jass J., Hardman A., Williams P., Camara M. and Milton D.L. **2002**. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **184**: 1617-1629.
- Daines D.A., Bothwell M., Furrer J., Unrath W., nelson K., Jarisch J., Melrose N., Greiner L., Apicella M. and Smith A.L. **2005**. *Haemophilus influenzae luxS* mutants form a biofilm and have increased virulence. *Microb. Pathog.* **39**: 87-96.
- Darland G., Brock T.D., Samsonoff W. and Conti S.F. **1970**. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* **170**(3965): 1416-1418.
- Davey M.E. and O'Toole G.A. **2000**. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847-867.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W. and Greenberg E.P. **1998**. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. **280**: 295-8.
- de Kievit T.R. and Iglewski B.H. **2000**. Bacterial Quorum Sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* **68**(9): 4839-4849.
- de Kievit T.R. and Iglewski B.H. **1999**. Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms. *Methods. Enzymol.* **310**:117-28.
- DeLisa M.P., Wu C.F., Wang L., Valdes J.J. and Bentley W.E. **2001**. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **183**: 5239-5247.
- des Essarts Y.R., Sabbah M., Comte A., Soullère L., Queneau Y., Dessaux Y., Hélias V. and Faure D. **2013**. *N,N'*-alkylated imidazolium-derivatives act as quorum-sensing inhibitors targeting the *Pectobacterium atrosepticum*-induced symptoms on potato tubers. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 19976-19986.
- Dermic D. **2006**. Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in *recD* mutants of *Escherichia coli*. *Genetics* **172**(4): 2057-69.
- Deziel E., Comeau Y., Villemur R. **2001**. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacteriol.* **183**: 1195-1204.
- Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M. and Williams P. **2003**. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates Rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**: 29-43.
- Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z. and Zhang L.H. **2000**. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3526-3531.

- Dopson M., Baker-Austin C., Hind A., Bowman J.P. and Bond P.L. **2004**. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* **70**(4): 2079-2088.
- Drobner E., Huber H. and Stetter K.O. **1990**. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(9): 2922-2923.
- Dudley EG, Thomson NR, Parkhill J, Morin NP, Nataro JP. **2006**. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **61**(5):1267-82.
- Dufresne S., Bousquet J., Boissinot M. and Guay R. **1996**. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J Syst Bacteriol* **46**(4): 1056-1064.
- Duquesne K., Lebrun S., Casiot C., Bruneel O., Personné J.C., Leblanc M., Elbaz-Poulichet F., Morin G. and Bonnefoy V. **2003**. Immobilization of arsenite and ferric iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6165-6173.
- Eberhard A, Burlingame A.L, Eberhard C, Kenyon G.L, Nealson K.H. and Oppenheimer N.J. **1981**. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-2449.
- Engerbrecht J. and Silverman M. **1984**. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**:4154-4158.
- Espejo R.T. and Romero J. **1997**. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1344-48.
- Estephane J., Dauvergne Estephane J., Dauvergne J., Soulère L., Reverchon S., Queneau Y., Doutheau A. **2008**. N-Acyl-3-amino-5H-furanone derivatives as new inhibitors of LuxR-dependent quorum sensing: Synthesis, biological evaluation and binding mode study. *Bioorg Med Chem Lett.* **18**(15): 4321-4.
- Falagan C. and Johnson D.B. **2015**. *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov.: a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolising extreme acidophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijsem.0.000698
- Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez C.A. and Guiliani N. **2005**. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7033-40.
- Farah C. **2006**. Caracterización del quorum sensing tipo AI-1 en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Memoria de título Ingeniero en Biotecnología Molecular. Escuela de Pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Fellay R, Frey J. and Krisch H. **1987**. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147-54.
- Flemming H.C. and Wingender J. **2010**. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623-633.
- Frederix M. and Downie J.A. **2011**. Quorum sensing: regulating the regulators. *Adv. In Microbial Physiology* **58**: 24-80.
- Frezza M., Soulère L., Reverchon S., Guiliani N., Jerez C., Queneau Y. and Doutheau A. **2008**. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorg Med Chem.* **16**(7): 3550-6.
- Frezza M., Castang S., Estephane J., Soulère L., Deshayes C., Chantegrel B., Nasser W., Queneau Y., Reverchon S. and Doutheau A. **2006**. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* **14**:4781-91.
- Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S. and Stetter K.O. **1995**. *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic *Archaeum*, isolated from a uranium mine in Germany. *Systematic and Applied Microbiology* **18**(4): 560-566.
- Fuqua W. C., Winans S. C. and Greenberg E. P. **1994**. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **176**:269-75.
- Gambello M.J. and Iglewski B.H. **1991**. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol.* **173**(9): 3000-3009.
- Gautier V., Escobar B. and Vargas T. **2008**. Cooperative action of attached and planktonic cells during bioleaching of chalcopyrite with *Sulfolobus metallicus* at 70 degrees C. *Hydrometallurgy* **94**(1-4): 121-126.
- Garlant-Miller L. and Kaspar C. W. **1994**. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection.* **57**: 460-464.
- Gehrke T., Hallmann R., Kinzler K. and Sand W. **2001**. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water. Sci. Technol.* **43**: 159-167.
- Gehrke T., Telegdi J., Thierry D. and Sand W. **1998**. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2743-47.
- Geske G.D., Mattmann M.E. and Blackwell H.E. **2008**. Evaluation of a focused library of N-aryl L-homoserine lactones reveals a new set of potent quorum sensing modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 5978-81.
- Geske G.D., O'Neill J.C. and Blackwell H.E. **2007**. N-phenylacetanoyl-L-homoserine lactones can strongly antagonize or superagonize quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *ACS Chem. Biol.* **2**: 315-9.
- Ghannoum M. and O'Toole G. **2004**. *Microbial Biofilm*. ASM press, Washington, DC.

- Ghalambor M.A., Levine E.M. and Heath E.C. **1966**. The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **241**: 3207-3215.
- Gilson L., Kuo A. and Dunlap P.V. **1995**. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* **177**: 6946-6951.
- Goenrich M., Bartoschek S., Hagemeyer C.H., Griesinger C. and Vorholt J.A. **2002**. A glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme (Gfa) from *Paracoccus denitrificans* detected and purified via two-dimensional proton exchange NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **277**: 3069-3072.
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrat'eva T.F., Moore E.R.B., Abraham W.-R., Lunsdorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M. and Golyshin P.N. **2000**. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the Ferroplasmaceae fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**: 997-1006
- González A., Bellenberg S., Mamani S., Ruiz L., Echeverría A., Soulère L., Doutheau A., Demergasso C., Sand W., Queneau Y., Vera M. and Guilian N. **2013**. AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-012-4229-3.
- González A. **2010**. Estudio del papel del sistema quorum sensing tipo AI-1 en la biolixiviación de cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans* y otras bacterias del consorcio biominero. Tesis Doctor en Biotecnología. Santiago-Chile. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.
- Gonzalez-Toril E., Llobet-Brossa E., Casamayor E.O., Armann R. and Amils R. **2003**. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto river. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(8): 4853-4865.
- Gray K.M. and Garey J.R. **2001**. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**: 2379-2387.
- Grogan D.W. **1989**. Phenotypic characterization of the archaebacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol.* **171**(12): 6710-6719.
- Guilian N., Bengrine A., Borne F., Chippaux M. and Bonnefoy V. **1997**. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidiphilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **143**, 2179-87.
- Gutheil W.G., Kasimoglu E. and Nicholson P.C. **1997**. Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia coli* and *Haemophilus influenza*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**(3): 693-6.
- Hallberg K.B., Hedrich S. and Johnson D.B. **2011**. *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron-and sulfur-oxidizer of the family Ectothiorhodospiraceae. *Extremophiles* **15**(2): 271-279.

- Hallberg K.B., González-Toril E. and Johnson D.B. **2010**. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* **14**: 9-19.
- Hallberg K.B. and Lindstrom E.B. **1994**. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* **140**: 3451-3456.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W. and Stoodley P. **2004**. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**(2): 95-108.
- Hanzelka B.L., Parsek M.R., Val D.L., Dunlap P.V., Cronan J.E.Jr. and Greenberg E.P. **1999**. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181**: 5766-5770.
- Hanzelka B.L. and Greenberg E.P. **1996**. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* **178**(17): 5291-5294.
- Hanzelka B.L. and Greenberg E.P. **1995**. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. Bacteriol.* **177**: 815-817.
- Harneit K., Mangold S., Telegdi J. and Sand W. **2006a**. Biofilm formation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on sulfide minerals visualized by AFM and fluorescence microscopy. 5<sup>th</sup> Int. Workshop – Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Berlin.
- Harneit K., Göksel A., Kock D., Klock J., Gehrke T. and Sand W. **2006b**. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **83**: 245-254.
- Hedrich S. and Johnson B.D. **2013**. Aerobic and anaerobic oxidation of hydrogen by acidophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **349**(1): 40-45.
- Heinhorst S., Baker S.H., Johnson D.R., Davies P.S., Cannon G.C. and Shively J.M. **2002**. Two copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Curr. Microbiol.* **45**(2): 115-117.
- Hentzer M., Wu H., Andersen J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bagge N., Kumar N., Schembri M.A., Song Z., Kristoffersen P., Manefield M., Costerton J.W., Molin S., Eberl L., Steinberg P., Kjelleberg S., Høiby N. and Givskov M. **2003**. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO. J.* **22**: 3803-15.
- Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T.B., Heydorn A., Andersen J.B., Parsek M.R., Rice S.A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S. and Givskov M. **2002**. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* **148**: 102-87.
- Hiraishi A., Nagashima K.V., Matsuura K., Shimada K., Takaichi S., Wakao N. and Katayama Y. **1998**. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic

- bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 1389-1398.
- Hippe H. **2000**. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992). *Int J Syst Evol. Microbiol.* **50**: 501-503.
- Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S. and Eberl L. **2001**. The *cep* quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**: 2517-2528.
- Huber G. and Stetter K.O. **1991**. *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *Systematic and Applied Microbiology* **14**(4): 372-378.
- Huber H. and Stetter K.O. **1989**. *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Archives of Microbiology* **151**(6): 479-485.
- Huber G., Spinnler C., Gambacorta A. and Stetter K.O. **1989**. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **12**(1): 38-47.
- Ikonomidis A., Tsakris A., Kanellopoulou M., Maniatis A.N. and Pournaras S. **2008**. Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**(4): 298-302.
- Jiang C.Y., Liu Y., Liu Y.Y., You X.Y., Guo X. and Liu S.J. **2008**. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**(Pt 12): 2898-2903.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., Hedrich S. **2014**. Uncovering a microbial enigma: isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing acidophilic bacterium, "*Ferrovum myxofaciens*". *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 672-680.
- Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A. and Hallberg K.B. **2009**. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59**: 1082-1089.
- Johnson M.R., Montero C.I., Connors S.B., Shockley K.R., Bridger S.L. and Kelly R.M. **2005**. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritime*. *Mol. Microbiol.* **55**: 664-674.
- Kapatral V., Bina X. and Chakrabarty A.M. **2000**. Succinyl coenzyme A synthetase of *Pseudomonas aeruginosa* with a broad specificity for nucleoside triphosphate (NTP) synthesis modulates specificity for NTP synthesis by the 12-kilodalton form of nucleoside diphosphate kinase. *J. Bacteriol.* **182**(5): 1333-9.

- Kaplan H.B and Greenberg E.P. **1985**. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**: 1210-1214.
- Karatan E. and Watnick P. **2009**. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Reviews.* **73**: 310-347.
- Karavajko G.I., Bulygina E.S., Tsaplina I.A., Bogdanova T.I. and Chumakov K.M. **1990**. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: a new lineage of bacterial evolution? *FEBS Lett.* **261**(1): 8-10.
- Kelly D.P. and Wood A.P. **2000**. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J. Syst Evol. Microbiol.* **50**: 511–16.
- Kishimoto N., Kosako Y. and Tano T. **1991**. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Current Microbiology* **22**: 1–7.
- Koseoglu-Imer D.Y. and Keskinler B. **2013**. Immobilization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on sulfonated microporous poly(styrene-divinylbenzene) copolymer with granulated activated carbon and its use in bio-oxidation of ferrous iron. *Materials Science and Engineering* **33**(1): 53-58.
- Kotze A.A., Tuffin I.M., Deane S.M. and Rawlings D.E. **2006**. Cloning and characterization of the chromosomal arsenic resistance genes from *Acidithiobacillus caldus* and enhanced arsenic resistance on conjugal transfer of ars genes located on transposon TnAtcArs. *Microbiol.* **152**: 3551-60.
- Koutsoudis M.D., Tsaltas D., Minogue T.D. and von Bodman S.B. **2006**. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 5983-5988.
- Kusel K., Dorsch T., Acker G. and Stackerbrandt E. **1999**. Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilum cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3633-3640.
- Labbate M., Queck S.Y., Koh K.S., Rice S.A., Givskov M. and Kjelleberg S. **2004**. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **186**:692-698.
- Lang J. and Faure D. **2014**. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant. Sci.* **5**: 14 doi: 10.3389/fpls.2014.00014.
- Latifi A., Winson M.K., Foglino M., Bycroft B.W., Stewart G.S., Lazdunski A. and Williams P. **1995**. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **17**(2): 333-343.
- Laue B.E., Jiang Y., Chhabra S.R., Jacob S., Stewart G., Hardman A., Downie J.A., O’Gara F. and Williams P. **2000**. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146**: 2469-2480.

- Lear G. and Lewis G.D. **2012**. Microbial biofilms: *Current Research and Applications*. Cap. 1, págs: 2-11.
- Leathen W.W. and Braley S.A. **1954**. A new iron-oxidizing bacterium: *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Bacteriol Proc.* **1954**: 44.
- Li J., Attila C., Wang L., Wood T.K., Valdes J.J. and Bentley W.E. **2007**. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on sRNA and biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **189**: 6011-6020.
- Li Y.Q., Wan D.S., Huang S.S., Leng F.F., Tan L., Ni Y.Q. and Li H.Y. **2010**. Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence. *Curr. Microbiol.* **60**: 17-24.
- Liu Z., Borne F., Ratouchniak J. and Bonnefoy V. **2001**. Genetic transfer of IncP, IncQ and IncW plasmids to four *Thiobacillus ferrooxidans* strains by conjugation. *Hydrometallurgy.* **59**; 339-45.
- Liu Z., Guiliani N., Appia-Ayme C., Borne F., Ratouchniak J. and Bonnefoy V. **2000**. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 2269-76.
- Loo C.Y., Corliss D.A. and Ganeshkumar N. **2000**. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* **182**: 1374-1382.
- Lopez D., Vlamakis H. and Kolter R. **2009**. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 152-163.
- Lynch M.J., Swift S., Kirke D.F., Keevil C.W., Dodd C.E.R. and Williams P. **2002**. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* **4**: 18-28.
- Mackintosh M. **1977**. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* **105**: 215-218.
- Majerczyk C., Brittnacher M., Jacobs M., Armour C.D., Radey M., Schneider E., Phattarasokul S., Bunt R. and Greenberg E.P. **2014**. Global analysis of the *Burkholderia thailandensis* Quorum Sensing-controlled regulon. *J. Bacteriol.* **196**(7) 1412 doi: 10.1128/JB.01405-13.
- Maloy S., Cronan J., Freifelder. **1994**. Microbial Genetics, 2<sup>nd</sup> edition Jones and Bartlett, MA.
- Mangold S., Laxander M., Harneit K., Rohwerder T., Claus G. and Sand W. **2008a**. Visualization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilms on pyrite by atomic force and epifluorescence microscopy under various experimental conditions. *Hydrometallurgy* **94**; 127-32
- Mangold S., Harneit K., Rohwerder T., Claus G. and Sand W. **2008b**. Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization of leaching bacteria on pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 410-5.

- McLean R.J., Whiteley M., Stickler D.J. and Fuqua W.C. **1997**. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters* **154**:259-263.
- Mikko T.N., Lily N., Vilma R., Ranjith R., Timo S., Gordon R., Paul B. and Riina R. **2014**. A novel antifungal is active against *Candida albicans* biofilm and inhibits mutagenic acetaldehyde production in vitro. *PLoS One* **27:9**(5) e97864.
- Miller M.B. and Bassler B.L. **2001**. Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 165-99.
- Milton D.L., Chalker V.J., Kirke D., Hardman A., Camara M. and Williams P. **2001**. The LuxM homologue VanM from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of *N*-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and *N*-hexanoylhomoserine lactone. *J. Bacteriol.* **183**: 3537-3547.
- Minogue T.D., Wehland-von Trebra M., Bernhard F. and von Bodman S.B. **2002**. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol. Microbiol.* **44**(6): 1625-1635.
- Nakayama J., Chen S., Oyama N., Nishiguchi K., Azab E.A., Tanaka E., Kariyama E. and Sonomoto K. **2006**. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal *agrD*. *J. Bacteriol.* **188**: 8321-8326.
- Nasser W. and Reverchon S. **2007**. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**: 381-390.
- Nealson K.H., Platt T. and Hastings J.W. **1970**. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* **104**:313-322.
- Nemcová R., Bomba A., Gancarcíková S., Reiffová K., Guba p., Koscová J., Jonecová Z., Sciranková L. and Bugarský A. **2007**. Effects of the administration of Lactobacilli, Maltodextrins and Fructooligosaccharides upon the adhesion of *E. coli* O8:K88 to the intestinal mucosa and organic acid levels in the gut contents of piglets. *Vet. Res. Commun.* **31**(7):791-800.
- Nilsson P., Olofsson A., Fagerlind M., Fagerström T., Rice S., Kjelleberg S. and Steinberg P. **2001**. Kinetics of the AHL regulatory system in a model biofilm system: how many bacteria constitute a “quorum”? *J. Mol. Biol.* **309**(3): 631-640.
- Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P. and Waterhouse S. **1996**. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* **142**(4): 775–783.
- O’May G.A., Jacobsen S.M., Longwell M., Stoodley P., Mobley H.L. and Shirtliff M.E. **2009**. The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. *Microbiology* **155**(Pt 5): 1523-35.
- O’Toole G.A. and Kolter R. **1998**. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**, 449-461.

- Ogura T., Inoue K., Tatsuta T., Suzaki T., Karata K., Young K., Su L.H., Fierke C.A., Jackman J.E., Raetz C.R., Coleman J., Tomoyasu T. and Matsuzawa H. **1999**. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**(3): 833-44
- Ong S.L., Sarkar S.K., Lee L.Y., Hu J.Y., Ng H.Y. and van Loosdrecht M. **2006**. Effect of formaldehyde on biofilm activity and morphology in an ultracompact biofilm reactor for carbonaceous wastewater treatment. *Water Environ. Res.* **78**(4): 372-380.
- Parsek M.R. and Greenberg E.P. **2005**. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* **13**: 27-33.
- Parsek M.R. and Greenberg E.P. **2000**. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:8789-8793.
- Parsek M.R., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E.Jr. and Greenberg E.P. **1999**. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4360-4365.
- Pearson J.P., Van Delden C. and Iglewski B.H. **1999**. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**: 1203-1210.
- Peng J.B., Yan W.M. and Bao X.Z. **1994a**. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **176**: 2892-97.
- Peng J.B., Yan W.M. and Bao X.Z. **1994b**. Solid medium for the genetic manipulation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 243-253.
- Puskas A., Greenberg E.P., Kaplan S. and Schaefer A.L. **1997**. A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **179**: 7530-7537.
- Pradhan N., Pradhan S.K., Nayak B.B., Mukherjee P.S., Sukla L.B. and Mishra B.K. **2008**. Micro-Raman analysis and AFM imaging of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilm grown on uranium ore. *Res. Microbiol.* **159**(7-8): 557-561.
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C. and Lejeune P. **1999**. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993-6002.
- Pronk J.T., Meijer W.M., Hazeu W., van Dijken J.P., Bos P. and Kuenen J.G. **1991**. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(7): 2057-2062.
- Prouty A.M., Schwesinger W.H. and Gunn J.S. **2002**. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **70**: 2640-2649.
- Qin N., Callahan S.M., Dunlap P.V. and Stevens A.M. **2007**. Analysis of LuxR regulon gene expression during quorum sensing in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **189**: 4127-34.

- Quatrini R., Appia-Ayme C., Denis Y., Jedlicki E., Holmes D.S. and Bonnefoy V. **2009**. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*. **10**: 394.
- Quatrini R., Valdés J., Jedlicki E. and Holmes D. **2007**. The use of bioinformatics and genome biology to advance our understanding of bioleaching microorganisms. *Springer, Microbial Processing of Metal Sulfides* **221**-239.
- Quatrini R., Appia-Ayme C., Denis Y., Ratouchniak J., Veloso F., Valdes J., Lefimil C., Silver S., Roberto F., Orellana O., Denizot F., Jedlicki E., Holmes D.S. and Bonnefoy V. **2006**. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* **83**; 263-272.
- Rasmussen T.B. and Givskov M. **2006**. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* **152**(4): 895-904.
- Rasmussen T.B., Skindersoe M.E., Bjarnsholt T., Phipps R.K., Christensen K.B., Jensen P.O., Andersen J.B., Koch B., Larsen T.O., Hentzer M., Eberl L., Hoiby N. and Givskov M. **2005**. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**(5): 1325-1340.
- Rawlings D.E. **2005**. Characteristics and adaptability of iron and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* **4**:13.
- Rawlings D.E. **2002**. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 65–91.
- Ray V.A. and Visick K.L. **2012**. LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology* **86**(4): 954-970.
- Reverchon S., Chantegrel B., Deshayes C., Doutheau A. and Cotte-Pattat N. **2002**. New synthetic analogues of N-acyl homoserine lactones as agonists or antagonists of transcriptional regulators involved in bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 1153-7.
- Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y., Labbate M., Lam K.W. and Kjelleberg S. **2005**. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* **187**: 3477-3485.
- Riedel C.U., Monk I.R., Casey P.G., Waidmann M.S., Gahan C.G. and Hill C. **2009**. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **71**: 1177-1189.
- Rivas M., Seeger M., Jedlicki E. and Holmes D.S. **2007**. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3225-3231.
- Rivas M., Seeger M., Holmes D.S. and Jedlicki E. **2005**. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol Res.* **38**: 283-97.

- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. and Sand W. **2003**. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239-48.
- Rossi G. **1990**. *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill, New York, N.Y.
- Ruepp A., Graml W., Santos-Martinez M.L., Koretke K.K., Volker C., Mewes H.W., Frishman D., Stocker S., Lupas A.N. and Baumeister W. **2000**. The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* **407**(6803): 508-513.
- Ruiz L.M., Valenzuela S., Castro M., Gonzalez A., Frezza M., Soulère L., Rohwerder T., Queneau Y., Doutheau A., Sand W., Jerez C.A. and Guiliani N. **2008**. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* **94**: 133–37.
- Sabbah M., Fontaine F., Grand L., Boukraa M., Efrat M.L., Doutheau A., Soulère L. and Queneau Y. **2012**. Synthesis and biological evaluation of new N-acyl-homoserine-lactone analogues, based on triazole and tetrazole scaffolds, acting as LuxR-dependent quorum sensing modulators. *Bioorg Med Chem.* **20**(15): 4727-36.
- Sabbah M., Soulère L., Reverchon S., Queneau Y. and Doutheau A. **2011**. LuxR dependent quorum sensing inhibition by N,N'-disubstituted imidazolium salts. *Bioorg Med Chem.* **19**(16): 4868-75.
- Salmond G.P., Bycroft B.W., Stewart G.S. and Williams P. **1995**. The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol Microbiol* **16**(4): 615-624.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P.G. and Schippers A. **2001**. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* **59**:159–75.
- Sand W. and Gehrke T. **2006**. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol.* **157**: 49-56.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W. and Davies D.G. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-54.
- Schaefer A.L., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E.Jr. and Greenberg E.P. **1996**. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:9505-9.
- Schipper A. and Sand W. **1999**. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol* **65**(1): 319-321.
- Schippers A., Jozsa P. and Sand W. **1996**. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl Environ Microbiol* **62**(9): 3424-3431.
- Schuster M. and Greenberg E.P. **2006**. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**: 73-81.

- Schuster M., Urbanowski M.L. and Greenberg E.P. **2004**. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *PNAS* **101**(45): 15833-15839.
- Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T. and Greenberg E.P. **2003**. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**: 2066-79.
- Seegerer A., Neuner A., Kristjansson J.K., Stetter K.O. **1986**. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* Comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing Archaeobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**(4): 559-564.
- Simon R., Priefer U. and Pühler A. **1983**. A Broad host range mobilization system for *In Vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative Bacteria. *Bio/Technology*. **1**; 784-791.
- Sio C.F, Otten L.G., Cool R.H., Diggle S.P., Braun P.G., Bos R., Daykin M., Cámara M., Williams P. and Quax W.J. **2006**. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* **74**: 1673-1682.
- Sorensen P.G., Lutkenhaus J., Young K., Eveland S., Anderson M.A. and Raetz C.R.H. **1996**. Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase in *Escherichia coli*: the second enzymatic step of lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**: 25898-25905.
- Soulère L., Guiliani N., Queneau Y., Jerez C. and Doutheau A. **2008**. Molecular insights into quorum sensing in *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria via molecular modeling of the transcriptional regulator AfeR and of the binding mode of long-chain acyl homoserine lactones. *J. Mol. Model.* **14**: 599-606.
- Srivastava M., Mallard C., Barke T., Hancock L.E. and Self W.T. **2011**. A selenium-dependent xanthine dehydrogenase triggers biofilm proliferation in *Enterococcus faecalis* through oxidation production. *J. Bacteriol.* **193**(7): 1643-52.
- Studel R. **1996**. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **35**(4): 1417-1423.
- Sundin G.W., Shankar S., Chugani S.A., Chopade B.A., Kavanaugh-Black A. and Chakrabarty A.M. **1996**. Nucleoside diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the gene and its role in cellular growth and exopolysaccharide alginate synthesis. *Mol. Microbiol.* **20**(5): 965-79.
- Temple L.K. and Colmer A.R. **1951**. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **62**(5): 605-611.

- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. **1994**. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* **22**: 4673-4680.
- Tsai C. and Winans S.C. **2010**. LuxR-type Quorum Sensing regulators that are detached from common scents. *Mol. Microbiol.* **77**(5): 1072-1082.
- Tuovinen O. H. and Kelly D. P. **1973**. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **88**: 285-298.
- Tyson G.W., Lo I., Baker B.J., Allen E.E., Hugenholtz P. and Banfield J.F. **2005**. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(10): 6319-6324.
- Uroz S., Chhabra S.R., Camara M., Williams P., Oger P. and Dessaux Y. **2005**. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology* **151**:3313-3332.
- Val D.L. and Cronan J.E.Jr. **1998**. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J. Bacteriol.* **180**: 2644-2651.
- Valdés J., Cárdenas J.P., Quatrini R., Esparza M., Osorio H., Duarte F., Lefimil C., Sepulveda R., Jedlicki E. and Holmes D.S. **2010**. Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching. *Hydrometallurgy* **104**: 471-476.
- Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R.J., Tettelin H., Eisen J.A. and Holmes D.S. **2008**. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics.* **11**:9:597.
- Valenzuela S., Banderas A., Jerez C.A. and Guiliani N. **2007**. Cell-cell Communication in bacteria. Microbial Processing of Metal Sulfides. Donati E.R. and Sand W. (ed.) Springer, AA Dordrecht, The Netherlands. Cap. **13**; p. 293-306.
- Valenzuela L., Chi A., Beard S., Orell A., Guiliani N., Shabanowitz J., Hunt D.F. and Jerez C.A. **2006**. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* **24**: 197-211.
- Van Acker H., Sass A., Bazzini S., De Roy K., Udine C., Messiaen T., Riccardi G., Boon N., Nelis H.J., Mahenthalingam E. and Coenye T. **2013**. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One* **8**(3): e58943.
- van Zyl L.J., van Munster J.M. and Rawlings D.E. **2008**. Construction of *arsB* and *tetH* mutants of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus* by marker exchange. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5686-94.

- Varga Z.G., Armada A., Cerca P., Amaral L., Subki M., Savka M.A., Szegedi E., Kawase M., Motohashi N. and Molnár J. **2012**. Inhibition of quorum sensing and efflux pump system by trifluoromethyl ketone proton pump inhibitors. *In vivo* **26**: 277-286.
- Vasil M.L. **2003**. DNA microarrays in analysis of quorum sensing: strengths and limitations. *J. Bacteriol.* **185**: 2061-5.
- Vera M., Krok B., Bellenberg S., Sand W. and Poetsch A. **2013**. Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics* **13**: 1133-1144.
- Vera M., Rohwerder T., Bellenberg S., Sand W., Denis Y. and Bonnefoy V. **2009**. Characterization of biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by a microarray transcriptome analysis. *Adv Mat. Res.* **71-73**: 175-178.
- Von Bodman S.B., Majerczak D.R. and Coplin D.L. **1998**. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7687-7692.
- Vu B., Chen M., Crawford R. J. and Ivanova E. P. **2009**. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**: 2535-54.
- Wagner V.E., Bushnell D., Passador L., Brooks A.I., and Iglewski B.H. **2003**. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**: 2080-95.
- Waksman S.A. and Joffe J.S. **1922**. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *J. Bacteriol.* **7**(2): 239-256.
- Waters C.M. and Bassler B.L. **2005**. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**:319-46.
- Watnick P. and Kolter R. **2000**. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675-2679.
- Watson W.T., Minogue T.D., Val D.L., von Bodman S.B. and Churchill M.E. **2002**. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell* **9**: 685-694.
- Welch M., Todd D.E., Whitehead N.A., McGowan S.J., Bycroft B.W. and Salmond G.P. **2000**. N-acyl homoserine lactone binding to the CarR receptor determines quorum-sensing specificity in *Erwinia*. *EMBO J.* **19**: 631-41.
- Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J. and Salmond G.P. **2001**. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404.
- Whiteley M., Lee K.M. and Greenberg E.P. **1999**. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13904-9.

- Williams K.P and Kelly D.P. **2013**. Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 2901-2906.
- Winson M.K., Camara M., Latifi A., Foglino M., Chhabra S.R., Daykin M., Bally M., Chapon V., Salmond G.P., Bycroft B.W., Lazdunski A., Stewart G.S.A.B. and Williams P. **1995**. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:9427-9431.
- Winzer K. and Williams P. **2001**. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 131-143.
- Wong H., Maker G., Trengove R. and O'Handley R. **2015**. GCMS-Based metabolite profiling of *Salmonella Typhimurium* differentiates between biofilm and planktonic phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(8): 2660-2666.
- Wu H., Song Z. and Hentzer M. **2004**. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**: 1054-61.
- Xu H., Teo K., Neo H. and Liu Y. **2012**. Chemically inhibited ATP synthesis promoted detachment of different-age biofilms from membrane surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**(4): 1073-82.
- Xu L., Li H., Vuong C., Vadyvaloo V., Wang J., Yao Y., Otto M. and Gao Q. **2006**. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **74**: 488-496.
- Yarwood J.M., Bartels D.J., Volper E.M. and Greenberg E.P. **2004**. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* **186**: 1838-1850.
- Yarzabal A., Duquesne K. and Bonnefoy V. **2003**. Rusticyanin gene expression of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 in sulfur-and in ferrous iron-media. *Hydrometallurgy* **71**:107-114.
- Yarzabal A., Brasseur G., Ratouchniak J., Lund K., Lemesle-Meunier D., DeMoss J.A. and Bonnefoy V. **2002**. The high-molecular-weight cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **184**(1): 313-317.
- Yates E.A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S.R., Sockett R.E., Goldner M., Dessaux Y., Cámara M., Smith H. and Williams P. **2002**. N-Acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-temperature, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **70**: 5635-5646.
- Yeom J., Shin J.H., Yang J.Y., Kim J. and Hwang G.S. **2013**. (1)H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PLoS One* **8**(3): e57730.
- Yoshida A., Ansai T., Takehara T. and Kuramitsu H.K. **2005**. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2372-2380.

Zhang Z. and Pierson L.S. **2001**. A second quorum sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4305-4315.

Zhu J. and Winans S. **1999**. Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promotes *in vitro* and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4832-4837.



**ANEXO 1.** Genes regulados por QS que se encuentran sobre-expresados en células planctónicas con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\leq -1,5$  y (■) valores  $\geq -1,5$  y  $\leq -1,0$ .

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gen	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	Promedio	Estadística
1	AFE_0721_146-200		Proteína hipotética		Dominio: globin_like.	-1,04	5,22E-04
	AFE_0721_265-319					-1,04	3,36E-04
2	AFE_1154_329-383		Proteína hipotética			-1,292	1,06E-01
	AFE_1154_75-129					-1,199	1,83E-03
3	AFE_1169_189-243		Proteína hipotética			-1,704	1,17E-03
	AFE_1169_41-95					-1,501	7,42E-03
4	AFE_1176_183-237		Proteína hipotética			-1,575	5,97E-02
	AFE_1176_60-114					-1,071	8,00E-03
5	AFE_1178_507-561		Proteína hipotética		Dominio: DUF2407_C, VirB8.	-1,345	9,08E-03
	AFE_1178_609-663					-1,451	4,60E-02
6	AFE_1223_114-168		Proteína hipotética			-1,28	9,09E-02
	AFE_1223_326-380					-1,445	8,12E-03
7	AFE_1667_1504-1558		Transcetolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: COG3957, Transket_pyr, XFP, TPP_enzymes.	-1,511	1,58E-02
	AFE_1667_1631-1685					-1,452	3,66E-03
8	AFE_1904_132-186a	<i>rpmF</i>	Proteína ribosomal 50S L32	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Ribosoma	-1,077	6,19E-04
	AFE_1904_132-186b					-1,058	6,19E-04
9	AFE_1929_175-229	<i>ndk</i>	Nucleosido difosfato quinasa	Metabolismo y transporte de nucleótidos	Purina metabolismo, Pirimidina metabolismo	-0,934	4,54E-04
	AFE_1929_322-376					-1,227	4,54E-04
10	AFE_1939_860-914	<i>pstS-1</i>	Proteína de unión al sustrato transportador	Metabolismo y transporte de	ABC transportador, Sistema de dos componentes	-1,961	2,31E-03
	AFE_1939_990-1044		ABC fosfato	iones inorgánicos		-1,098	2,20E-02
11	AFE_1940_802-856	<i>pstC 2</i>	Fosfato transportador ABC permeasa	Metabolismo y transporte de	ABC transportador	-1,544	3,55E-03
	AFE_1940_902-956			iones inorgánicos		-1,424	2,49E-03
12	AFE_1982_172-226		Proteína hipotética		Dominio: DUF4168.	-0,961	5,03E-02
	AFE_1982_393-447					-1,084	1,58E-03

13	AFE_2001_84-138a AFE_2001_84-138b	Proteína hipotética				-1,951 -1,946	2,17E-03 3,08E-04
14	AFE_2037_1189-1243 AFE_2037_950-1004	Proteína de eflujo de ma membrana externa	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Dominio: COG1538 TolC, OEP, Biotin_lipoyl_2.		-1,423 -1,137	4,17E-04 9,78E-04
15	AFE_2038_78-132a AFE_2038_78-132b	Proteína hipotética				-1,918 -1,93	8,31E-03 7,56E-03
16	AFE_2039_102-156 AFE_2039_2-56	Proteína hipotética				-2,626 -1,748	3,45E-03 6,89E-04
17	AFE_2040_2180-2234 AFE_2040_2308-2362	receptor dependiente de TonB	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: TonB_dep_Rec, COG1629 CirA, OM_channels.		-1,849 -1,735	1,01E-04 1,01E-04
18	AFE_2131_1122-1176  AFE_2131_1342-1396	proteína de la familia aldehído deshidrogenasa (NAD)	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Pentosa y glucuronato interconversión, Ascorbato y aldarato metabolismo, Degradación de ácidos grasos, Valina leucina e isoleucina degradación, Lisina degradación, Arginina y prolina metabolismo, Glicerolipidos metabolismo, Piruvato metabolismo, Cloroalkano y cloroalkeno degradación, Propanoato metabolismo. Histidina metabolismo, Triptofano metabolismo, beta-Alanina metabolismo.		-1,093  -0,984	1,63E-02  1,79E-03
19	AFE_2161_1516-1570 AFE_2161_1773-1827	Proteína hipotética		Dominio: Transglut_core, DUF3857.		-1,241 -1,536	1,32E-03 1,73E-02
20	AFE_2273_388-442 AFE_2273_553-607	Proteína de la familia de canal de protones MotA/TolQ/ExbB	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Dominio: TolQ.		-1,516 -1,081	5,19E-04 5,29E-04
21	AFE_2274_2244-2298	Proteína hipotética		Dominio: COG3391, beta_rpt_yvtn.		-1,336	1,06E-03
22	AFE_2275_252-306 AFE_2275_675-729	Proteína de la familia TonB	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: tonB_Cterm.		-1,788 -1,674	2,30E-02 3,05E-04
23	AFE_2276_181-235	Proteína hipotética		Dominio: Phn-HD, HDc.		-1,273	1,29E-03
24	AFE_2277_1114-1168	Facilitador principal de la familia de transportadores	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: MFS, 2A0115.		-1,089	3,33E-03
25	AFE_2306_52-106	Regulador de respuesta a unión a ADN	Transcripción	Dominio: COG0745 OmpR, REC, trans_reg_C.		-2,269	8,63E-04
26	AFE_2307_152-206 AFE_2307_36-90	Proteína hipotética		Dominio: 2A0109.		-2,967 -2,496	1,25E-03 7,92E-03
27	AFE_2330_246-300	Proteína hipotética		Dominio: DUF347.		-1,231	1,01E-04

	AFE_2330_569-623					-1,469	1,76E-03
28	AFE_2331_20-74a	Proteína hipotética				-1,727	5,17E-04
	AFE_2331_20-74b					-1,759	9,47E-04
29	AFE_2670_163-217a	<i>rpmB</i> Proteína ribosomal 50S L28	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Ribosoma		-1,106	9,95E-03
	AFE_2670_163-217b					-1,124	1,15E-02
30	AFE_2914_1086-1140	Proteína hipotética		Dominio: DUF1597.		-2,449	4,54E-04
	AFE_2914_735-789					-2,385	4,56E-04
31	AFE_2915_146-200	<i>glnK-1</i> Proteína reguladora de nitrógeno P-II 2	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: COG0347 GlnK, ADH_zinc_N_2.		-2,191	4,42E-04
	AFE_2915_29-83					-2,074	4,32E-04
32	AFE_2916_1123-1177	<i>amt-1</i> Transportador de amonio	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: COG0004 AmtB, Ammonium_transp.		-1,642	1,02E-03
	AFE_2916_765-819					-1,438	5,10E-03
33	AFE_2935_1953-2007	Receptor TonB-dependiente	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: COG1629 CirA, OM_channels, TonB_dep_Rec.		-2,306	8,51E-03
	AFE_2935_2083-2137					-2,355	5,87E-03
34	AFE_2936_1478-1532	Proteína hipotética		Dominio: OM_channels, Plug.		-1,426	2,42E-03
	AFE_2936_1587-1641					-1,266	4,60E-03
35	AFE_3129_1158-1212	Canal de cloro gatillado por voltage	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: Voltage_CLC.		-1,356	3,58E-03
	AFE_3129_1285-1339					-1,209	8,83E-03
36	AFE_3207_413-467	<i>atpF</i> ATP sintetasa F0 subunidad B	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa		-1,082	8,45E-03
	AFE_3207_85-139					-0,97	2,45E-03
37	AFE_3208_192-246	<i>atpE</i> ATP sintetasa F0 subunidad C	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa		-1,408	3,36E-04
	AFE_3208_65-119					-0,939	9,09E-04
38	AFE_3209_429-483	<i>atpB</i> ATP sintetasa F0 subunidad A	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa		-1,735	3,92E-04
	AFE_3209_530-584					-1,38	1,03E-03

**Anexo 2.** Genes regulados por QS que se encuentran reprimidos en células planctónicas con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\geq 1,5$  y (■) valores  $\geq 1,0$  y  $\leq 1,5$ .

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gen	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	Promedio	Estadística
1	AFE_0005_232-286		Proteína de cubierta de esporas	Función desconocida	Dominio: COG5430, SCPU.	0,933	1,98E-03
	AFE_0005_351-405					1,081	6,19E-04
2	AFE_0006_205-259		Proteína chaperona pilus	Movilidad celular	Dominio: FimC, PapD_N.	1,326	1,50E-03
	AFE_0006_513-567					1,273	4,73E-04
3	AFE_0029_1279-1333	<b>tetH</b>	Tetrionato hidrolasa	Función desconocida	Oxidación del tetrionato	1,631	1,24E-03
	AFE_0029_705-759					1,905	2,72E-02
4	AFE_0030_811-865		Proteína hipotética		Dominio: Porin_O_P.	1,826	2,14E-03
	AFE_0030_964-1018					1,138	3,14E-03
5	AFE_0096_290-344		Proteína hipotética		Dominio: YqjK.	1,485	1,62E-02
	AFE_0096_375-429					1,279	6,47E-04
6	AFE_0097_22-76		Proteína hipotética		Dominio: Proteína no caracterizada de unión a cobre.	1,85	8,63E-04
	AFE_0097_250-304					1,427	4,42E-04
7	AFE_0123_409-463	<b>gcp</b>	O-sialoglicoproteína endopeptidasa	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: Proteína de la familia UGMP, BcrAD_BadFG.	0,711	6,93E-03
	AFE_0123_848-902					1,708	3,52E-02
8	AFE_0124_128-182		Proteína hipotética		Dominio: TPR.	1,348	6,84E-02
	AFE_0124_370-424					1,113	1,28E-02
9	AFE_0155_154-208		Proteína de la familia fosfoglicerato mutasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glicólisis / Gluconeogenesis, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	1,252	4,28E-02
	AFE_0155_536-590					1,905	2,80E-02
10	AFE_0219_106-160		Proteína hipotética			2,026	7,18E-02
	AFE_0219_185-239					2,444	3,89E-02
11	AFE_0302_148-202		Proteína hipotética		Dominio: DUF2934.	0,978	5,12E-02
	AFE_0302_18-72					1,421	1,77E-02
12	AFE_0419_495-549	<b>tal</b>	transaldolasa	Metabolismo y transporte de	Vía de la pentosa fosfato, Carbono metabolismo,	1,1	1,27E-02

	AFE_0419_595-649		carbohidratos		Biosíntesis de aminoácidos.		1,322	2,48E-02
13	AFE_0529_223-277		Proteína con dominio tipo rodanasa		Metabolismo y transporte de	Dominio: RHOD.	1,172	2,19E-02
	AFE_0529_333-387				iones inorgánicos		1,243	2,29E-02
14	AFE_0560_125-179		Proteína hipotética				1,884	2,37E-02
	AFE_0560_291-345						1,629	3,87E-03
15	AFE_0572_345-399		Proteína hipotética			Dominio: Memo-like, Memo.	1,215	1,19E-01
	AFE_0572_577-631						1,716	4,26E-02
16	AFE_0573_350-404		Proteína hipotética			Dominio: Proteína A, sistema AmmeMemoRadiSam.	1,163	2,42E-02
	AFE_0573_555-609						0,916	1,08E-03
17	AFE_0582_71-125a		Proteína hipotética			Dominio: DUF2283	1,231	1,89E-03
	AFE_0582_71-125b						1,242	1,94E-03
18	AFE_0595_108-162		lipoproteína			Dominio: DUF4480.	1,106	4,78E-03
	AFE_0595_314-368						1,251	1,34E-01
19	AFE_0696_110-164	<i>gfa</i>	Proteína glutatión-dependiente de la activación		Función desconocida	Metano metabolismo, Carbono metabolismo.	1,203	3,23E-03
	AFE_0696_227-281		de formaldehído				1,474	3,06E-02
20	AFE_0751_106-160		Proteína de la familia de estrés universal		Mecanismo de transducción de señales	Dominio: Usp, Lactamase_B_4.	2,053	2,64E-02
	AFE_0751_275-329						1,736	5,06E-03
21	AFE_0808_719-773		oxidoreductasa, subunidad de unión FAD		Conversión y producción de energía	Purina metabolismo	1,385	2,85E-02
	AFE_0808_948-1002						1,929	4,37E-02
22	AFE_0809_1969-2023		oxidoreductasa, subunidad de unión		Conversión y producción de energía	Purina metabolismo	1,78	2,32E-02
	AFE_0809_2151-2205		molibdopterin				1,092	8,41E-04
23	AFE_0810_397-451		oxidoreductasa, subunidad de unión		Conversión y producción de energía	Dominio: COG2080 CoxS, fer2, Fer2_2.	1,433	2,92E-02
	AFE_0810_41-95		hierro-azufre				1,507	9,86E-02
24	AFE_0846_381-435		zinc-alcohol deshidrogenasa		Predicción de funciones generales	Dominio: COG1064 AdhP, ADH_zinc_N, 2-Hacid_dh_C,	1,607	9,32E-04
	AFE_0846_934-988					NAD_binding_2, ELFV_dehydrog, ApbA, AlaDh_PNT_C.	1,134	2,10E-03
25	AFE_0858_178-232		Proteína hipotética			Dominio: DUF488.	1,497	6,69E-03
	AFE_0858_339-393						1,095	1,33E-03
26	AFE_0859_1105-1159		piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa		Predicción de funciones generales	Dominio: Pyr_redox_2 y Pyr_redox, AIF_C, Reductase_C,	1,62	6,65E-04
	AFE_0859_844-898					Lycopene_cycl, Pyr_redox_3, NAD_binding_8, K_oxygenase.	1,417	1,45E-02

27	AFE_0871_233-287		Proteína de shock de calor, familia Hsp20	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: COG0071 IbpA, ACD_sHsps-like, IbpA.	1,525	1,89E-02
	AFE_0871_351-405					1,475	8,58E-03
28	AFE_0872_2007-2061	<b>lon-2</b>	proteasa La dependiente de ATP	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: AAA , Lon_C, COG0466 Lon, LON.	1,328	4,87E-01
	AFE_0872_2290-2344					1,352	1,18E-02
29	AFE_0937_1209-1263	<b>hoxH</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad alfa	Conversión y producción de energía	Dominio: COG3261 HycE, Complex1_49kDa.	1,177	1,82E-01
	AFE_0937_768-822					1,262	6,19E-04
30	AFE_0940_383-437	<b>hoxF</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad beta	Conversión y producción de energía	Dominio: HCP_like.	1,083	1,64E-02
	AFE_0940_882-936					1,587	1,67E-01
31	AFE_1034_1318-1372		transposasa transposon	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: OrfB_Zn_ribbon, COG0675.	1,461	6,19E-04
	AFE_1034_1429-1483					1,279	4,27E-03
32	AFE_1106_1434-1488		transposasa transposon	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: tspaseT_teng_C.	1,194	1,50E-03
	AFE_1106_1576-1630					1,457	4,03E-03
33	AFE_1418_112-166		Proteína hipotética		Dominio: RHH_1, DUF1778, COG4453.	1,148	7,51E-02
	AFE_1418_199-253					1,134	1,77E-02
34	AFE_1544_354-408		pirofosforilasa	Metabolismo y transporte de coenzimas	Dominio: QRPTase_C, QRPTase_N, Ribul_P_3_epim, PRTase_typell.	0,948	6,51E-02
	AFE_1544_779-833					1,279	1,62E-02
35	AFE_1624_126-180		Proteína hipotética		Dominio: Tetrspannin, Polysacc_synt_C, Tmemb_18A.	1,265	1,09E-02
	AFE_1624_26-80					1,444	9,12E-03
36	AFE_1625_329-383		Proteína hipotética			1,33	2,35E-02
	AFE_1625_591-645					0,954	5,29E-02
37	AFE_1675_264-318	<b>bioD-1</b>	Detriobiotina sintetasa	Metabolismo y transporte de coenzimas	Biotina metabolismo	0,934	1,39E-01
	AFE_1675_531-585					1,551	5,40E-03
38	AFE_1786_375-429		Proteína hipotética		Dominio: Ferritin_like.	1,128	1,32E-03
	AFE_1786_702-756					1,002	2,50E-03
39	AFE_1799_2258-2312		Proteína familia alfa-glucano fosforilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y azúcar	1,077	6,19E-04
	AFE_1799_2377-2431					1,311	2,04E-04
40	AFE_1800_255-309		Proteína con dominio enolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: Enolase_C.	1,299	1,83E-03
	AFE_1800_37-91					0,925	2,75E-03
41	AFE_1801_1309-1363	<b>pyk</b>	Piruvato quinasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Purina metabolismo, Piruvato metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos,	1,297	3,89E-03

	AFE_1801_612-666			Carbono metabolismo.	2,245	1,35E-01
42	AFE_1802_294-348	Aldolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Fructosa y manosa metabolismo, Metano y carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos, Fijación de carbono en organismos fotosintéticos.	1,205	1,83E-02
	AFE_1802_822-876				1,124	1,86E-03
43	AFE_1803_1110-1164	piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Predicción de funciones generales	Dominio: PRK09564, Pyr_redox, Pyr_redox_dim.	1,581	4,19E-03
	AFE_1803_1210-1264				1,281	4,54E-04
44	AFE_1804_111-165a	Proteína hipotética			1,356	1,14E-03
	AFE_1804_111-165b				1,366	9,37E-04
45	AFE_1814_164-218	alkilhidroperoxidasa con dominio AhpD	Función desconocida	Dominio: COG0599, CMD.	1,213	9,19E-02
	AFE_1814_46-100				1,091	1,09E-03
46	AFE_1815_455-509	fosfogliceromutasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Glicina, serina y treonina metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos	1,629	3,49E-03
	AFE_1815_745-799	<b>gpml-1</b>			0,911	2,78E-03
47	AFE_1851_264-318	Proteína de la familia glicosil transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: COG1216, Glyco_tranf_GTA_type.	1,227	1,79E-03
	AFE_1851_392-446				1,105	8,05E-04
48	AFE_1852_137-191	Proteína hipotética			1,513	1,00E-03
	AFE_1852_5-59				1,269	3,08E-04
49	AFE_1853_144-198	Proteína hipotética			1,454	5,29E-04
	AFE_1853_39-93				1,193	2,52E-03
50	AFE_1854_267-321	piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	1,349	6,47E-04
	AFE_1854_900-954				1,49	2,77E-03
51	AFE_1855_212-266	Proteína hipotética		Dominio: MFS.	1,444	3,55E-03
	AFE_1855_38-92				1,323	2,92E-02
52	AFE_1856_1222-1276	deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: COG2303 BetA, GMC_oxred_C, NAD_binding_8, Pyr_redox_2, Lycopene_cycl, GMC_oxred_N, DAO.	1,469	7,84E-03
	AFE_1856_1377-1431				1,397	5,61E-03
53	AFE_1857_486-540	glucosa-1 deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de lípidos	Vía de la pentosa fosfato, Carbono metabolismo	1,068	6,70E-04
	AFE_1857_605-659				1,525	3,20E-03
54	AFE_1858_203-257	Proteína hipotética		Dominio: GH15_N, Glucodextran_N.	1,181	7,34E-04
	AFE_1858_425-479				1,284	8,12E-03

55	AFE_1951_219-273	Proteína hipotética		Dominio: PBP, PEBP_bact_arch.	1,099	2,90E-03
	AFE_1951_449-503				1,192	7,03E-03
56	AFE_2024_274-328	6-fosfogluconato deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Vía de la pentosa fosfato, Glutación metabolismo	1,109	1,63E-02
	AFE_2024_515-569			Carbono metabolismo	1,209	3,09E-03
57	AFE_2061_1209-1263	Proteína hipotética		Dominio: COG1253 TlyC, CBS_pair_CorC_HlyC_assoc.	1,015	4,58E-04
	AFE_2061_430-484				1,187	6,47E-02
58	AFE_2081_2153-2207	Proteína de la familia alfa-amilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y la sacarosa	1,467	1,67E-04
	AFE_2081_2344-2398				1,493	2,51E-03
59	AFE_2082_558-612	Proteína de la familia alfa-amilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y la sacarosa	1,253	1,17E-03
	AFE_2082_882-936				1,597	2,22E-02
60	AFE_2083_267-321	grupo 1 glicosil transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Metabolismo del almidón y la sacarosa	1,233	6,19E-04
	AFE_2083_657-711				1,637	1,20E-02
61	AFE_2084_196-250	Proteína hipotética			1,51	6,40E-02
	AFE_2084_462-516				1,41	1,18E-02
62	AFE_2085_176-230	Proteína hipotética		Dominio: Peptidase_S9, Abhydrolase_5.	2,56	8,53E-02
	AFE_2085_7-61				1,673	5,24E-02
63	AFE_2086_217-271	Proteína de shock térmico, familia Hsp20	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio. ACD_sHsps-like, COG0071 lbpA, BON.	1,957	9,36E-03
	AFE_2086_350-404				1,261	5,02E-03
64	AFE_2087_21-75	Proteína hipotética			2,582	9,26E-03
	AFE_2087_93-147				1,81	1,34E-03
65	AFE_2088_775-829	Proteína de unión a zinc de la familia alcohol deshidrogenasa	Predicción de funciones generales	Glicólisis / Gluconeogenesis, Degradación de ácidos, grasos, Tirosina metabolismo, Cloroalkano y cloroalkeno degradación, Naftaleno degradación, Degradación de compuestos aromáticos.	0,94	4,62E-03
	AFE_2088_875-929				1,086	1,51E-03
66	AFE_2192_224-278	Proteína hipotética		Dominio: DrsE.	2,386	1,20E-02
	AFE_2192_77-131				1,378	2,80E-04
67	AFE_2209_459-513	Regulador transcripcional de la familia TetR	Transcripción	Dominio: COG1309 AcrR.	1,356	9,40E-03
	AFE_2209_561-615				0,976	1,03E-02
68	AFE_2325_266-320	Proteína hipotética		Dominio: YtxH, FUSC.	0,981	1,41E-02

	AFE_2325_5-59								1,641	1,10E-02
69	AFE_2438_231-285	Proteína hipotética			Dominio: COG3462, SHOCT.				1,296	3,91E-03
	AFE_2438_82-136								1,204	1,55E-02
70	AFE_2464_447-501	<b>proB-1</b> glutamato 5-quinasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos		Arginina y prolina metabolismo				1,036	6,19E-04
	AFE_2464_594-648				Biosíntesis de aminoácidos				1,023	1,66E-03
71	AFE_2599_141-195	Proteína hipotética			Dominio: DrsE_2.				1,214	7,80E-04
	AFE_2599_246-300								2,586	5,00E-02
72	AFE_2600_146-200	Proteína hipotética			Dominio: SirA_YedF_YeeD, TusA.				1,545	1,05E-03
	AFE_2600_44-98								2,053	1,88E-02
73	AFE_2601_1008-1062	Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Predicción de funciones generales		Azufre metabolismo				1,021	2,36E-01
	AFE_2601_1070-1124								1,333	4,53E-01
74	AFE_2640_135-189	Proteína hipotética			Dominio: Lactamase_B.				1,102	7,34E-04
	AFE_2640_19-73								1,537	9,11E-04
75	AFE_2641_112-166	Regulador transcripcional de la familia ArsR	Transcripción		Dominio: HTH_ARSR.				1,498	1,27E-03
	AFE_2641_241-295								1,2	9,57E-03
76	AFE_2657_42-96a	Proteína hipotética							0,998	1,40E-02
	AFE_2657_42-96b								1,072	1,15E-02
77	AFE_2750_389-443	<b>rpoH</b> Factor sigma-32 ARN polimerasa	Transcripción		Dominio: Sigma70_r4, Sigma70_r2.				1,529	1,10E-01
	AFE_2750_514-568								1,41	4,43E-02
78	AFE_2834_591-645	Proteína hipotética			Dominio: Band_7, COG0330 HflC, SPFH_paraslipin.				1,7	2,19E-02
	AFE_2834_880-934								1,452	1,58E-03
79	AFE_2835_280-334	Proteína hipotética			Dominio: NfeD.				1,385	1,46E-02
	AFE_2835_380-434								1,031	6,99E-04
80	AFE_2836_1869-1923	<b>glgB</b> proteína de ramificación 1,4-alfa-glucano	Metabolismo y transporte de carbohidratos		Metabolismo del almidón y la sacarosa				1,018	1,85E-01
	AFE_2836_2041-2095								1,257	4,76E-02
81	AFE_2931_2329-2383	<b>recC</b> exodeoxiribonucleasa V subunidad gama	Replicación, recombinación y reparación		Recombinación homóloga				1,206	6,65E-04
	AFE_2931_3238-3292								1,108	1,10E-02
82	AFE_3019_176-230	<b>ptsH</b> proteína fosfotransportadora Hpr	Metabolismo y transporte de carbohidratos		Dominio: PTS-HPr, PTS-HPr_like.				1,451	5,82E-02
	AFE_3019_2-56								1,335	1,00E-02
83	AFE_3078_37-91a	Proteína hipotética			Dominio: PsbJ.				1,357	9,83E-03

	AFE_3078_37-91b					1,321	1,11E-02
84	AFE_3086_2008-2062	Proteína de la membrana plasmática de salida	Metabolismo y transporte de	Fosforilación oxidativa		1,085	1,48E-01
	AFE_3086_2207-2261	de protones tipo P ATPasa	iones inorgánicos			1,106	4,77E-03
85	AFE_3087_79-133a	Proteína hipotética				1,151	8,99E-04
	AFE_3087_79-133b					1,199	4,54E-04
86	AFE_3116_141-195	Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.		1,142	1,09E-03
	AFE_3116_246-300					2,579	4,91E-02
87	AFE_3117_146-200	Proteína hipotética		Dominio: SirA_YedF_YeeD, TusA.		1,547	1,05E-03
	AFE_3117_44-98					2,017	1,82E-02
88	AFE_3222_474-528	Proteína de la familia ADP-ribosilglicohidrolasa	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: ADP_ribosyl_GH, Rick_17kDa_Anti, rve_3.		1,428	1,40E-03
	AFE_3222_846-900					1,809	1,08E-02
89	AFE_3280_388-442	Proteína hipotética		Dominio: PBP.		1,695	2,78E-03
	AFE_3280_489-543					1,66	1,99E-02
90	AFE_3281_134-188	<b>hynD</b> hidrogenasa maduración proteasa	Conversión y producción de energía	Dominio: H2MP_MemB-H2up, frhD.		1,539	1,83E-02
	AFE_3281_20-74					2,414	5,27E-02
91	AFE_3282_160-214	<b>hynH</b> Proteína de expresión hidrogenasa		Dominio: HupH_C.		2,056	1,89E-01
	AFE_3282_319-373					2,066	4,74E-02
92	AFE_3283_231-285	<b>hynS</b> [Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad pequeña	Conversión y producción de energía	Degradación de nitrotolueno		1,539	1,24E-01
	AFE_3283_695-749					1,593	4,01E-02
93	AFE_3284_219-273	<b>isp1</b> Proteína hipotética	Conversión y producción de energía	Dominio: Nitrate_red_gam.		1,87	1,40E-02
	AFE_3284_462-516					1,747	3,96E-02
94	AFE_3285_245-299	<b>isp2</b> Proteína de anclaje hierro-azufre	Conversión y producción de energía	Dominio: CCG, GIpC, Fer4_17.		1,331	3,96E-03
	AFE_3285_730-784					1,486	1,83E-02
95	AFE_3286_1372-1426	<b>hynL</b> [Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad grande	Conversión y producción de energía	Degradación de nitrotolueno		1,586	2,48E-03
	AFE_3286_1498-1552					1,844	8,88E-03
96	AFE_3287_288-342	<b>hypA-2</b> Proteína de incorporación de níquel	Predicción de funciones generales	Dominio: HypA.		1,247	1,98E-04
	AFE_3287_39-93	hidrogenasa HypA				2,562	9,70E-02
97	AFE_3288_24-78	<b>hypB-2</b> Proteína de incorporación de níquel	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: Fer4_NifH.		1,239	1,67E-04
	AFE_3288_673-727	hidrogenasa HypB				1,091	3,31E-03

98	AFE_3289_109-163	<b>hypC-2</b>	Chaperona de ensamblaje	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HupF_HypC.	1,634	3,00E-03
	AFE_3289_3-57		hidrogenasa HypC			1,705	1,47E-02
99	AFE_3290_585-639	<b>hypD-2</b>	Proteína expresión/formación	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HypD.	1,216	1,67E-04
	AFE_3290_687-741		hidrogenasa HypD			1,077	3,05E-04

**Anexo 3.** Genes regulados por QS que se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\geq 1,5$  y (■) valores  $\geq 1,0$  y  $\leq 1,5$ . Con un asterisco (\*) se indica el gen que participa en la formación de biopelículas.

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gene	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	promedio	estadística
1	AFE_0030_811-865	*	Proteína hipotética		Dominio: Pfam Porin_O_P.	1,14	6,85E-03
	AFE_0030_964-1018					0,868	9,18E-03
2	AFE_0690_373-427	<b>fdhD-2</b>	Proteína accesoria FdhD familia formato	Conversión y producción de energía	Dominio: FdhD-NarQ.	1,236	1,06E-02
	AFE_0690_725-779		dehidrogenasa			1,24	1,40E-02
3	AFE_0696_110-164	<b>gfa</b>	proteína glutatión-dependiente de la	Función desconocida	Metabolismo del carbono y metano	1,032	5,68E-02
	AFE_0696_227-281		activación de formaldehído			1,015	8,16E-02
4	AFE_0697_766-820		S-(hidroximetil) glutatión deshidrogenasa	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Naftaleno degradación, Degradación de ácidos grasos, Tirosina metabolismo, Cloroalkano y cloroalkeno degradación, Metabolismo del metano y carbono, Degradación de compuestos aromáticos.	1,099	1,72E-02
	AFE_0697_1027-1081		clase III alcohol deshidrogenasa			0,993	1,31E-02
5	AFE_0698_289-343	<b>fgaA</b>	S- formilglutacion hidrolasa	Predicción de funciones generales	Metabolismo del carbono y metano	1,137	8,57E-03
	AFE_0698_497-551					1,255	5,56E-03

**Anexo 4.** Genes regulados por QS que se encuentran sobre-expresados en células sésiles con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\leq -1,5$  y (●) valores  $\geq -1,5$  y  $\leq -1,0$ .

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gene	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	promedio	estadística
1	AFE_0707_502-556		Proteína hipotética		Dominio: Pfam: TPR_11, SNAP,	-1,025	6,31E-03
	AFE_0707_905-959				TPR_12, Lysine_decarbox.	-0,916	1,59E-02
2	AFE_0709_171-225		Proteína hipotética			-1,194	1,48E-03
	AFE_0709_35-89					-1,287	1,63E-01
3	AFE_0710_440-494		proteína de unión al clúster hierro-azufre	Predicción de funciones generales	Dominio: NifU, Rieske.	-0,718	3,48E-02
	AFE_0710_651-705		familia Rieske			-1,069	5,95E-02
4	AFE_1998_141-195	<i>orf3</i>	Proteína hipotética		QS	-2,245	1,45E-03
	AFE_1998_338-392					-1,98	1,84E-03
5	AFE_1999_222-276	<i>afel</i>	Proteína síntesis autoinductor	Biosíntesis de metabolitos secundarios	QS. Dominio: Pfam: Autoind_synth,	-3,178	1,48E-03
	AFE_1999_445-499			transporte y catabolismo	Acetyltransf_5.	-3,149	4,73E-04

**Anexo 5.** Genes relacionados con la formación de biopelículas que se encuentran sobre-expresados en células sésiles con tetrazol contra células planctónicas con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\geq 1,5$  y (■) valores  $\geq 1,0$  y  $\leq 1,5$ . Un asterisco (\*) indica aquellos genes que también son regulados por QS.

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gen	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	Promedio	Estadística
1	AFE_0006_205-259	*	Proteína chaperona de pilus	Movilidad celular	Dominio: FimC, PapD_N .	1,516	3,70E-02
	AFE_0006_513-567					1,452	3,70E-02
2	AFE_0024_1152-1206	<i>ntrX</i>	Proteína NtrX reguladora de asimilación de nitrógeno	Mecanismo de transducción de señales	Asimilación del Nitrogeno Sistema de dos componentes	1,376	9,07E-03
	AFE_0024_1310-1364					1,282	1,09E-02
3	AFE_0025_135-189		Proteína hipotética			1,325	1,42E-02
	AFE_0025_71-125					1,318	1,24E-02
4	AFE_0055_5-59		Proteína hipotética	Función desconocida	Dominio: Zinc ribbon domain.	1,268	3,48E-02
	AFE_0055_89-143					0,974	6,64E-02
5	AFE_0095_120-174		Proteína hipotética		Dominio: PCP_red.	1,591	3,58E-02
	AFE_0095_31-85					1,493	3,75E-02
6	AFE_0096_290-344	*	Proteína hipotética		Dominio: YqjK.	2,493	1,99E-02
	AFE_0096_375-429					2,372	2,10E-02
7	AFE_0097_22-76	*	Proteína hipotética		Dominio: proteína no caracterizada de unión a cobre.	2,755	5,45E-02
	AFE_0097_250-304					2,973	7,44E-02
8	AFE_0101_270-324		Proteína de unión a ATP transportador ABC	Mecanismos de defensa	Dominio: Sistema de transporte ABC putativo, SalX, ABC_MJ0796_LolCDE_FtsE .	1,254	2,68E-02
	AFE_0101_519-573					1,156	1,92E-02
9	AFE_0103_174-228		Proteína hipotética			1,236	2,09E-02
	AFE_0103_73-127					1,411	2,30E-02
10	AFE_0122_239-293		Proteína hipotética		Dominio: Ferritin-like.	1,652	1,25E-02
	AFE_0122_58-112					1,52	1,87E-02
11	AFE_0123_409-463	<i>gcp*</i>	O-sialoglicoproteína endopeptidasa	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: proteína de la familia UGMP, BcrAD_BadFG.	1,782	6,12E-03
	AFE_0123_848-902					2,222	1,07E-02
12	AFE_0124_128-182	*	Proteína hipotética		Dominio TPR.	1,922	2,01E-02
	AFE_0124_370-424					2,194	1,52E-02
13	AFE_0125_275-329		Proteína hipotética		Glicerolipidos metabolismo, Glicerofosfolípido metabolismo.	1,619	1,57E-02
	AFE_0125_380-434					1,558	1,51E-02
14	AFE_0155_154-208	*	Proteína de la familia fosfoglicerato mutasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glicólisis / Gluconeogenesis, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	1,977	1,16E-02
	AFE_0155_536-590					2,428	8,69E-03

15	AFE_0202_216-270		Proteína de división celular FtsQ	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: FtsQ, POTRA.	1,396	1,22E-02
	AFE_0202_545-599					1,099	4,44E-03
16	AFE_0203_209-263	<i>ddlB</i>	D-alanina-D-alanina ligasa	Pared celular/membrana/biogénesis	D-alanina metabolismo, Peptidoglicano Biosíntesis	1,165	2,93E-02
	AFE_0203_600-654					1,156	6,12E-03
17	AFE_0204_778-832	<i>murB</i>	UDP-N-acetilenolpiruvoil-glucosamina reductasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Amino azúcar, nucleótidos metabolism, Biosíntesis de peptidoglican	1,488	1,05E-02
	AFE_0204_91-145					1,382	1,99E-02
18	AFE_0205_1240-1294	<i>murC</i>	UDP-N-acetilmuramato-L-alanina ligasa	Pared celular/membrana/biogénesis	D-glutamina y D-glutamato metabolismo, Biosíntesis de peptidoglican	1,372	6,82E-03
	AFE_0205_930-984					1,504	2,35E-02
19	AFE_0206_258-312	<i>murG</i>	UDP-N-acetilglucosamina-N-acetilmuramil-(pentapeptido) pirofosforil-UDP	Pared celular/membrana/biogénesis	Biosíntesis de peptidoglican Ciclo celular de Caulobacter	1,235	1,69E-02
	AFE_0206_838-892		N-acetilglucosamina transferasa			0,96	1,61E-02
20	AFE_0207_352-406	<i>ftsW</i>	Proteína FtsW de división celular	Control ciclo celular, división celular, división del cromosoma	Ciclo celular de Caulobacter	0,727	2,16E-02
	AFE_0207_537-591					1,258	2,12E-02
21	AFE_0208_1257-1311	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanina-D-glutamato ligasa	Pared celular/membrana/biogénesis	D-glutamina y D-glutamato metabolismo, Biosíntesis de peptidoglican	1,346	4,10E-03
	AFE_0208_544-598					1,257	1,03E-02
22	AFE_0209_1029-1083	<i>mraY</i>	Fosfo-N-acetylmuramoyl-pentapeptido-transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Biosíntesis de peptidoglican	1,294	1,09E-02
	AFE_0209_884-938					1,158	6,89E-03
23	AFE_0210_1225-1279	<i>murF</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelato	Pared celular/membrana/biogénesis	Lisina biosíntesis, Biosíntesis de peptidoglican	1,426	6,92E-03
	AFE_0210_619-673		D-alanil-D-alanil ligasa			1,603	5,45E-03
24	AFE_0211_1167-1221	<i>murE</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Lisina biosíntesis, Biosíntesis de peptidoglican	1,643	1,03E-02
	AFE_0211_596-650					1,48	5,77E-03
25	AFE_0212_1314-1368	<i>ftsI</i>	FtsI peptidoglican sintetasa	Pared celular/membrana/biogénesis	beta-LACTAM Resistencia, Biosíntesis de peptidoglican	1,52	3,94E-02
	AFE_0212_1478-1532					1,696	8,58E-03
26	AFE_0213_109-163	<i>ftsL</i>	FtsL proteína de división celular	Control ciclo celular, división celular, división del cromosoma	Dominio: FtsL.	1,421	2,36E-02
	AFE_0213_171-225					1,546	9,46E-03
27	AFE_0214_637-691	<i>mraW</i>	S-adenosil-metiltransferasa MraW	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: PRK00050.	1,617	1,50E-02
	AFE_0214_750-804					1,722	3,05E-02
28	AFE_0215_263-317	<i>mraZ</i>	Proteína mraZ	Función desconocida	Dominio: MraZ .	1,318	2,45E-02
	AFE_0215_401-455					1,292	1,51E-02
29	AFE_0219_106-160	*	Proteína hipotética			2,569	1,45E-02

	AFE_0219_185-239					2,551	1,07E-02
30	AFE_0234_567-621	Biosíntesis del núcleo de lipopolisacáridos glicosil transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: WcaA, Beta4Glucosyltransferase.		1,977	1,32E-02
	AFE_0234_678-732					1,998	1,50E-02
31	AFE_0235_442-496	<i>rfaC</i> Lipopolisacárido heptosiltransferasa 1	Pared celular/membrana/biogénesis	Lipopolisacáridos biosíntesis		2,101	1,11E-02
	AFE_0235_905-959					1,83	7,08E-03
32	AFE_0236_154-208	Proteína hipotética		Dominio: Familia tirosina fosfatasa		1,691	1,05E-02
	AFE_0236_48-102					1,617	5,45E-03
33	AFE_0255_566-620	Regulador transcripcional de la familia TetR	Transcripción	Dominio: AcrR, TetR_N, TetR_C_9.		1,329	6,82E-03
	AFE_0255_671-725					1,113	1,09E-02
34	AFE_0256_627-681	<i>argB</i> Acetilglutamato quinasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Arginina y Prolina metabolismo, 2 Oxocarboxílico ácido metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos		1,636	2,69E-02
	AFE_0256_771-825					1,755	1,47E-02
35	AFE_0267_490-544	<i>sqr</i> Sulfuro quinona reductasa	Predicción de funciones generales	Azufre metabolismo		1,748	2,45E-02
	AFE_0267_968-1022					1,693	3,40E-02
36	AFE_0271_156-210	<i>trmB</i> tRNA (guanina-N(7)-)-metiltransferasa	Predicción de funciones generales	Dominio: trmB.		1,486	3,11E-02
	AFE_0271_572-626					1,523	1,93E-02
37	AFE_0287_255-309	Anhidrasa carbónica	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Nitrogeno metabolismo		1,404	2,30E-02
	AFE_0287_471-525					1,34	1,97E-02
38	AFE_0397_325-379	Hidroxiacilglutathion hidrolasa	Predicción de funciones generales	Piruvato metabolismo		1,095	1,22E-02
	AFE_0397_459-513					1,36	9,94E-03
39	AFE_0401_174-228	Proteína con dominio LC7/bloqueo	Predicción de funciones generales	Dominio: Roadblock/LC7.		1,536	2,00E-02
	AFE_0401_357-411					1,239	3,37E-02
40	AFE_0402_149-203	<i>gloA</i> Lactoilglutathion liasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Piruvato metabolismo		1,555	5,77E-03
	AFE_0402_350-404					1,402	1,18E-02
41	AFE_0419_495-549	<i>tal*</i> Transaldolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Vía de la pentosa fosfato, Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos		1,915	4,10E-03
	AFE_0419_595-649					1,794	6,12E-03
42	AFE_0449_798-852	Sensor histidina quinasa	Mecanismo de transducción de señales	Sistema de dos componentes		1,034	4,42E-02
	AFE_0449_922-976					1,042	1,99E-02
43	AFE_0460_306-360	<i>wrbA</i> WrbA proteína de unión a TrpR	Predicción de funciones generales	Dominio: PRK03767.		1,137	1,50E-02
	AFE_0460_436-490					1,331	1,63E-02
44	AFE_0461_469-523	Proteína hipotética	Función desconocida	Dominio: COG2353.		0,828	8,48E-02

	AFE_0461_569-623					1,045	1,38E-02
45	AFE_0462_492-546	D-alanil-D-alanina dipeptidasa	Predicción de funciones generales	Dominio: D-ala-D-ala dipeptidasa.		0,968	1,03E-02
	AFE_0462_602-656					1,437	1,75E-02
46	AFE_0477_166-220	Proteína de virulencia	Función desconocida	Dominio: Antitoxin-MazE and VagC.		1,119	5,80E-03
	AFE_0477_38-92					1,332	7,02E-03
47	AFE_0478_154-208	Proteína asociada a virulencia	Predicción de funciones generales	Dominio: PIN_VapC-FitB.		1,3	1,50E-02
	AFE_0478_351-405					1,31	9,94E-03
48	AFE_0523_410-464	<i>thiJ</i> Proteína 4-metil-5(beta-hidroxietyl)-	Predicción de funciones generales	Dominio: Type 1 glutamine amidotransferase.		1,333	4,07E-02
	AFE_0523_558-612	tiazol síntesis de monofosfato				1,246	1,34E-02
49	AFE_0558_207-261	Proteína hipotética		Dominio: DUF2203.		0,927	7,27E-03
	AFE_0558_43-97					1,033	5,43E-03
50	AFE_0560_125-179	* Proteína hipotética				1,315	5,52E-02
	AFE_0560_291-345					1,501	4,84E-02
51	AFE_0572_345-399	* Proteína hipotética		Dominio: Memo-like.		1,578	1,55E-02
	AFE_0572_577-631					1,864	2,25E-02
52	AFE_0573_350-404	* Proteína hipotética		Dominio: AmmeMemoRadiSam system protein A.		1,675	2,10E-02
	AFE_0573_555-609					1,795	1,16E-02
53	AFE_0574_738-792	Proteína que contiene dominio SAM	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: PflA, Radical_SAM.		1,218	1,94E-02
	AFE_0574_934-988					1,593	1,91E-02
54	AFE_0582_71-125a	* Proteína hipotética		Dominio: DUF2283		1,273	2,07E-02
	AFE_0582_71-125b					1,269	2,14E-02
55	AFE_0583_174-228	Proteína hipotética		Dominio: DUF4258		1,378	2,40E-02
	AFE_0583_74-128					1,445	1,72E-02
56	AFE_0595_108-162	* Lipoproteína		Dominio: DUF4480		2,378	3,33E-02
	AFE_0595_314-368					1,809	3,10E-02
57	AFE_0606_1107-1161	Proteína hipotética		Dominio: CusF_Ec, Cro.		1,499	2,07E-02
	AFE_0606_1211-1265					1,03	4,09E-02
58	AFE_0607_462-516	Proteína hipotética		Dominio: Exonuc_VII_S.		1,848	1,37E-02
	AFE_0607_539-593					1,626	5,77E-03
59	AFE_0630_249-303	Proteína de la familia DJ-1/Pfpl	Predicción de funciones generales	Dominio: Glyco_transf_28, DJ-1_Pfpl_N.		1,413	9,94E-03

	AFE_0630_681-735					1,245	1,87E-02
60	AFE_0651_143-197	Proteína hipotética				1,413	3,71E-02
	AFE_0651_204-258					1,497	3,14E-02
61	AFE_0652_455-509	<i>moeB</i> Molibdopterin biosíntesis proteína	Metabolismo y transporte de	Sistema transición del azufre		1,396	1,97E-02
	AFE_0652_555-609	MoeB	coenzimas			1,486	3,97E-02
62	AFE_0693_1508-1562	Regulador transcripcional	Biosíntesis de metabolitos secundarios,	Dominio: AcoR.		1,687	6,12E-03
	AFE_0693_1621-1675	dependiente de sigma-54	transporte y catabolismo			1,662	1,48E-02
63	AFE_0696_110-164	<i>gfa</i> Proteína glutatión-dependiente de la	Función desconocida	Metano y Carbono metabolismo		1,261	5,77E-03
	AFE_0696_227-281	activación de formaldehído				1,169	6,82E-03
64	AFE_0697_1027-1081	S-(hidroximetil) glutatión deshidrogenasa	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Degradación de ácidos grasos, Tirosina metabolismo, Cloroalcano y cloroalqueno degradación, Naftaleno degradación, Metano y Carbono metabolismo, Degradación de compuestos aromáticos.		1,782	5,45E-03
	AFE_0697_766-820	clase III alcohol deshidrogenasa				1,593	4,10E-03
65	AFE_0702_1357-1411	<i>hybC</i> Hidrogenasa-2, subunidad grande	Conversión y producción de energía	Nitrotolueno degradación.		1,632	3,23E-02
	AFE_0702_1534-1588					1,591	1,03E-02
66	AFE_0707_502-556	* Proteína hipotética		Dominio: TPR.		2,911	7,03E-03
	AFE_0707_905-959					2,753	9,05E-03
67	AFE_0708_120-174	Proteína hipotética		Dominio: Gly-zipper_OmpA, Rick_17kDa_Anti.		1,55	7,03E-03
	AFE_0708_41-95					2,792	6,12E-03
68	AFE_0709_171-225	* Proteína hipotética				2,922	4,36E-03
	AFE_0709_35-89					2,819	5,77E-03
69	AFE_0710_440-494	* Proteína de unión al clúster hierro- azufre,	Predicción de funciones generales	Dominio: Rieske, NifU.		2,572	4,10E-03
	AFE_0710_651-705	familia Rieske				2,542	1,00E-02
70	AFE_0711_1133-1187	Proteína con repeticiones de NHL		Dominio: NHL.		2,382	6,12E-03
	AFE_0711_909-963					2,227	6,59E-03
71	AFE_0712_2030-2084	<i>hypF</i> HypF proteína de maduración [NiFe]	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: Sua5_yciO_yrdC, zf-HYPF, Acylphosphatase, Peptidase M22 y CmcH_NodU.		1,935	4,10E-03
	AFE_0712_2347-2401	hidrogenasa				2,055	8,00E-03
72	AFE_0713_217-271	<i>hypC</i> HypC chaperona de ensamblaje	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HupF_HypC		2,041	9,94E-03
	AFE_0713_32-86	hidrogenasa				1,919	7,27E-03

73	AFE_0714_396-450	<b>gmhA</b>	Fosfoheptosa isomerasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Lipopolisacáridos biosíntesis	0,977	4,30E-02
	AFE_0714_594-648					1,974	5,45E-03
74	AFE_0715_681-735	<b>hypD-1</b>	HypD proteína de expresión formación hidrogenasa	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HypD.	1,976	4,10E-03
	AFE_0715_959-1013					1,641	6,82E-03
75	AFE_0716_1005-1059	<b>hypE</b>	HypE proteína de expresión formación hidrogenasa	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HypE.	1,551	2,07E-02
	AFE_0716_821-875					1,923	1,15E-02
76	AFE_0717_110-164	<b>hypA-1</b>	Proteína de incorporación de níquel hidrogenasa	Predicción de funciones generales	Dominio: HypA.	1,401	4,76E-02
	AFE_0717_248-302					1,238	2,26E-02
77	AFE_0726_330-384		Proteína hipotética		Dominio: Acetyltransf_5.	1,049	2,07E-02
	AFE_0726_496-550					1,072	2,99E-02
78	AFE_0751_106-160	*	Proteína de la familia de estrés universal	Mecanismo de transducción de señales	Dominio: Usp, Lactamase_B_4.	1,588	6,82E-03
	AFE_0751_275-329					1,607	1,82E-02
79	AFE_0772_1164-1218		Guanina deaminasa	Metabolismo y transporte de nucleótidos	Purina metabolismo	1,221	1,57E-02
	AFE_0772_904-958					1,383	7,37E-03
80	AFE_0808_719-773	*	Oxidoreductasa, subunidad de unión FAD	Conversión y producción de energía	Purina metabolismo	2,913	2,72E-02
	AFE_0808_948-1002					2,664	1,03E-02
81	AFE_0809_1969-2023	*	Oxidoreductasa, subunidad de unión molibdopterin	Conversión y producción de energía	Purina metabolismo	2,872	7,27E-03
	AFE_0809_2151-2205					2,845	1,74E-02
82	AFE_0810_397-451	*	Oxidoreductasa, subunidad de unión hierro-azufre	Conversión y producción de energía	Dominio: CoxS, fer2, Fer2_2.	2,578	1,96E-02
	AFE_0810_41-95					2,061	7,80E-02
83	AFE_0846_381-435	*	Zinc-alcohol deshidrogenasa	Predicción de funciones generales	Dominio: ADH_N, ADH_zinc_N, 2-Hacid_dh_C, NAD_binding_2, ELFV_dehydrog, ApbA, AlaDh_PNT_C.	1,993	5,83E-02
	AFE_0846_934-988					1,831	2,73E-02
84	AFE_0858_178-232	*	Proteína hipotética		Dominio: DUF488.	3,106	2,83E-02
	AFE_0858_339-393					2,647	3,58E-02
85	AFE_0859_1105-1159	*	Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Predicción de funciones generales	Dominio: Pyr_redox_2, Pyr_redox, AIF_C, Reductase_C, Lycopene_cycl, Pyr_redox_3, NAD_binding_8, K_oxygenase.	3,115	1,60E-02
	AFE_0859_844-898					3,03	1,09E-02
86	AFE_0871_233-287	*	Proteína de shock de calor, familia Hsp20	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: ACD_sHsps-like, lbpA.	2,311	3,55E-02
	AFE_0871_351-405					2,566	3,99E-02

87	AFE_0872_2007-2061	<b>lon-2*</b>	Proteasa La dependiente de ATP	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: AAA, Lon_C, Lon, LON.	2,249	2,90E-02
	AFE_0872_2290-2344					2,176	1,99E-02
88	AFE_0936_459-513a	<b>hoxW</b>	Proteasa maduración de hidrogenasa	Conversión y producción de energía	Dominio: Hycl.	1,333	1,35E-02
	AFE_0936_459-513b					1,306	1,99E-02
89	AFE_0937_1209-1263	<b>hoxH*</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad alfa	Conversión y producción de energía	Dominio: HycE, Complex1_49kDa.	2,352	4,13E-02
	AFE_0937_768-822					2,588	1,29E-02
90	AFE_0938_22-76	<b>hoxY</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad delta	Conversión y producción de energía	Dominio: Oxidored_q6.	2,628	6,92E-03
	AFE_0938_462-516					2,066	1,76E-02
91	AFE_0939_115-169	<b>hoxU</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad gamma	Conversión y producción de energía	Dominio: DHODB_Fe-S_bind, NAD_binding_1, FAD_binding_6, BatA .	3,208	1,87E-02
	AFE_0939_442-496					2,256	5,80E-03
92	AFE_0940_383-437	<b>hoxF*</b>	[NiFe] hidrogenasa subunidad beta	Conversión y producción de energía	Dominio: HCP_like.	2,885	2,00E-02
	AFE_0940_882-936					2,499	5,09E-02
93	AFE_0953_150-204a		Proteína hipotética		Dominio: YbgT_YccB, 2TM, ABC2_membrane_4, TctB, Acyl_transf_3, NfeD, FUSC-like.	1,133	2,61E-02
	AFE_0953_150-204b					1,137	1,53E-02
94	AFE_0963_726-780		Proteína de la esterilidad masculina	Pared celular/membrana/biogénesis	Fosforilación oxidativa	1,697	3,71E-02
	AFE_0963_849-903					1,866	4,73E-02
95	AFE_1033_381-435		Transposon resolvasa	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: Resolvase, SR_IS607_transposase_like.	1,6	2,53E-02
	AFE_1033_481-535					1,34	9,15E-03
96	AFE_1095_1059-1113		TRAW proteína de ensamblaje de pilus		Dominio: TrbC_Ftype, TraW_N.	1,877	7,06E-03
	AFE_1095_868-922					1,878	1,59E-02
97	AFE_1105_300-354		Transposon resolvasa	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: Resolvase, SR_IS607_transposase_like.	1,52	9,07E-03
	AFE_1105_457-511					1,451	9,40E-03
98	AFE_1254_2313-2367		Proteína hipotética		Dominio: TraI_2, HD, Ndc1_Nup.	1,647	1,08E-02
	AFE_1254_2413-2467					1,637	1,07E-02
99	AFE_1263_256-310		Proteína hipotética			1,301	2,72E-02
	AFE_1263_370-424					1,399	3,72E-02
100	AFE_1304_225-279		Transposon resolvasa	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: HTH_MerR-trunc, Resolvase, SR_IS607_transposase_like.	1,07	1,64E-02
	AFE_1304_352-406					1,13	1,05E-02
101	AFE_1320_264-318		Proteína hipotética		Dominio: PRTases_typeI, RNA_pol.	1,741	7,02E-03
	AFE_1320_488-542					2,205	4,10E-03

102	AFE_1354_1083-1137	Glicósido hidrolasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: GT1_YqgM_like, RfaG.	1,77	5,77E-03	
	AFE_1354_301-355				2,51	1,09E-02	
103	AFE_1355_489-543	Glicósido hidrolasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: GT1_YqgM_like, RfaG.	1,226	1,03E-02	
	AFE_1355_899-953				1,196	5,45E-03	
104	AFE_1357_235-289	Grupo 1 glicosil transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: GT1_wbaZ_like, RfaG.	1,582	1,75E-02	
	AFE_1357_622-676				1,524	1,16E-02	
105	AFE_1358_122-176	Proteína hipotética			1,156	1,61E-02	
	AFE_1358_324-378				0,891	1,42E-02	
106	AFE_1417_414-468	Acetiltransferasa familia GNAT	Transcripción	Dominio: Acetyltransf_7 and Acetyltransf_8, Acetyltransf_1, Acetyltransf_10, FR47.	1,154	3,72E-02	
	AFE_1417_48-102				1,387	7,37E-03	
107	AFE_1418_112-166	*	Proteína hipotética	Dominio: RHH_1, DUF1778.	1,765	2,25E-02	
	AFE_1418_199-253				1,594	6,75E-03	
108	AFE_1544_354-408	*	Pirofosforilasa	Metabolismo y transporte de coenzimas	Dominio: QRPTase_C, Ribul_P_3_epim.	1,896	2,07E-02
	AFE_1544_779-833					1,674	3,43E-02
109	AFE_1551_1741-1795	Sacarosa fosfato sintasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Metabolismo del almidón y sacarosa	1,873	3,22E-02	
	AFE_1551_2005-2059				1,665	1,55E-02	
110	AFE_1552_1832-1886	Sacarosa sintasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Metabolismo del almidón y sacarosa	1,599	5,89E-03	
	AFE_1552_2019-2073				1,055	1,09E-02	
111	AFE_1562_608-662	Proteína hipotética		Dominio: PI3_PI4_kinase, HipA_N.	0,985	8,77E-02	
	AFE_1562_503-557				1,353	2,30E-02	
112	AFE_1579_138-192a	Proteína hipotética		Dominio: DUF2191.	1,183	2,94E-02	
	AFE_1579_138-192b				1,142	2,48E-02	
113	AFE_1607_776-830	Proteína de secreción, familia HlyD	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: HlyD_3, PRK03598, Biotin_lipoyl_2, AsmA.	1,092	3,20E-02	
	AFE_1607_903-957				1,19	2,16E-02	
114	AFE_1624_126-180	*	Proteína hipotética	Dominio: Tetraspannin, Polysacc_synt_C, Tmemb_18A.	3,233	3,20E-02	
	AFE_1624_26-80				3,096	3,11E-02	
115	AFE_1625_329-383	*	Proteína hipotética		3,157	3,89E-02	
	AFE_1625_591-645				2,955	3,14E-02	
116	AFE_1626_51-105a	Proteína hipotética			2,04	2,73E-02	
	AFE_1626_51-105b				2,042	2,53E-02	

117	AFE_1628_56-110a	Proteína hipotética			1,406	3,23E-02
	AFE_1628_56-110b				1,345	3,36E-02
118	AFE_1646_1314-1368	Serina proteasa, familia DO/DeqQ	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: degP_htrA_DO, PDZ_serine_protease.	1,602	1,53E-02
	AFE_1646_1428-1482					1,751
119	AFE_1647_122-176	Proteína hipotética			1,783	2,77E-02
	AFE_1647_22-76				1,681	4,23E-02
120	AFE_1716_550-604	Proteína de unión a GTP	Metabolismo y transporte de lípidos	Dominio: PLDc_2, Regulator_TrmB, PLDc_SF.	1,192	1,06E-02
	AFE_1716_783-837					1,164
121	AFE_1717_192-246a	Proteína hipotética			1,114	4,48E-02
	AFE_1717_192-246b				1,12	4,98E-02
122	AFE_1795_15-69	Proteína hipotética			1,217	1,87E-02
	AFE_1795_151-205				0,917	1,80E-02
123	AFE_1797_1222-1276	Transportador de resistencia a fármacos de la familia EmrB/QacA	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: MFS, efflux_EmrB, TRI12.	1,881	4,21E-03
	AFE_1797_587-641					2,302
124	AFE_1798_158-212	Proteína hipotética		Dominio: TcpE.	2,194	1,45E-02
	AFE_1798_329-383				2,145	1,27E-02
125	AFE_1799_2258-2312	* Proteína familia alfa-glucano fosforilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y sacarosa	2,109	1,73E-02
	AFE_1799_2377-2431					1,857
126	AFE_1800_255-309	* Proteína con dominio enolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: Enolase_C.	1,695	2,82E-02
	AFE_1800_37-91					2,062
127	AFE_1801_1309-1363	<b>pyk*</b> Piruvato quinasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Purina metabolismo, Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo, Biosíntesis aminoácidos	2,014	4,93E-02
	AFE_1801_612-666					2,074
128	AFE_1802_294-348	* Aldolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Fructosa y manosa metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Fijación de carbono en microorganismos fotosintéticos, Biosíntesis de aminoácidos.	2,354	2,12E-02
	AFE_1802_822-876					1,993
129	AFE_1803_1110-1164	* Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa	Predicción de funciones generales	Dominio: PRK09564, Pyr_redox, Pyr_redox_dim.	2,376	2,63E-02
	AFE_1803_1210-1264					2,217
130	AFE_1804_111-165a	* Proteína hipotética			3,031	2,21E-02

	AFE_1804_111-165b					3,031	2,39E-02
131	AFE_1807_368-422	Carbohidrato quinasa, familia PfkB	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Fructosa y manosa metabolismo, Galactosa metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.		0,993	4,36E-03
	AFE_1807_548-602					1,155	8,94E-03
132	AFE_1808_375-429	Fosfato acetil/butiril transferasa	Conversión y producción de energía	Butanoato metabolismo		0,994	2,86E-02
	AFE_1808_486-540					1,256	6,82E-03
133	AFE_1810_1088-1142	<i>ackA</i> Acetato quinasa	Conversión y producción de energía	Taurina y hipotaurina metabolismo, Piruvato metabolismo, Metano y Carbono metabolismo.		1,424	1,25E-02
	AFE_1810_7-61					1,694	1,22E-02
134	AFE_1811_150-204	2-oxo ácido dehidrogenasa, aciltransferasa	Conversión y producción de energía	Dominio: 2-oxoacid_dh, PRK11856, lipoyl_domain.		1,713	1,57E-02
	AFE_1811_594-648					1,616	1,73E-02
135	AFE_1812_530-584	Complejo deshidrogenasa, subunidad beta del componente E1	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrato (TCA ciclo), Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo		1,537	6,82E-03
	AFE_1812_939-993					1,437	1,03E-02
136	AFE_1813_735-789	Complejo deshidrogenasa, subunidad alfa del componente E1	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrato (TCA ciclo), Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo		1,622	1,11E-02
	AFE_1813_936-990					1,689	1,08E-02
137	AFE_1814_164-218	* Proteína con dominio AhpD	Función desconocida	Dominio: CMD, COG0599.		1,83	3,30E-02
	AFE_1814_46-100					1,99	2,12E-02
138	AFE_1815_455-509	<i>gpml-1*</i> Fosfogliceromutasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Glicina, serina y treonina metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.		2,32	1,50E-02
	AFE_1815_745-799					1,761	4,51E-02
139	AFE_1816_1922-1976	<i>ppsA</i> Fosfoenolpiruvato sintetasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Piruvato metabolismo, Metano y Carbono metabolismo.		1,829	9,94E-03
	AFE_1816_2297-2351					1,824	5,52E-02
140	AFE_1828_106-160	Lipoproteína, familia NLP/P60	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: LRAT, Spr.		1,247	8,94E-03
	AFE_1828_240-294					1,12	8,35E-03
141	AFE_1830_378-432	Proteína con tolerancia a tolueno	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: Tol_Tol_Ttg2.		1,698	3,16E-02
	AFE_1830_530-584					1,854	1,03E-02
142	AFE_1841_107-161	Proteína hipotética				2,481	3,28E-02
	AFE_1841_7-61					2,505	4,55E-02
143	AFE_1843_1734-1788	<i>tkt-1</i> Transketolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Vía de la pentosa fosfato, Fijación de carbono en microorganismos fotosintéticos, Carbono metabolismo,		1,515	2,88E-02

	AFE_1843_1969-2023				Biosíntesis de aminoácidos.		1,805	6,92E-03
144	AFE_1851_264-318	*	Proteína de la familia glicosil transferasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: Glyco_tranf_GTA_type, Rhamno_transf.		1,596	1,89E-02
	AFE_1851_392-446						1,813	2,68E-02
145	AFE_1852_137-191	*	Proteína hipotética				2,005	3,87E-02
	AFE_1852_5-59						2,49	3,75E-02
146	AFE_1853_144-198	*	Proteína hipotética				2,673	4,68E-02
	AFE_1853_39-93						2,846	2,13E-02
147	AFE_1854_267-321	*	Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa		3,269	1,78E-02
	AFE_1854_900-954						2,845	2,45E-02
148	AFE_1855_212-266	*	Proteína hipotética		Dominio: MFS.		3,063	1,62E-02
	AFE_1855_38-92						2,807	1,71E-02
149	AFE_1856_1222-1276	*	Deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: BetA, GMC_oxred_C, NAD_binding_8, Pyr_redox_2, Lycopene_cycl, GMC_oxred_N, DAO.		2,793	1,82E-02
	AFE_1856_1377-1431						2,791	2,79E-02
150	AFE_1857_486-540	*	Glucosa-1 deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de lípidos	Vía de la pentosa fosfato, Carbono metabolismo.		2,151	1,22E-02
	AFE_1857_605-659						2,597	1,47E-02
151	AFE_1858_203-257	*	Proteína hipotética		Dominio: GH15_N, Glucodextran_N.		2,593	1,58E-02
	AFE_1858_425-479						2,444	2,25E-02
152	AFE_1861_152-206	<b>phhB</b>	Pterina-4-alfa-carbinolamina deshidratasa	Metabolismo y transporte de coenzimas	Dominio: Pterin_4a, PCD_DCoH.		1,723	6,82E-03
	AFE_1861_213-267						1,552	1,15E-02
153	AFE_1874_1056-1110		Adenilato ciclasa	Función desconocida	Dominio: CHAD, CYTH.		1,934	1,35E-02
	AFE_1874_1196-1250						2,177	2,53E-02
154	AFE_1875_145-199		Proteína tipo-ParA	Control ciclo celular, división celular, división del cromosoma	Dominio: ParA, Fer4_NifH, MipZ, AAA_31.		2,183	1,98E-02
	AFE_1875_434-488						2,185	7,02E-03
155	AFE_1892_595-649		Proteína hipotética		Dominio: PPK2, Avian_gp85, Thymidylate_kin.		1,639	3,15E-02
	AFE_1892_728-782						1,462	1,09E-01
156	AFE_1893_1003-1057		Dihidrolipoamida deshidrogenasa	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrate (TCA ciclo), Glicina, serina y treonina metabolismo, Valina, leucina e isoleucina degradación, Piruvato y Carbono metabolismo.		2,416	1,36E-02
	AFE_1893_1122-1176						2,498	1,83E-02
157	AFE_1900_248-302		CDP-diacilglicerol-glicerol-3-fosfato	Metabolismo y transporte de	Glicerofosfolípido metabolismo		1,211	2,44E-02

	AFE_1900_366-420	3-fosfatidiltransferasa	lípidos		1,217	1,74E-02
158	AFE_1925_114-168	Proteína hipotética		Dominio: CBS, EFG_C.	0,998	4,10E-03
	AFE_1925_223-277				1,09	4,36E-03
159	AFE_1926_266-320	Proteína hipotética		Dominio: NACHT, AAA_16, NB-ARC, AFG1_ATPase, Sigma54_activat, RNA_helicase, NTPase_1, RuvB_N, Miro.	1,266	1,16E-02
	AFE_1926_432-486				1,215	6,12E-03
160	AFE_1951_219-273	* Proteína hipotética		Dominio: PBP, PEBP_bact_arch.	2,677	2,45E-02
	AFE_1951_449-503				2,195	3,76E-02
161	AFE_1959_187-241	Proteína hipotética		Dominio: Peptidase_A22B, RseC_MucC, CoA_binding_3.	1,436	6,82E-03
	AFE_1959_87-141				1,493	5,77E-03
162	AFE_1998_141-195	<i>orf3*</i> Proteína hipotética			1,976	4,00E-02
	AFE_1998_338-392				1,932	7,71E-03
163	AFE_2017_285-339	Familia PspA/IM30	Transcripción	Dominio: PspA_IM30, Spc7, DASH_Dad2, CENP-F_Jeu_zip, Prominin.	1,718	1,18E-02
	AFE_2017_386-440				1,846	7,27E-03
164	AFE_2018_318-372	Proteína hipotética		Dominio: YbjQ_1.	1,52	4,10E-03
	AFE_2018_572-626				1,583	4,57E-03
165	AFE_2019_701-755	Proteína hipotética		Dominio: YbjQ_1.	1,585	1,97E-02
	AFE_2019_814-868				1,814	2,00E-02
166	AFE_2024_274-328	* 6-fosfogluconato deshidrogenasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Vía de la pentosa fosfato, Glutación metabolismo, Carbon metabolismo.	2,276	1,00E-02
	AFE_2024_515-569				2,08	1,38E-02
167	AFE_2026_133-187	Regulador transcripcional de la familia ArsR	Transcripción	Dominio: HTH_ARSR, MarR_2, TrmB, Rrf2.	1,22	3,02E-02
	AFE_2026_30-84				1,257	4,17E-02
168	AFE_2052_729-783	Proteína hipotética		Dominio: EamA, EmrE, UPF0546, RhaT, BAF1 / ABF1.	1,684	4,80E-02
	AFE_2052_838-892				1,918	2,20E-02
169	AFE_2053_1901-1955	<i>xfp</i> Fosfoketolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: TPP_PK, XFP_C.	2,404	1,42E-02
	AFE_2053_2194-2248				2,154	2,95E-02
170	AFE_2054_442-496	Proteína hipotética		Dominio: VGCC_alpha2.	1,88	4,75E-02
	AFE_2054_670-724				1,933	3,71E-02
171	AFE_2081_2153-2207	* Proteína de la familia alfa-amilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y sacarosa	3,033	1,53E-02
	AFE_2081_2344-2398				2,879	8,27E-03
172	AFE_2082_558-612	* Proteína de la familia alfa-amilasa	Metabolismo y transporte de	Metabolismo del almidón y sacarosa	3,041	1,23E-02

	AFE_2082_882-936			carbohidratos			2,807	1,59E-02
173	AFE_2083_267-321	*	Glicosil transferasa grupo 1	Pared celular/membrana/biogénesis	Metabolismo del almidón y sacarosa		2,986	2,30E-02
	AFE_2083_657-711						2,882	4,55E-02
174	AFE_2084_196-250	*	Proteína hipotética				2,626	1,46E-02
	AFE_2084_462-516						2,761	4,03E-02
175	AFE_2085_176-230	*	Proteína hipotética		Dominio: Peptidase_S9, Abhydrolase_5.		2,688	3,35E-02
	AFE_2085_7-61						2,625	5,09E-02
176	AFE_2086_217-271	*	Proteína de shock térmico, familia Hsp20	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio. ACD_sHsps-like, lbpA, BON.		2,624	3,68E-02
	AFE_2086_350-404						2,722	3,23E-02
177	AFE_2087_21-75	*	Proteína hipotética				2,807	4,76E-02
	AFE_2087_93-147						2,737	4,42E-02
178	AFE_2088_775-829	*	Proteína de unión a zinc de la familia alcohol deshidrogenasa	Predicción de funciones generales	Glicólisis / Gluconeogenesis, Degradación de ácidos grasos, Tirosina metabolismo, Cloroalkano y cloroalkeno degradación, Naftaleno degradación, Degradación compuestos aromáticos.		2,378	1,55E-02
	AFE_2088_875-929						2,41	1,53E-02
179	AFE_2089_434-488		Proteína hipotética		Dominio: YkuD.		1,662	2,72E-02
	AFE_2089_608-662						1,376	2,80E-02
180	AFE_2172_1012-1066		beta-lactamasa	Mecanismos de defensa	Dominio: Beta-lactamase.		1,778	3,34E-02
	AFE_2172_673-727						1,652	1,79E-02
181	AFE_2192_224-278	*	Proteína hipotética		Dominio: DrsE.		2,661	1,69E-02
	AFE_2192_77-131						2,37	5,53E-02
182	AFE_2193_496-550	<b>apaH</b>	Diadenosina tetrafosfatasa	Mecanismo de transducción de señales	Purina metabolismo		1,8	4,07E-02
	AFE_2193_781-835						2,039	6,88E-02
183	AFE_2209_459-513	*	Regulador transcripcional de la familia TetR	Transcripción	Dominio: AcrR, TetR_N.		1,259	1,46E-02
	AFE_2209_561-615						1,181	5,09E-02
184	AFE_2210_209-263		Proteína de la familia carboximetilenebutenoidasa	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Clorociclohexano y clorobenceno degradación, Fluorobenzoato degradación.		1,128	1,73E-02
	AFE_2210_88-142						1,084	4,77E-02
185	AFE_2228_433-487	<b>kdpE</b>	Regulador KdpE en respuesta a la unión a ADN	Transcripción	Sistema de dos componentes		1,489	4,10E-03
	AFE_2228_585-639						1,49	1,53E-02
186	AFE_2229_2471-2525	<b>kdpD</b>	Sensor de histidina quinasa KdpD	Mecanismo de transducción de señales	Sistema de dos componentes		1,622	2,38E-02

	AFE_2229_2626-2680					1,06	1,54E-02
187	AFE_2246_263-317	Proteína con dominio dsbG	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: Thioredoxin_2.		1,266	3,78E-02
	AFE_2246_407-461					1,141	4,33E-02
188	AFE_2248_253-307	Lipoproteína		Dominio: SIT, mltA.		1,428	5,05E-02
	AFE_2248_353-407					1,433	2,79E-02
189	AFE_2313_109-163	Proteína hipotética				1,646	2,92E-02
	AFE_2313_234-288					1,409	7,02E-03
190	AFE_2314_191-245	<b>sixA</b> Fosfohistidina fosfatasa SixA	Mecanismo de transducción de señales	Dominio: His_Phos_1, HP_PGM_like.		1,829	1,68E-02
	AFE_2314_91-145					1,553	1,50E-02
191	AFE_2316_337-391	Lipoproteína Slp de membrana externa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: Slp.		2,171	5,26E-02
	AFE_2316_437-491					2,79	2,43E-02
192	AFE_2317_51-105a	Proteína hipotética				2,921	3,57E-02
	AFE_2317_51-105b					2,862	3,99E-02
193	AFE_2324_1334-1388	Fosfoglucomutasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Galactosa metabolismo, Purina metabolismo, Metabolismo del almidón y sacarosa, Amino azúcar y nucleótido metabolismo, Estreptomycin biosíntesis.		1,496	3,91E-02
	AFE_2324_1476-1530					1,637	2,30E-02
194	AFE_2325_266-320	*	Proteína hipotética		Dominio: YtxH, FUSC.	1,507	1,23E-02
	AFE_2325_5-59					1,514	6,82E-03
195	AFE_2327_2298-2352	ATPasa tipo P translocación de magnesio	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: Cation_ATPase_N, COG4087, PRK10517, E1-E2_ATPase, Cation_ATPase_C, HAD, Hydrolase_like2.		2,038	2,34E-02
	AFE_2327_2437-2491					1,718	2,04E-02
196	AFE_2349_1255-1309	Proteína de resistencia a multifármacos	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: MSF, efflux_EmrB.		1,421	3,22E-02
	AFE_2349_1438-1492					0,942	1,05E-02
197	AFE_2361_191-245	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: Amidase_3, LysM.		1,137	1,95E-02
	AFE_2361_629-683					1,306	6,94E-02
198	AFE_2362_96-150	Tioredoxina	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: PRK10996, TRX_family.		1,324	2,30E-02
	AFE_2362_254-308					0,838	3,31E-02
199	AFE_2363_169-223	<b>grxC</b> Glutaredoxina 3	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: GRX_GRXb_1_3_like.		1,54	1,42E-02
	AFE_2363_231-285					1,422	3,22E-02

200	AFE_2364_112-166	Proteína con dominio tipo rodanasa	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: Rhodanese.	1,248	1,09E-02
	AFE_2364_270-324				1,27	1,50E-02
201	AFE_2365_107-161	Proteína hipotética		Dominio: 2TM.	1,327	1,16E-02
	AFE_2365_168-222				1,254	7,77E-03
202	AFE_2366_3094-3148	Transportador de la familia	Mecanismos de defensa	Dominio: ACR_tran, SecD_SecF, MMPL.	-0,914	6,29E-02
	AFE_2366_3194-3248	AcrB/AcrD/AcrF			1,26	3,38E-02
203	AFE_2438_231-285	* Proteína hipotética		Dominio: SHOCT.	2,276	2,25E-02
	AFE_2438_82-136				2,312	1,92E-02
204	AFE_2439_1822-1876	ATPasa tipo P translocación cobre.	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: HAD_like, ATPase-IB1_Cu, E1-E2_ATPase, MATE_like.	2,639	2,07E-02
	AFE_2439_1883-1937				2,416	1,11E-02
205	AFE_2447_186-240	Proteína hipotética		Dominio: DUF302.	1,51	6,82E-03
	AFE_2447_247-301				1,768	1,08E-02
206	AFE_2448_153-207	Proteína de unión a metales pesados	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: HMA.	1,287	6,82E-03
	AFE_2448_92-146				1,205	6,92E-03
207	AFE_2449_53-107	Proteína hipotética		Dominio: NrdH.	0,937	7,04E-03
	AFE_2449_186-240				1,131	4,10E-03
208	AFE_2450_231-285	Proteína de la familia de citocromo C	Conversión y producción de energía	Dominio: Cytochrome c, Cytochrome_CBB3.	1,287	1,08E-02
	AFE_2450_92-146				1,319	7,37E-03
209	AFE_2455_210-264	Proteína hipotética			1,373	3,87E-02
	AFE_2455_22-76				1,029	2,79E-02
210	AFE_2456_45-99a	Proteína hipotética			1,448	1,07E-02
	AFE_2456_45-99b				1,39	1,07E-02
211	AFE_2461_161-215	Proteína hipotética			1,119	9,94E-03
	AFE_2461_244-298				1,167	1,47E-02
212	AFE_2462_249-303	<b><i>glnB-1</i></b> Proteína reguladora de nitrógeno P-II 1	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Sistema de dos componentes	1,109	1,92E-02
	AFE_2462_79-133				1,199	1,35E-02
213	AFE_2463_719-773	Proteína hipotética		Dominio: DUF1597.	1,345	1,75E-02
	AFE_2463_819-873				1,602	1,95E-02
214	AFE_2464_447-501	<b><i>proB-1*</i></b> Glutamato 5-quinasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Arginina y prolina metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	2,733	1,22E-02
	AFE_2464_594-648				2,025	1,09E-02

215	AFE_2480_335-389	<i>merC</i>	Proteína MerC transportador de mercurio		Dominio: PRK13755.	1,425	6,82E-03
	AFE_2480_5-59					1,812	2,07E-02
216	AFE_2482_1532-1586	<i>cga</i>	Glucano 1,4-alfa-glucosidasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y sacarosa	1,407	2,31E-02
	AFE_2482_1742-1796					1,162	6,82E-03
217	AFE_2485_18-72		Transposasa, degenerada		Dominio: DUF3330.	1,054	4,18E-02
	AFE_2485_126-180					0,914	9,15E-03
218	AFE_2489_165-219		Proteína hipotética			2,27	2,22E-02
	AFE_2489_65-119					2,306	1,22E-02
219	AFE_2490_174-228		Proteína hipotética			1,887	1,27E-02
	AFE_2490_40-94					1,923	1,16E-02
220	AFE_2494_201-255		Proteína hipotética		Dominio: DUF3579.	1,212	1,32E-02
	AFE_2494_85-139					1,431	1,82E-02
221	AFE_2495_175-229		Proteína hipotética			1,215	5,33E-02
	AFE_2495_50-104					1,397	1,22E-02
222	AFE_2500_9-63a		Proteína hipotética			1,055	1,05E-02
	AFE_2500_9-63b					1,035	1,11E-02
223	AFE_2505_1626-1680		Proteína B transposición transposon	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: rve, HTH_28, HTH_29.	1,227	6,12E-03
	AFE_2505_1824-1878					1,196	1,87E-02
224	AFE_2506_369-423		Transposon transposasa A		Dominio: Tn7_Tnp_TnsA_C, Tn7_Tnp_TnsA_N.	1,811	6,82E-03
	AFE_2506_501-555					1,654	6,12E-03
225	AFE_2518_54-108a		Proteína hipotética		Dominio: F-box.	1,529	4,69E-02
	AFE_2518_54-108b					1,522	4,89E-02
226	AFE_2526_34-88		Hidrolasa	Predicción de funciones generales	Arginina y prolina metabolismo	1,037	1,87E-02
	AFE_2526_653-707					1,02	2,59E-02
227	AFE_2599_141-195	*	Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.	2,476	1,68E-02
	AFE_2599_246-300					2,612	1,03E-02
228	AFE_2600_146-200	*	Proteína hipotética		Dominio: SirA_YedF_YeeD, TusA.	2,432	2,86E-02
	AFE_2600_44-98					2,51	1,22E-02
229	AFE_2640_135-189	*	Proteína hipotética		Dominio: Lactamase_B.	2,11	2,47E-02
	AFE_2640_19-73					2,307	1,98E-02

230	AFE_2641_112-166	*	Regulador transcripcional de la familia ArsR	Transcripción	Dominio: HTH_ARSR.	2,709	1,15E-02
	AFE_2641_241-295					2,656	3,11E-02
231	AFE_2642_428-482		Proteína hipotética		Dominio: MFS.	0,981	4,66E-02
	AFE_2642_978-1032					1,943	1,50E-02
232	AFE_2643_166-220		Proteína hipotética		Dominio: DrsE.	1,738	1,54E-02
	AFE_2643_288-342					1,7	1,35E-02
233	AFE_2644_518-572		Proteína de la familia metalo-beta-lactamasa	Predicción de funciones generales	Dominio: Lactamase_B.	1,472	4,80E-02
	AFE_2644_618-672					1,546	4,84E-02
234	AFE_2647_43-97a		Proteína hipotética			1,734	1,75E-02
	AFE_2647_43-97b					1,72	1,53E-02
235	AFE_2648_204-258		Proteína hipotética			1,604	3,82E-02
	AFE_2648_378-432					1,352	2,16E-02
236	AFE_2657_42-96a	*	Proteína hipotética			1,355	2,53E-02
	AFE_2657_42-96b					1,418	2,52E-02
237	AFE_2659_1126-1180		Proteína de la familia amino ácido permeasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Dominio: PotE, AA_permease.	1,03	7,43E-02
	AFE_2659_905-959					1,447	2,47E-02
238	AFE_2666_131-185	<b>grpE</b>	GrpE co-chaperona	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: GrpE.	1,074	2,68E-02
	AFE_2666_434-488					1,031	3,73E-02
239	AFE_2719_123-177a		Proteína hipotética		Dominio: Gly_radical.	1,604	1,57E-02
	AFE_2719_123-177b					1,636	1,53E-02
240	AFE_2726_109-163		Proteína hipotética			1	1,92E-02
	AFE_2726_268-322					1,543	1,09E-02
241	AFE_2743_346-400	<b>dapF</b>	Diaminopimelato epimerasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Lisina biosíntesis, Biosíntesis de aminoácidos.	1,085	3,22E-02
	AFE_2743_544-598					1,653	1,80E-02
242	AFE_2744_141-195		Proteína hipotética		Dominio: KorB, mIF3.	1,203	1,53E-02
	AFE_2744_26-80					1,377	1,57E-02
243	AFE_2745_273-327		Proteína hipotética		Dominio: RseA_C, GAF_2, bZIP_2.	1,099	3,61E-02
	AFE_2745_382-436					1,057	3,14E-02
244	AFE_2746_791-845	<b>xerC</b>	Tirosina recombinasa XerC	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: xerC, DNA_BRE_C, Phage_integrase, Phage_int_SAM_1, HALZ.	1,1	1,60E-02
	AFE_2746_891-945					0,998	2,11E-02

245	AFE_2750_389-443	<b>rpoH*</b>	Factor sigma-32 ARN polimerasa	Transcripción	Dominio: Sigma70_r4, rpoH_proteo, Sigma70_r2.	1,061	2,71E-02
	AFE_2750_514-568					1,207	6,09E-02
246	AFE_2769_1182-1236		Endonucleasa de restricción	Mecanismos de defensa	Dominio: zf-C4_Topoisom, Mrr_cat.	1,177	1,22E-02
	AFE_2769_898-952					1,544	3,53E-02
247	AFE_2773_696-750	<b>yghU</b>	Glutation S-transferasa	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: PRK11752, GST_C_YghU_like, GST_N_Ure2p_like.	1,682	2,30E-02
	AFE_2773_826-880					1,893	2,12E-02
248	AFE_2776_1310-1364		Benzoilformato descarboxilasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Aminobenzoato degradación	1,351	1,37E-02
	AFE_2776_1551-1605					1,311	1,16E-02
249	AFE_2777_391-445		Proteína hipotética		Dominio: Abhydrolase_5, Hydrolase_4.	1,817	2,09E-02
	AFE_2777_567-621					1,915	2,30E-02
250	AFE_2778_249-303		Proteína hipotética		Dominio: PHA02517.	2,749	2,53E-02
	AFE_2778_36-90					2,324	3,41E-02
251	AFE_2779_1822-1876		ATPasa tipo P translocación de cobre	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: HAD_like, E1-E2_ATPase.	2,672	1,82E-02
	AFE_2779_1883-1937					2,457	1,17E-02
252	AFE_2796_396-450		Regulador transcripcional de la familia ArsR	Transcripción	Dominio: HTH_ARSR.	1,291	3,40E-02
	AFE_2796_570-624					1,242	6,53E-03
253	AFE_2814_372-426		Proteína hipotética			1,109	1,52E-02
	AFE_2814_491-545					1,769	1,97E-02
254	AFE_2834_591-645	*	Proteína hipotética		Dominio: Band_7, HflC, SPFH_paraslipin.	1,754	1,49E-02
	AFE_2834_880-934					1,537	1,55E-02
255	AFE_2835_280-334	*	Proteína hipotética		Dominio: NfeD.	1,421	8,57E-03
	AFE_2835_380-434					1,801	2,73E-02
256	AFE_2836_1869-1923	<b>glgB*</b>	Proteína de ramificación 1,4-alfa-glucano	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Metabolismo del almidón y sacarosa	1,331	3,04E-02
	AFE_2836_2041-2095					1,485	4,10E-03
257	AFE_2837_116-170		Proteína hipotética			1,384	7,05E-03
	AFE_2837_62-116					1,946	1,09E-02
258	AFE_2867_115-169		Proteína de la familia tioredoxina	Conversión y producción de energía	Dominio: Thioredoxin_3.	1,045	3,58E-02
	AFE_2867_15-69					1,111	1,90E-02
259	AFE_2868_114-168		Proteína hipotética		Dominio: Hemerythrin, Rnk_N.	2,114	7,37E-03
	AFE_2868_310-364					2,101	4,10E-03

260	AFE_2869_277-331	Proteína H sistema de escisión de glicina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	1,911	5,51E-03
	AFE_2869_44-98				2,273	1,03E-02
261	AFE_2885_223-277	Proteína de la familia PemK	Mecanismo de transducción de señales	Dominio: PemK.	1,054	2,39E-02
	AFE_2885_323-377				1,183	2,77E-02
262	AFE_2886_3-57	Proteína de la familia Pemi	Mecanismo de transducción de señales	Dominio: Antitoxin-MazE.	1,257	3,47E-02
	AFE_2886_157-211				0,833	1,12E-02
263	AFE_2892_249-303	Proteína hipotética		Dominio: ATP-synt_8.	1,785	1,03E-02
	AFE_2892_92-146				1,674	6,12E-03
264	AFE_2894_178-232	Proteína hipotética		Dominio: MDMP1_C.	1,636	1,22E-02
	AFE_2894_82-136				1,74	6,82E-03
265	AFE_2895_1545-1599	FtsI peptidoglicano sintetasa	Pared celular/membrana/biogénesis	beta-Lactam resistencia, Biosíntesis de peptidoglican.	1,852	6,75E-03
	AFE_2895_669-723				2,028	1,15E-02
266	AFE_2910_1493-1547	Proteína hipotética		Dominio: AAA_PrkA, PRK15455, PrkA.	1,654	6,60E-02
	AFE_2910_1804-1858				2,033	1,42E-02
267	AFE_2912_1251-1305	Proteína hipotética		Dominio: PRK05325, Seryl_tRNA_N, TMF_TATA_bd.	1,702	2,70E-02
	AFE_2912_798-852				1,724	1,57E-02
268	AFE_2913_1208-1262	Proteína de la familia SpoVR	Función desconocida	Dominio: SpoVR.	0,915	3,72E-02
	AFE_2913_1422-1476				1,116	2,79E-02
269	AFE_2923_613-667	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Biosíntesis de peptidoglican	0,955	4,38E-02
	AFE_2923_843-897				1,119	1,50E-02
270	AFE_2929_707-761	<i>cfa</i> Fosfolipido-acil-graso-ciclopropano sintetasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: AdoMet_Mtases, Cfa.	1,506	9,07E-03
	AFE_2929_852-906				1,584	6,88E-03
271	AFE_2930_240-294	Proteína hipotética		Dominio: DUF1211.	1,197	1,20E-01
	AFE_2930_491-545				1,531	1,54E-02
272	AFE_2931_2329-2383	<i>recC*</i> Exodeoxiribonucleasa V subunidad gamma	Replicación, recombinación y reparación	Recombinación homóloga	1,593	1,03E-02
	AFE_2931_3238-3292				1,347	3,47E-02
273	AFE_2932_3234-3288	<i>recB</i> Exodeoxiribonucleasa V subunidad beta	Replicación, recombinación y reparación	Recombinación homóloga	2,018	6,82E-03
	AFE_2932_3361-3415				1,796	2,09E-02
274	AFE_2945_257-311	<i>msrB</i> Metionina-R-sulfoxido reductasa	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: PRK00222, TF_Zn_Ribbon, zf-Mss51.	1,447	4,10E-03
	AFE_2945_66-120				1,399	5,45E-03

275	AFE_2946_243-297	<i>msrA</i>	Peptido-metionina (S)-S-oxido reductasa	Modificación post-traduccional, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: PMSR.	1,165	1,90E-02
	AFE_2946_449-503					1,231	1,85E-02
276	AFE_2971_1521-1575	<i>cysNC</i>	Sulfato adenililtransferasa	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Purina metabolismo, Selenocomponentes metabolismo, Metabolismo de azufre.	0,971	5,35E-03
	AFE_2971_1712-1766					1,367	9,77E-02
277	AFE_2979_453-507		Proteína con dominio WbbD	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: AdoMet_MTases, Methyltransf_23, Methyltransf_11, MTS, CMAS.	1,751	1,46E-02
	AFE_2979_729-783					1,868	1,03E-02
278	AFE_3017_678-732		Proteína hipotética		Dominio: AsmA, DctA-YdbH.	1,01	6,44E-03
	AFE_3017_864-918					1,304	1,05E-02
279	AFE_3018_876-930	<i>ptsI</i>	Proteína fosfoenolpiruvato fosfotransferasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Sistema de fosfotransferasa (PTS)	1,066	2,09E-02
	AFE_3018_1557-1611					0,949	9,07E-03
280	AFE_3019_176-230	<i>ptsH*</i>	Proteína fosfotransportadora Hpr	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: PTS-HPr, PTS-HPr_like.	1,147	1,55E-02
	AFE_3019_2-56					1,793	7,71E-03
281	AFE_3071_40-94a		Proteína hipotética		Dominio: Gly-zipper_Omp, Gly-zipper_YMGG, Gly-zipper_OmpA.	1,288	1,99E-02
	AFE_3071_40-94b					1,288	1,53E-02
282	AFE_3078_37-91a	*	Proteína hipotética		Dominio: PsbJ, DUF2892.	1,12	2,05E-02
	AFE_3078_37-91b					1,093	2,35E-02
283	AFE_3086_2008-2062	*	Proteína de la membrana plasmática de salida de protones tipo P ATPasa	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Fosforilación oxidativa	1,519	2,42E-02
	AFE_3086_2207-2261					1,614	1,70E-02
284	AFE_3087_79-133a	*	Proteína hipotética			2,524	1,67E-02
	AFE_3087_79-133b					2,561	1,92E-02
285	AFE_3095_400-454		Proteína hipotética		Dominio: COG1611, Lysine_decarbox, DNA_processg_A, YozD.	1,33	3,75E-02
	AFE_3095_602-656					1,184	2,88E-02
286	AFE_3097_22-76	<i>thrB</i>	Homoserina quinasa	Predicción de funciones generales	Glicina, serina y treonina metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	1,279	3,07E-02
	AFE_3097_503-557					1,614	2,68E-02
287	AFE_3116_141-195	*	Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.	2,454	1,67E-02
	AFE_3116_246-300					2,605	9,91E-03
288	AFE_3117_146-200	*	Proteína hipotética		Dominio: SirA_YedF_YeeD, TusA.	2,427	3,22E-02
	AFE_3117_44-98					2,475	1,37E-02
289	AFE_3118_1008-1062		Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Predicción de funciones generales	Dominio: Pyr_redox_2, Pyr_redox_3.	1,464	1,00E-01
	AFE_3118_1070-1124					1,606	4,58E-02

290	AFE_3157_181-235	ISafe6, transposasa, degenerada		Dominio: HTH_33, MDMP1_N, P22_Cro, ALF, Flg_hook.	1,341	3,47E-02	
	AFE_3157_240-294				1,54	4,04E-02	
291	AFE_3159_156-210	Proteína hipotética		Dominio: Phage_GP20, YlqD.	2,406	3,85E-02	
	AFE_3159_256-310				2,579	3,02E-02	
292	AFE_3161_577-631	Proteína de la familia D-isómero específico	Conversión y producción de energía	Piruvato metabolismo.	2,43	2,67E-02	
	AFE_3161_939-993	2-hidroxiácido deshidrogenasa			2,731	2,37E-02	
293	AFE_3165_1078-1132	Proteína hipotética			1,041	1,10E-02	
	AFE_3165_911-965				1,194	1,09E-02	
294	AFE_3222_474-528	* Proteína de la familia ADP-ribosilglicohidrolasa	Modificación post-traduccional, intercambio de proteínas, chaperonas	Dominio: ADP_ribosyl_GH, Rick_17kDa_Anti, rve_3.	2,86	1,37E-02	
	AFE_3222_846-900				2,944	1,57E-02	
295	AFE_3223_214-268	Proteína de la familia WrbA	Predicción de funciones generales	Dominio: FMN_red, Terminase_5.	1,194	1,67E-02	
	AFE_3223_275-329				1,243	1,32E-02	
296	AFE_3225_33-87a	Proteína hipotética		Dominio: PLDc_SF.	1,077	2,28E-02	
	AFE_3225_33-87b				1,084	1,87E-02	
297	AFE_3270_1391-1445	Proteína hipotética		Dominio: HATPase_c.	1,096	3,58E-02	
	AFE_3270_1506-1560				1,202	1,65E-02	
298	AFE_3280_388-442	* Proteína hipotética		Dominio: PBP.	2,997	2,07E-02	
	AFE_3280_489-543				3,456	2,20E-02	
299	AFE_3281_134-188	<i>hynD</i> *	Hidrogenasa maduración proteasa	Conversión y producción de energía	Dominio: H2MP_MemB-H2up, frhD.	3,129	2,04E-02
	AFE_3281_20-74					2,65	1,22E-02
300	AFE_3282_160-214	<i>hynH</i> *	Proteína de expresión hidrogenasa		Dominio: HupH_C.	2,649	3,31E-02
	AFE_3282_319-373					3,152	2,70E-02
301	AFE_3283_231-285	<i>hynS</i> *	[Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad pequeña	Conversión y producción de energía	Nitrotolueno degradación.	2,879	5,77E-02
	AFE_3283_695-749					2,979	4,13E-02
302	AFE_3284_219-273	<i>isp1</i> *	Proteína hipotética	Conversión y producción de energía	Dominio: Nitrate_red_gam.	2,987	1,61E-02
	AFE_3284_462-516					2,78	3,43E-02
303	AFE_3285_245-299	<i>isp2</i> *	Proteína de anclaje hierro-azufre	Conversión y producción de energía	Dominio: CCG, GIpC, Fer4_17.	2,947	2,34E-02
	AFE_3285_730-784					3,049	2,59E-02
304	AFE_3286_1372-1426	<i>hynL</i> *	[Ni/Fe] hidrogenasa, subunidad grande	Conversión y producción de energía	Nitrotolueno degradación.	2,896	1,50E-02

	AFE_3286_1498-1552					2,756	1,09E-02
305	AFE_3287_288-342	<i>hypA-2*</i>	Proteína de incorporación de níquel hidrogenasa HypA	Predicción de funciones generales	Dominio: HypA.	2,521	5,77E-03
	AFE_3287_39-93					2,562	7,37E-03
306	AFE_3288_24-78	<i>hypB-2*</i>	Proteína de incorporación de níquel hidrogenasa HypB	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: Fer4_NifH.	2,338	7,27E-03
	AFE_3288_673-727					2,291	9,07E-03
307	AFE_3289_109-163	<i>hypC-2*</i>	Chaperona de ensamblaje hidrogenasa HypC	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HupF_HypC.	2,422	4,10E-03
	AFE_3289_3-57					2,448	4,10E-03
308	AFE_3290_585-639	<i>hypD-2*</i>	Proteína expresión/formación hidrogenasa HypD	Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	Dominio: HypD.	2,325	6,89E-03
	AFE_3290_687-741					2,176	6,82E-03

**Anexo 6.** Genes relacionados con la formación de biopelículas que se encuentran reprimidos en células sésiles con tetrazol contra células planctónicas con tetrazol. Para cada gen se utilizaron dos oligonucleótidos para identificar sus niveles de ARNm. Se indica el valor de expresión promedio obtenido de tres réplicas biológicas independientes analizadas estadísticamente con el test-t de Benjamini-Hochberg. (■) valores  $\leq -1,5$  y (●) valores  $\geq -1,5$  y  $\leq -1,0$ . Un asterisco (\*) indica aquellos genes que también son regulados por QS.

N°	Oligonucleótido ORF ; posición	Gen	Descripción de la proteína	Clasificación COG	Clasificación KEGG	Promedio	Estadística
1	AFE_0032_1328-1382		Proteína de la membrana	Tráfico intracelular, secreción y	Sistema de secreción bacteriana	-1,019	3,87E-02
	AFE_0032_1533-1587		interna	transporte vesicular	Exportación de proteínas	-1,073	7,02E-03
2	AFE_0045_354-408		Proteína inducida por	Metabolismo y transporte de	Dominio: RHOD.	-1,395	2,59E-02
	AFE_0045_454-508		azufre/pirita/tiosulfato/sulfuro	iones inorgánicos		-1,597	1,05E-01
3	AFE_0191_188-242		Regulador transcripcional	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: HTH_8.	-1,122	1,10E-02
	AFE_0191_54-108		de la familia Fis			-0,933	1,35E-02
4	AFE_0223_525-579	<i>lpxC</i>	UDP-3-0-acil N-acetilglucosamina	Pared celular/membrana/biogénesis	Lipopolisacáridos biosíntesis	-2,164	7,27E-03
	AFE_0223_654-708		deacetilasa			-2,148	9,84E-03

5	AFE_0288_2059-2113	<b>metE</b>	5-metiltetrahydropteriltriglutamato homocisteína S-metiltransferasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Cisteína y metionina metabolismo, Selenocomponentes metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos	-1,875	5,77E-03
	AFE_0288_2231-2285					-1,619	4,57E-03
6	AFE_0289_125-179	<b>ubiE</b>	UbiE metiltransferasa biosíntesis ubiquinona/menaquinona	Metabolismo y transporte de coenzimas	Ubiquinona y otros terpenoides quinona biosíntesis	-1,319	6,82E-03
	AFE_0289_554-608					-1,09	2,13E-02
7	AFE_0306_526-580		Proteína de la familia OmpA	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: OmpA_C-like.	-1,779	2,79E-02
	AFE_0306_97-151					-1,729	6,12E-03
8	AFE_0311_925-979	<b>tuf-2</b>	Factor de elongación Tu	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Dominio: Factor de elongación Tu	-1,234	3,73E-02
	AFE_0311_986-1040					-1,385	1,60E-02
9	AFE_0313_248-302	<b>secE</b>	Preproteína subunidad translocasa SecE	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Sistema de secreción bacteriana Exportación de proteínas	-1,386	4,10E-03
	AFE_0313_64-118					-1,051	2,25E-02
10	AFE_0314_177-231	<b>nusG</b>	Factor de transcripción NusG terminación/antiterminación	Transcripción	Dominio: nusG, NGN_Bact_1, KOW_NusG.	-1,546	6,92E-03
	AFE_0314_476-530					-1,624	1,37E-02
11	AFE_0315_270-324	<b>rplK</b>	Proteína ribosomal 50S L11	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,762	1,44E-02
	AFE_0315_78-132					-1,228	2,77E-02
12	AFE_0316_306-360	<b>rplA</b>	Proteína ribosomal 50S L1	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,808	3,34E-02
	AFE_0316_439-493					-1,72	2,33E-02
13	AFE_0317_103-157	<b>rplJ</b>	Proteína ribosomal 50S L10	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-2,216	3,52E-02
	AFE_0317_380-434					-2,31	2,09E-02
14	AFE_0318_243-297	<b>rplL</b>	Proteína ribosomal 50S L7/L12	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,41	1,95E-02
	AFE_0318_67-121					-1,661	2,35E-02
15	AFE_0325_925-979	<b>tuf-1</b>	Factor de elongación Tu	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Dominio: Factor de elongación Tu	-1,235	3,76E-02
	AFE_0325_986-1040					-1,382	1,57E-02
16	AFE_0326_17-71	<b>rpsJ</b>	Proteína ribosomal 30S S10	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,209	9,94E-03
	AFE_0326_255-309					-1,373	1,23E-02
17	AFE_0327_114-168	<b>rplC</b>	Proteína ribosomal 50S L3	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-0,921	6,81E-03
	AFE_0327_264-318					-1,189	8,24E-03
18	AFE_0328_359-413	<b>rplD</b>	Proteína ribosomal 50S L4	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,245	8,34E-03
	AFE_0328_541-595					-1,262	3,04E-02
19	AFE_0329_13-67	<b>rplW</b>	Proteína ribosomal 50S L23	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,186	2,92E-02

	AFE_0329_169-223			biogénesis		-1,274	1,34E-02
20	AFE_0330_555-609	<i>rplB</i>	Proteína ribosomal 50S L2	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,02	1,90E-02
	AFE_0330_748-802			biogénesis		-1,102	1,26E-02
21	AFE_0331_192-246	<i>rpsS</i>	Proteína ribosomal 30S S19	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,124	4,10E-03
	AFE_0331_51-105			biogénesis		-1,199	1,09E-02
22	AFE_0333_122-176	<i>rpsC</i>	Proteína ribosomal 30S S3	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,153	6,07E-03
	AFE_0333_573-627			biogénesis		-1,233	1,79E-02
23	AFE_0334_226-280	<i>rplP</i>	Proteína ribosomal 50S L16	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,336	1,48E-02
	AFE_0334_363-417			biogénesis		-1,32	1,57E-02
24	AFE_0335_144-198	<i>rpmC</i>	Proteína ribosomal 50S L29	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,195	1,30E-02
	AFE_0335_8-62			biogénesis		-1,053	3,53E-02
25	AFE_0336_197-251	<i>rps17</i>	Proteína ribosomal 30S S17	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,11	1,95E-02
	AFE_0336_7-61			biogénesis		-0,993	2,72E-02
26	AFE_0338_151-205	<i>rplX</i>	Proteína ribosomal 50S L24	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,138	5,31E-02
	AFE_0338_17-71			biogénesis		-1,051	2,34E-02
27	AFE_0339_349-403	<i>rplE</i>	Proteína ribosomal 50S L5	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,333	1,50E-02
	AFE_0339_478-532			biogénesis		-1,103	6,95E-02
28	AFE_0340_132-186	<i>rpsN</i>	Proteína ribosomal 30S S14	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,269	3,44E-02
	AFE_0340_35-89			biogénesis		-0,97	7,06E-02
29	AFE_0341_179-233	<i>rpsH</i>	Proteína ribosomal 30S S8	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,069	2,57E-02
	AFE_0341_306-360			biogénesis		-1,19	2,14E-02
30	AFE_0342_315-369	<i>rplF</i>	Proteína ribosomal 50S L6	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,134	9,91E-03
	AFE_0342_465-519			biogénesis		-1,094	1,35E-02
31	AFE_0343_232-286	<i>rplR</i>	Proteína ribosomal 50S L18	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,269	1,58E-02
	AFE_0343_81-135			biogénesis		-1,299	6,82E-03
32	AFE_0344_374-428	<i>rpsE</i>	Proteína ribosomal 30S S5	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,092	5,65E-02
	AFE_0344_474-528			biogénesis		-1,205	3,15E-02
33	AFE_0345_126-180	<i>rpmD</i>	Proteína ribosomal 50S L30	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,101	8,02E-03
	AFE_0345_26-80			biogénesis		-1,031	1,13E-02
34	AFE_0346_237-291	<i>rplO</i>	Proteína ribosomal 50S L15	Traducción, estructura ribosomal y	RIBOSOMA	-1,51	3,07E-02

	AFE_0346_337-391			biogénesis		-1,392	1,26E-02
35	AFE_0347_1134-1188	<i>secY</i>	Preproteína SecY subunidad translocasa	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Sistema de secreción bacteriana Exportación de proteínas	-1,27	1,56E-02
	AFE_0347_886-940					-1,329	1,88E-02
36	AFE_0348_411-465	<i>adk</i>	Adenilato quinasa	Metabolismo y transporte de nucleótidos	PURINA METABOLISMO	-1,243	1,55E-02
	AFE_0348_586-640					-1,437	4,10E-03
37	AFE_0349_139-193	<i>infA</i>	Factor de iniciación de la traducción IF-1	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Dominio: Factor IF1, S1-like.	-1,363	1,25E-02
	AFE_0349_17-71					-1,516	7,37E-03
38	AFE_0350_60-114a	<i>rpmJ</i>	Proteína ribosomal 50S L36	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,507	1,97E-02
	AFE_0350_60-114b					-1,528	1,99E-02
39	AFE_0351_225-279	<i>rpsM</i>	Proteína ribosomal 30S S13	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,766	7,27E-03
	AFE_0351_46-100					-1,339	1,15E-02
40	AFE_0352_106-160	<i>rpsK</i>	Proteína ribosomal 30S S11	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,612	1,03E-02
	AFE_0352_215-269					-1,527	1,86E-02
41	AFE_0353_431-485	<i>rpsD</i>	Proteína ribosomal 30S S4	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RIBOSOMA	-1,752	2,07E-02
	AFE_0353_531-585					-1,606	3,71E-02
42	AFE_0354_166-220	<i>rpoA</i>	Subunidad alfa ARN polimerasa dirigida a ADN	Transcripción	PURINA METABOLISMO, PIRIMIDINA METABOLISMO, RNA POLIMERASA	-1,577	6,47E-02
	AFE_0354_734-788					-1,41	2,65E-02
43	AFE_0368_635-689	<i>serB</i>	Fosfoserina fosfatasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Glicina serina y treonina metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos	-1,003	1,76E-02
	AFE_0368_735-789					-1,069	1,97E-02
44	AFE_0392_198-252	<i>rbfA</i>	Factor A de unión a ribosoma	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Ribosoma biogénesis	-1,1	2,85E-02
	AFE_0392_280-334					-1,174	1,65E-02
45	AFE_0420_101-155	<i>fabI</i>	Enoil-(acil-proteína-carrier) reductasa	Metabolismo y transporte de lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos, Biotina metabolismo, Metabolismo de ácidos grasos	-1,342	3,08E-02
	AFE_0420_484-538					-1,279	6,82E-03
46	AFE_0421_1579-1633	<i>mltD</i>	Transglicosilasa D murein lítico de unión a membrana	Predicción de funciones generales	Dominio: mltD.	-1,145	7,62E-03
	AFE_0421_1740-1794					-1,332	5,77E-03
47	AFE_0492_153-207	<i>ppa</i>	Pirofosfatasa inorganica	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,255	1,64E-02
	AFE_0492_379-433					-1,283	2,20E-02
48	AFE_0530_562-616		Carbohidrato quinasa, familia PfkB	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Purina metabolismo	-0,944	1,50E-02
	AFE_0530_849-903					-1,176	1,67E-02
49	AFE_0532_397-451	<i>metK</i>	S-adenosilmetionina sintetasa	Metabolismo y transporte de	Cisteína y metionina metabolismo,	-1,25	1,89E-02

	AFE_0532_614-668		coenzimas		Biosíntesis de aminoácidos.	-1,008	5,30E-02
50	AFE_0533_42-96a		Proteína hipotética			-1,704	4,57E-03
	AFE_0533_42-96b					-1,712	4,44E-03
51	AFE_0534_1242-1296	<b>ahcY</b>	S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa	Metabolismo y transporte de	Cisteína y metionina metabolismo	-1,285	1,09E-02
	AFE_0534_1344-1398			coenzimas		-1,388	1,63E-02
52	AFE_0535_480-534	<b>metF</b>	5,10-metilenotetrahidrofolato	Metabolismo y transporte de	Depósito de carbon por folato, Carbono metabolismo	-1,467	1,18E-02
	AFE_0535_595-649		reductasa	aminoácidos		-1,693	1,57E-02
53	AFE_0536_464-518	<b>cbbP</b>	Fosforibuloquinasa	Conversión y producción de energía	Fijación de carbono en microorganismos fotosintéticos,	-0,955	8,35E-03
	AFE_0536_573-627				Carbono metabolismo	-1,134	1,42E-02
54	AFE_0569_211-265		Proteína de la familia	Función desconocida	Dominio: YkuD.	-1,152	9,94E-03
	AFE_0569_324-378		ErfK/YbiS/YcfS/YnhG			-1,057	2,45E-02
55	AFE_0636_267-321		Undecaprenil pirofosfato fosfatasa	Mecanismos de defensa	Biosíntesis de peptidoglican	-0,966	4,10E-03
	AFE_0636_550-604					-1,105	1,42E-02
56	AFE_0864_1044-1098		Transportador de resistencia a fármacos	Predicción de funciones generales	Dominio: MFS, efflux_EmrB.	-1,266	2,42E-02
	AFE_0864_1239-1293		de la familia EmrB/QacA			-1,657	1,51E-02
57	AFE_0895_825-879	<b>serC</b>	Fosfoserina aminotransferasa	Metabolismo y transporte de	Glicina, serina y treonina metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Vitamina B6 metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,188	1,87E-02
	AFE_0895_936-990			aminoácidos	metabolismo, Vitamina B6 metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,068	8,01E-02
58	AFE_0905_120-174	<b>ihfB</b>	Factor de integración al hospedero,	Replicación, recombinación y reparación	Dominio: Bac_DNA_binding, DUF4496, CHDNT.	-1,706	1,15E-02
	AFE_0905_20-74		subunidad beta			-1,527	9,07E-03
59	AFE_1152_287-341		Proteína con dominio endonucleasa HNH	Mecanismos de defensa	Dominio: HNH endonuclease.	-2,336	1,62E-02
	AFE_1152_492-546					-1,946	4,10E-03
60	AFE_1153_153-207		Proteína hipotética			-2,244	1,57E-02
	AFE_1153_44-98					-2,129	1,24E-02
61	AFE_1154_329-383	*	Proteína hipotética			-1,684	4,00E-02
	AFE_1154_75-129					-2,105	5,80E-03
62	AFE_1169_189-243	*	Proteína hipotética			-2,229	1,64E-02
	AFE_1169_41-95					-1,899	1,70E-02
63	AFE_1174_179-233a		Proteína hipotética			-1,857	1,42E-02
	AFE_1174_179-233b					-1,857	1,37E-02

64	AFE_1176_183-237	*	Proteína hipotética			-2,585	2,16E-02
	AFE_1176_60-114					-2,726	1,65E-02
65	AFE_1178_507-561	*	Proteína hipotética		Dominio: DUF2407_C, Zn_peptidase, VirB8, Aminotran_1_2.	-2,057	4,10E-03
	AFE_1178_609-663					-1,763	1,63E-02
66	AFE_1222_291-345		Proteína hipotética		Dominio: OMP_b-brl, Autotransporter.	-2,699	5,45E-03
	AFE_1222_660-714					-3,02	1,09E-02
67	AFE_1338_59-113		Proteína de la familia PAP2	Metabolismo y transporte de lípidos	Dominio: PgpB, PAP2_like.	-1,087	5,89E-02
	AFE_1338_952-1006					-1,203	4,36E-03
68	AFE_1339_1075-1129		Proteína con dominio de biosíntesis exportación de polisacáridos	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: Poly_export, KR.	-1,251	5,77E-03
	AFE_1339_469-523					-1,077	5,09E-02
69	AFE_1340_2141-2195		Proteína tirosina quinasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: PRK09841, ParA, Wzz, RecA-like_NTPases.	-1,738	1,19E-02
	AFE_1340_2343-2397					-1,724	3,05E-02
70	AFE_1342_368-422	<i>galE</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Galactosa metabolismo, Amino azúcar y nucleótido metabolismo.	-1,859	1,29E-02
	AFE_1342_664-718					-1,164	2,32E-02
71	AFE_1433_1075-1129	<i>rhIE</i>	ARN helicasa RhIE ATP-dependiente	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	RNA degradación.	-1,14	4,50E-02
	AFE_1433_934-988					-1,009	5,26E-02
72	AFE_1451_1057-1111		Metaloproteasa de zinc asociada a la membrana	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: S2P-M50_PDZ_RseP-like, PRK10779, PDZ_metaloprotease.	-1,255	2,40E-02
	AFE_1451_904-958					-1,124	1,27E-02
73	AFE_1453_271-325		Proteína de membrana externa de la familia OmpH	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: OmpH, IncA, Telomere_Sde2, LMP.	-1,089	4,98E-02
	AFE_1453_442-496					-1,003	1,01E-01
74	AFE_1457_436-490		Oxidoreductasa unión a NAD	Predicción de funciones generales	Dominio: MviM, GFO_IDH_MocA.	-1,489	4,14E-02
	AFE_1457_688-742					-0,944	6,47E-02
75	AFE_1663_1069-1123	<i>glcF</i>	Glicolato oxidasa, subunidad hierro-azufre	Conversión y producción de energía	Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	-1,51	8,13E-03
	AFE_1663_961-1015					-1,216	1,29E-02
76	AFE_1664_217-271	<i>glcE</i>	Glicolato oxidasa subunidad de unión a FAD	Conversión y producción de energía	Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	-2,976	1,52E-02
	AFE_1664_647-701					-2,423	9,07E-03
77	AFE_1665_759-813	<i>glcD</i>	Glicolato oxidasa subunidad GlcD	Conversión y producción de energía	Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	-2,598	1,79E-02
	AFE_1665_868-922					-2,809	1,22E-02
78	AFE_1666_1099-1153		Proteína hipotética		Dominio: DUF1537.	-2,774	1,42E-02
	AFE_1666_858-912					-2,267	2,36E-02

79	AFE_1667_1504-1558 AFE_1667_1631-1685	*	Transcetolasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Dominio: Transket_pyr, XFP, TPP_enzymes.	-3,243 -2,683	1,03E-02 7,27E-03
80	AFE_1673_1234-1288 AFE_1673_839-893	<i>ilvD-1</i>	Deshidratasa ácido-dihidroxi	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Valina, leucina y isoleucina biosíntesis, Pantotenato y CoA biosíntesis, 2-Oxocarboxílico ácido metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,478 -1,512	4,10E-03 1,16E-02
81	AFE_1674_238-292 AFE_1674_338-392		Proteína de la familia Sua5/YciO/YrdC	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Dominio: Sua5_yciO_yrdC, SUA5, MR_MLE.	-1,032 -1,291	6,82E-03 9,17E-03
82	AFE_1676_1045-1099 AFE_1676_875-929		Proteína de la familia de clase II aldolasa fructosa-difosfato	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Vía de la pentosa fosfato, Fructosa y manosa metabolismo, Metano y Carbono metabolismo, Fijación de carbono de microorganismos fotosintéticos, Biosíntesis de aminoácidos.	-0,985 -1,142	3,99E-02 7,53E-02
83	AFE_1677_1580-1634 AFE_1677_2209-2263		Proteína con dominio del factor von Willebrand tipo A	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: VWA, VWA_CoxE, CobT_C.	-0,991 -1,394	2,79E-02 7,85E-03
84	AFE_1678_519-573 AFE_1678_665-719	<i>p30</i>	Proteína p30	Predicción de funciones generales	Dominio: CbbQ_C, COG0714, AAA_5.	-1,431 -1,334	1,15E-02 1,22E-02
85	AFE_1679_183-237 AFE_1679_47-101		Proteína hipotética			-1,474 -1,506	6,92E-03 1,34E-02
86	AFE_1680_198-252 AFE_1680_305-359		Proteína hipotética		Dominio: ParA.	-1,706 -1,942	1,03E-02 5,35E-03
87	AFE_1681_109-163 AFE_1681_170-224		Proteína hipotética		Dominio: Pterin_4a, PCD_DCoH.	-1,927 -1,807	1,35E-02 1,03E-02
88	AFE_1682_194-248 AFE_1682_366-420	<i>bfr</i>	Bacterioferritina	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Dominio: Ferritin_like, Rubrerythrin.	-1,978 -1,822	1,31E-02 4,36E-03
89	AFE_1683_257-311a AFE_1683_257-311b	<i>cscE</i>	Péptido de la cobertura del carboxisoma	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: BMC.	-1,965 -1,952	7,06E-03 7,37E-03
90	AFE_1684_249-303 AFE_1684_6-60	<i>cscD</i>	Péptido de la cobertura del carboxisoma	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: BMC.	-1,908 -2,036	6,12E-03 4,36E-03
91	AFE_1685_165-219 AFE_1685_243-297	<i>cscC</i>	Péptido de la cobertura del carboxisoma	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: BMC.	-2,183 -1,927	1,32E-02 5,77E-03

92	AFE_1686_213-267 AFE_1686_84-138	<b>cscB</b>	Péptido B carboxisoma	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: EutN_CcmL.	-1,114 -1,06	1,75E-02 8,58E-03
93	AFE_1687_13-67 AFE_1687_185-239	<b>cscA</b>	Péptido A carboxisoma	Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	Dominio: EutN_CcmL.	-0,99 -1,238	4,36E-03 1,24E-02
94	AFE_1688_1128-1182 AFE_1688_1366-1420	<b>cab2</b>	Anhidrasa carbónica, cobertura del carboxisoma		Dominio: CsoSCA.	-0,912 -1,481	9,73E-03 1,83E-02
95	AFE_1690_131-185 AFE_1690_237-291	<b>cbbS-2</b>	Ribulosa bisfosfato carboxilasa, subunidad pequeña		Glioxilato y dicarboxilato metabolismo, Fijación de carbono de microorganismos fotosintéticos, Carbono metabolismo	-1,483 -1,534	2,24E-02 2,02E-02
96	AFE_1691_670-724 AFE_1691_770-824	<b>rbcl</b>	Ribulosa bisofosfato carboxilasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glioxilato y dicarboxilato metabolismo, Fijación de carbono de microorganismos fotosintéticos, Carbono metabolismo	-1,216 -1,368	1,61E-02 2,07E-02
97	AFE_1817_606-660 AFE_1817_706-760		Proteína con dominio sulfotransferasa		Dominio: Sulfotransfer_1.	-1,358 -1,152	3,37E-02 5,70E-02
98	AFE_1867_293-347 AFE_1867_402-456		Proteína hipotética		Dominio: DUF2147.	-2,094 -1,107	1,37E-02 1,01E-02
99	AFE_1904_132-186a AFE_1904_132-186b	<b>rpmF*</b>	Proteína ribosomal 50S L32	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Ribosoma	-1,081 -1,058	3,73E-02 4,29E-02
100	AFE_1929_175-229 AFE_1929_322-376	<b>ndk*</b>	Nucleosido difosfato quinasa	Metabolismo y transporte de nucleótidos	Purina metabolismo, Pirimidina metabolismo	-1,281 -1,01	1,67E-02 1,50E-02
101	AFE_1939_860-914 AFE_1939_990-1044	<b>pstS-1*</b>	Proteína de unión al sustrato transportador ABC fosfato	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	ABC transportadores, Sistema de dos componentes	-3,195 -2,075	6,81E-03 5,77E-03
102	AFE_1940_802-856 AFE_1940_902-956	<b>pstC-2*</b>	Fosfato transportador ABC permeasa	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	ABC transportadores	-2,158 -2,207	6,82E-03 5,45E-03
103	AFE_2033_188-242 AFE_2033_36-90		Proteína hipotética		Dominio: PepSY.	-1,35 -1,458	6,15E-02 4,65E-02
104	AFE_2036_373-427 AFE_2036_671-725		Subunidad MFP transportador de eflujo de la familia RND	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: RND_mfp, HlyD_3.	-1,374 -1,394	1,32E-02 3,54E-02
105	AFE_2038_78-132a AFE_2038_78-132b	*	Proteína hipotética			-1,619 -1,595	8,58E-03 1,03E-02

106	AFE_2040_2180-2234	*	Receptor dependiente de TonB	Metabolismo y transporte de	Dominio: TonB_dep_Rec, CirA, OM_channels.	-2,979	7,37E-03
	AFE_2040_2308-2362			iones inorgánicos		-3,052	6,82E-03
107	AFE_2126_526-580	<i>gpsA</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Conversión y producción de energía	Glicerofosfolípido metabolismo	-1	4,30E-02
	AFE_2126_871-925		NAD(P)H-dependiente			-1,521	8,95E-03
108	AFE_2131_1122-1176	*	Proteína de la familia aldehído deshidrogenasa (NAD)	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Pentosa y glucuronato interconversiones, Ascorbato y aldarato metabolismo, Degradación de ácidos grasos, Valina, leucina e isoleucina degradación, Lisina degradación, Arginina y prolina metabolismo, Histidina metabolismo, Triptofano metabolismo, beta-Alanina metabolismo, Glicerolípidos metabolismo, Piruvato metabolismo, Cloroalkano y cloroalkeno degradación, Propanoato metabolismo.	-1,14	7,37E-03
	AFE_2131_1342-1396					-1,468	1,79E-02
109	AFE_2253_4313-4367		Proteína hipotética		Dominio: COG2373, A2M_like.	-1,233	3,62E-02
	AFE_2253_4538-4592					-1,265	4,32E-02
110	AFE_2267_1065-1119		Proteína de la familia fosfoesterasa	Pared celular/membrana/biogénesis	Inositol fosfato metabolismo, Glicerofosfolípido metabolismo.	-1,884	2,00E-02
	AFE_2267_1352-1406					-2,623	1,31E-02
111	AFE_2268_292-346		Proteína de la familia TonB	Pared celular/membrana/biogénesis	Dominio: TonB_C, toIA_full.	-1,819	6,82E-03
	AFE_2268_660-714					-1,393	1,54E-02
112	AFE_2269_100-154		Proteína de transporte de biopolímeros de la familia ExbD/TolR	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Dominio: ExbD.	-1,599	6,82E-03
	AFE_2269_243-297					-1,703	1,07E-02
113	AFE_2270_124-178		Proteína de la familia de canal de protones MotA/TolQ/ExbB	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Dominio: MotA_ExbB, Robl_LC7, TolQ.	-1,687	1,22E-02
	AFE_2270_600-654					-1,212	2,21E-02
114	AFE_2271_174-228		Regulador transcripcional	Transcripción	Dominio: Trans_reg_C, Response_reg.	-1,639	1,26E-02
	AFE_2271_575-629					-1,395	7,06E-03
115	AFE_2272_286-340		Proteína hipotética		Dominio: DUF3568, DUF3988.	-1,25	8,71E-03
	AFE_2272_459-513					-1,464	1,22E-02
116	AFE_2342_262-316		ARN polimerasa de la familia factor sigma-70	Transcripción	Dominio: Sigma70_r4, RpoD_Cterm, Sigma70_r2.	-1,171	5,45E-03
	AFE_2342_384-438					-1,282	7,02E-03

117	AFE_2354_2554-2608 AFE_2354_3009-3063	<i>purl</i>	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa	Metabolismo y transporte de nucleótidos	Purina metabolismo	-1,945 -1,515	3,23E-02 2,10E-02
118	AFE_2411_219-273 AFE_2411_344-398		Subunidad B deshidrogenasa NADH	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-0,976 -1,166	7,37E-03 1,22E-02
119	AFE_2539_217-271 AFE_2539_306-360		Proteína hipotética			-0,922 -1,033	1,93E-02 2,03E-02
120	AFE_2542_1109-1163 AFE_2542_1283-1337		Proteína de membrana externa de la familia OMPP1/FadL/TodX	Metabolismo y transporte de lípidos	Dominio: Toluene_X.	-1,54 -1,643	1,04E-02 6,39E-02
121	AFE_2543_1045-1099 AFE_2543_880-934		Proteína con dominio para radical SAM	Predicción de funciones generales	Biotina metabolismo	-1,085 -1,151	2,41E-02 1,29E-02
122	AFE_2546_528-582 AFE_2546_628-682		Proteína con dominio para radical SAM	Función desconocida	Dominio: COG1856, DRE_TIM_metallolyase.	-1,346 -1,23	2,25E-02 1,79E-02
123	AFE_2547_284-338 AFE_2547_384-438		Proteína H sistema de escisión de glicina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	-1,246 -1,173	2,58E-02 1,91E-02
124	AFE_2548_229-283 AFE_2548_329-383		Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.	-0,916 -1,238	6,92E-03 1,59E-02
125	AFE_2549_24-78 AFE_2549_267-321		Proteína H sistema de escisión de glicina	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Glicina, serina y treonina metabolismo, Glioxilato y dicarboxilato metabolismo.	-1,113 -1,052	4,74E-02 1,60E-02
126	AFE_2552_120-174 AFE_2552_271-325		Proteína hipotética			-1,287 -1,522	3,44E-02 5,80E-02
127	AFE_2553_375-429 AFE_2553_759-813		Piridine nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Metano y Carbono metabolismo.	-1,711 -1,359	8,46E-02 1,57E-02
128	AFE_2554_1287-1341 AFE_2554_212-266		Heterodisulfuro reductasa subunidad B	Conversión y producción de energía	Metano y Carbono metabolismo.	-1,136 -1,202	5,89E-02 4,94E-02
129	AFE_2555_169-223 AFE_2555_293-347		Proteína de unión a clúster hierro/azufre	Conversión y producción de energía	Metano y Carbono metabolismo.	-1,252 -1,23	1,68E-02 7,64E-03
130	AFE_2556_303-357 AFE_2556_416-470		Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.	-1,324 -1,373	2,07E-02 2,26E-02
131	AFE_2557_142-196 AFE_2557_48-102		Proteína hipotética		Sistema de transición del azufre	-1,06 -1,049	1,79E-02 1,32E-02

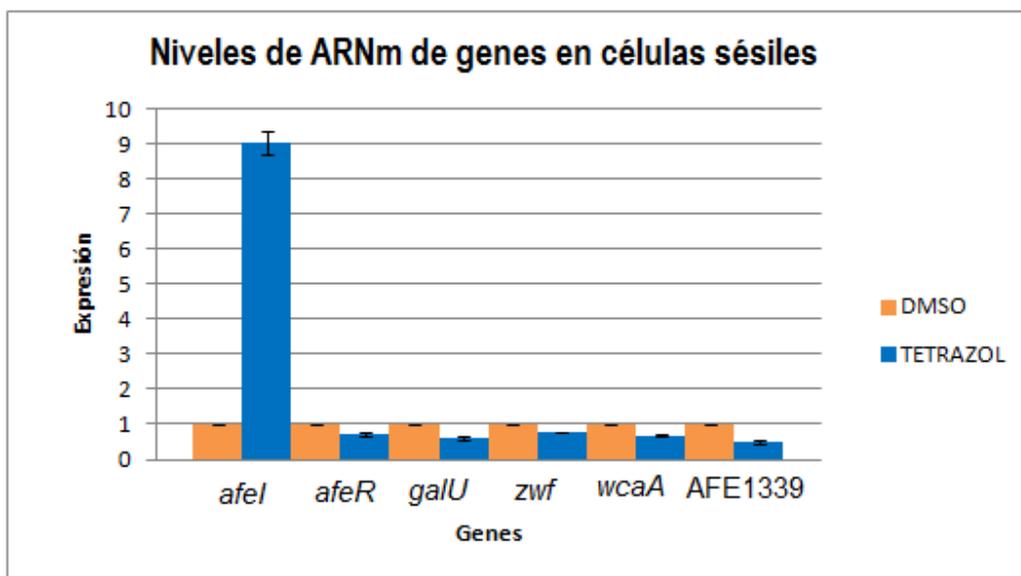
132	AFE_2580_389-443	<b>glyQ</b>	Glicil-tRNA sintetasa subunidad alfa	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Biosíntesis de aminoacil-tRNA	-1,082	7,65E-03
	AFE_2580_504-558					-0,98	1,47E-02
133	AFE_2581_1530-1584	<b>glyS</b>	Glicil-tRNA sintetasa subunidad beta	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Biosíntesis de aminoacil-tRNA	-1,024	2,02E-02
	AFE_2581_1815-1869					-1,128	1,86E-02
134	AFE_2582_176-230		Proteína con dominio histidinol-fosfato fosfatasa	Metabolismo y transporte de aminoácidos	Lipopolisacáridos biosíntesis	-1,248	2,41E-02
	AFE_2582_349-403					-1,186	1,53E-02
135	AFE_2584_188-242		Proteína de la familia aciltransferasa	Metabolismo y transporte de lípidos	Glicerolípidos metabolismo, Glicerofosfolípidos metabolismo.	-1,277	5,36E-02
	AFE_2584_403-457					-1,566	4,68E-02
136	AFE_2603_172-226		Proteína hipotética		Dominio: AdoMet_Mtases, SmtA.	-1,229	1,55E-02
	AFE_2603_449-503					-1,394	1,06E-02
137	AFE_2604_583-637		Proteína de unión a ATP transportador ABC	Mecanismos de defensa	Sistema de transporte tipo ABC-2.	-0,945	4,03E-02
	AFE_2604_870-924					-1,154	4,10E-03
138	AFE_2614_1581-1635	<b>thrS</b>	Treonil-tRNA sintetasa	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Biosíntesis de aminoacil-tRNA	-1,228	1,58E-02
	AFE_2614_1681-1735					-1,229	1,09E-02
139	AFE_2618_1057-1111	<b>nuoM</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad M	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,07	2,61E-02
	AFE_2618_1293-1347					-1,397	7,52E-03
140	AFE_2619_1208-1262	<b>nuoL</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad L	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,817	1,09E-02
	AFE_2619_1602-1656					-1,051	3,71E-02
141	AFE_2620_164-218	<b>nuoK</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad K	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,231	1,70E-02
	AFE_2620_264-318					-1,515	2,14E-02
142	AFE_2621_197-251	<b>nuoJ</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad J	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,263	4,03E-02
	AFE_2621_309-363					-1,337	6,12E-03
143	AFE_2622_170-224	<b>nuoI</b>	NADH deshidrogenasa subunidad I	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,984	1,70E-02
	AFE_2622_399-453					-1,467	8,33E-03
144	AFE_2623_667-721	<b>nuoH</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad H	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,899	3,14E-02
	AFE_2623_888-942					-2,065	2,00E-02
145	AFE_2624_1984-2038	<b>nuoG</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad G	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,573	1,71E-02
	AFE_2624_944-998					-1,689	3,58E-02
146	AFE_2625_1195-1249	<b>nuoF</b>	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad F	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,175	1,51E-01
	AFE_2625_762-816					-1,078	2,24E-02

147	AFE_2626_252-306	<b>nuoE</b>	NADH-quinona oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,268	1,16E-02
	AFE_2626_400-454		subunidad E			-1,026	3,63E-02
148	AFE_2627_478-532	<b>nuoD</b>	NADH deshidrogenasa subunidad D	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,58	2,42E-02
	AFE_2627_772-826					-1,705	1,90E-02
149	AFE_2628_143-197	<b>nuoC</b>	NADH-quinona oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,344	1,03E-02
	AFE_2628_555-609		subunidad C			-1,088	1,87E-02
150	AFE_2629_17-71	<b>nuoB</b>	NADH deshidrogenasa subunidad B	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,318	6,93E-03
	AFE_2629_219-273					-1,209	1,24E-02
151	AFE_2630_235-289	<b>nuoA</b>	NADH-quinona oxidoreductasa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,096	7,37E-03
	AFE_2630_8-62		subunidad A			-1,067	1,53E-02
152	AFE_2632_183-237	<b>secG</b>	Preproteína translocasa subunidad SecG	Tráfico intracelular, secreción y	Sistema de secreción bacteriana	-1,035	1,82E-02
	AFE_2632_348-402			transporte vesicular	Exportación de proteínas	-0,865	1,09E-02
153	AFE_2633_442-496	<b>tpiA</b>	Triosafofato isomerasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis / Gluconeogenesis, Fructosa y manosa metabolismo, Inositol fosfato metabolismo, Fijación de carbono en microorganismos fotosintéticos, Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,007	8,35E-03
	AFE_2633_544-598					-0,959	1,46E-02
154	AFE_2934_176-230		Regulador transcripcional	Transcripción	Sistema de dos componentes	-1,072	1,57E-02
	AFE_2934_56-110					-1,234	2,00E-02
155	AFE_2969_205-259		Proteína hipotética		Dominio: Methyltransf_23, Methyltransf_11, Methyltransf_31, Methyltransf_12, AdoMet_Mtases.	-1,079	2,33E-02
	AFE_2969_670-724					-1,009	2,53E-02
156	AFE_3068_2168-2222	<b>pdhC</b>	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrato (TCA ciclo), Glicina, serina y treonina metabolismo, Valina, leucina e isoleucina degradación, Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo.	-1,021	5,64E-02
	AFE_3068_2538-2592		dihidrolipoamida deshidrogenasa			-1,343	3,23E-02
157	AFE_3069_270-324	<b>pdhB</b>	Piruvato deshidrogenasa E1	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrato (TCA ciclo), Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo.	-1,625	1,15E-02
	AFE_3069_507-561		componente subunidad beta			-1,457	1,16E-02
158	AFE_3070_725-779	<b>pdhA</b>	Piruvato deshidrogenasa E1	Conversión y producción de energía	Glicólisis / Gluconeogenesis, Ciclo del citrato (TCA ciclo), Piruvato metabolismo, Carbono metabolismo.	-1,163	1,50E-02
	AFE_3070_918-972		componente subunidad alfa			-1,247	1,09E-02

159	AFE_3114_158-212		Proteína hipotética		Dominio: DrsE_2.	-1,768	6,20E-02
	AFE_3114_287-341					-1,824	4,72E-02
160	AFE_3115_226-280		Proteína hipotética		Dominio: PsiE.	-1,334	7,85E-03
	AFE_3115_366-420					-1,194	1,98E-02
161	AFE_3129_1158-1212	*	Canal de cloro gatillado por voltage	Metabolismo y transporte de	Dominio: Voltage_CLC.	-1,529	4,10E-03
	AFE_3129_1285-1339			iones inorgánicos		-1,516	6,82E-03
162	AFE_3131_72-126		Proteína de translocación doble-arginina, familia TatA/E	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular	Sistema de secreción bacteriana	-1,08	2,39E-02
	AFE_3131_195-249					Exportación de proteínas	-0,941
163	AFE_3137_303-357		Regulador en respuesta a unión a ADN	Transcripción	Sistema de dos componentes, RegB-RegA (respuesta redox).	-1,171	4,13E-02
	AFE_3137_462-516					-1,266	2,39E-02
164	AFE_3138_463-517		2OG-Fe(II) oxigenasa		Dominio: P4Hc, 2OG-FeII_Oxy, Cuticle_1.	-1,034	7,41E-02
	AFE_3138_563-617					-1,135	4,07E-02
165	AFE_3144_574-628		Proteína hipotética			-1,102	1,71E-02
	AFE_3144_724-778					-1,002	9,94E-03
166	AFE_3145_63-117a		Proteína hipotética			-1,524	6,88E-03
	AFE_3145_63-117b					-1,514	6,82E-03
167	AFE_3202_168-222	<b>atpC</b>	FOF1 ATP sintasa subunidad epsilon	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,978	3,25E-02
	AFE_3202_322-376					-1,614	3,86E-02
168	AFE_3203_1101-1155	<b>atpD</b>	ATP sintasa F1 subunidad beta	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-2,261	1,70E-02
	AFE_3203_1258-1312					-2,327	1,35E-02
169	AFE_3204_491-545	<b>atpG</b>	FOF1 ATP sintasa subunidad gamma	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-2,21	4,31E-02
	AFE_3204_661-715					-2,071	3,25E-02
170	AFE_3205_1274-1328	<b>atpA</b>	FOF1 ATP sintasa subunidad alfa	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-2,348	3,11E-02
	AFE_3205_1491-1545					-2,297	3,73E-02
171	AFE_3206_208-262	<b>atpH</b>	ATP sintasa F1 subunidad delta	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,658	1,53E-02
	AFE_3206_483-537					-1,671	1,57E-02
172	AFE_3207_413-467	<b>atpF*</b>	ATP sintasa F0 subunidad B	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,793	4,10E-03
	AFE_3207_85-139					-1,681	4,10E-03
173	AFE_3208_192-246	<b>atpE*</b>	ATP sintasa F0 subunidad C	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,438	7,25E-03
	AFE_3208_65-119					-1,768	7,02E-03

174	AFE_3209_429-483	<b>atpB*</b>	ATP sintasa F0 subunidad A	Conversión y producción de energía	Fosforilación oxidativa	-1,313	1,35E-02
	AFE_3209_530-584					-1,172	3,24E-02
175	AFE_3246_227-281	<b>gph-2</b>	Fosfoglicolato fospfatasa	Predicción de funciones generales	Glioxilato y dicarboxilato metabolismo	-1,041	4,03E-02
	AFE_3246_630-684					-0,905	3,67E-02
176	AFE_3247_166-220	<b>rpe</b>	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Vía de la pentosa fosfato, Pentosa y glucuronato interconversiones, Fijación de carbono en microorganismos fotosintéticos, Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,157	1,50E-02
	AFE_3247_508-562					-1,025	6,35E-02
177	AFE_3250_851-905	<b>pgk</b>	Fosfoglicerato quinasa	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis/Gluconeogenesis, Fijación de carbono en organismos fotosintéticos, Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,035	4,09E-02
	AFE_3250_1152-1206					-1,054	5,52E-02
178	AFE_3251_858-912	<b>gap</b>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tipo I	Metabolismo y transporte de carbohidratos	Glicólisis/Gluconeogenesis, Fijación de carbono en organismos fotosintéticos, Carbono metabolismo, Biosíntesis de aminoácidos.	-1,171	1,52E-02
	AFE_3251_958-1012					-1,078	2,78E-02





**Anexo 7. Análisis de los cambios de niveles de ARNm de los genes *afel*, *afeR*, *zwf*, *galU*, *wcaA* y AFE\_1339 en células sésiles de *At. ferrooxidans*<sup>T</sup> en presencia y ausencia de tetrazol.** El ARN total empleado para estos análisis fue extraído de células sésiles crecidas en medio 9K modificado con perlas de azufre, con y sin tetrazol (5 μM), con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  cel/ml. DMSO, control biótico sin AHL. El tiempo de incubación para todos los cultivos fue de tres días. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada condición (con y sin tetrazol). La barra representa la desviación estándar.

**ANEXO 8.** Genes que presentan una secuencia palindrómica que pertenece a una de las cajas *afe*. Se indica la secuencia de la caja *afe* 2 y de la caja *afe* 1 en rojo y celeste, respectivamente. Se indica la posición respecto al sitio de inicio de traducción de la secuencia común en la región promotora de cada gen.

ORF	GEN/DESCRIPCIÓN PROTEÍNA	SECUENCIA 5' - 3'	POSICIÓN	
AFE_0572	Proteína hipotética	CTTGTCAG	-27	-20
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		
AFE_0707	Proteína hipotética	TTGACA-----CC	-76	-60
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		
AFE_1418	Proteína hipotética	TTGACAA	-63	-57
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		
AFE_1853	Proteína hipotética	TTGACAAGCT-----CTTGA	-66	-46
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		
AFE_1998	<i>orf3</i> / Proteína hipotética	TGTCAG	-76	-71
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		
AFE_2209	Regulador transcripcional de la familia TetR	TTGACAAG	-39	-32
	Secuencia de las cajas AFE	TTGACAAGCTGTCAACCTTGACAGCTTGTCAG		

## ANEXO 9

**Characterization of the quorum sensing regulon in  
*Acidithiobacillus ferrooxidans*.**

S. Mamani<sup>1,2a</sup>, Y. Denis<sup>3b</sup>, D. Moinier<sup>2c</sup>, M. Sabbah<sup>4d</sup>, L. Soullère<sup>4e</sup>, Y. Queneau<sup>4f</sup>, V. Bonnefoy<sup>2g</sup> and N. Guilian<sup>1h</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Comunicación Bacteriana, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. <sup>2</sup>Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille Université, IMM, LCB UMR 7283, Marseilles, France. <sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique and Aix-Marseille Université, IMM FR3479, Marseilles, France. <sup>4</sup> Université Lyon 1, Institut National des Sciences Appliquées et Centre National de la Recherche Scientifique, ICBMS UMR 5246, Lyon, France.  
Email: <sup>a</sup>skmamani@uc.cl, <sup>b</sup>ydenis@imm.cnrs.fr, <sup>c</sup>moinier@imm.cnrs.fr, <sup>d</sup>mohamadsabbah7@hotmail.com, <sup>e</sup>laurent.soulere@insa-lyon.fr, <sup>f</sup>Yves.Queneau@insa-lyon.fr, <sup>g</sup>bonnefoy@imm.cnrs.fr, <sup>h</sup>nguilian@uchile.cl

**Keywords:** Quorum sensing, acyl homoserine lactone, biofilm, Tetrazol, fluorescence and electronic microscopy, real-time PCR.

**Abstract.** Bioleaching is the solubilization of metals from ores by microorganisms. This process is more efficient than conventional methods in the metal recovery from low grade ores while decreasing the operating cost and the environmental impact. Among the bioleaching bacteria, the Gram-negative chemolithoautotrophic acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* has the ability to adhere to mineral surface and to form biofilm. The genes involved in the production of this biofilm are controlled by a cellular communication system called Quorum Sensing (QS). The QS occurs mainly through the production of acyl homoserine lactones (AHLs). A functional QS system has been identified in *At. ferrooxidans* with an acyl synthase (AfeI) and a transcriptional regulator (AfeR). Here, our purpose is to characterize the quorum sensing regulon and particularly the genes involved in biofilm formation in *At. ferrooxidans*. This has been done by cell adhesion experiments comparing *At. ferrooxidans* grown with or without Tetrazol, an AHL analogue that activates the cell adhesion to mineral surface. The second step has been to compare the expression of some genes predicted to be involved in the QS regulon in *At. ferrooxidans* grown in the presence/absence of Tetrazol using real-time PCR. These two different strategies are expected to give insight on the moment at which the *At. ferrooxidans* QS regulon is switched on. The formation of biofilm could improve the bioleaching operation and therefore the understanding of the QS regulon is of primordial importance.

## Introduction

In Chile, most of the copper is extracted by processes such as pyrometallurgy and bioleaching. In this case, the dissolution of ores is mediated by microorganisms that obtain energy at the expense of the oxidation of sulfur and iron present in sulfidic ores [1]. Bioleaching is a beneficial procedure that promotes a higher percentage of metal recovery from low grade ores whereas it decreases the operating cost and the environmental impact [2].

Among the bacteria present within the bioleaching consortium, the Gram-negative chemolithoautotrophic acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*, oxidizes reduced sulfur compounds as well as ferrous iron and develops biofilms on mineral surfaces. This biofilm, which allows adhesion to the solid surfaces and protects the cell of surrounding adverse conditions, is mainly composed of extracellular polymeric substances (EPS) synthesized and secreted by the microorganisms themselves [3].

Several experimental evidences suggest that the genes involved in biofilm formation are regulated in Gram-negative bacteria by quorum sensing (QS) [4]. This bacterial communication system is mediated by the production and the release of an autoinducer (AI), which concentration increases with the microbial population density [5]. The bacteria can sense the AI accumulation in the culture medium, and therefore the population density, and respond by regulating the expression of several target genes (regulon) involved in different cellular processes, among which the EPS biosynthesis. The most studied AI-type molecules are the N-acyl homoserine lactones (AHLs).

Since the bacterial communication system regulated by AHLs is present in *At. ferrooxidans* ATCC 23270 and since the adhesion of this bacterium depends on the production of EPS, the QS system is likely involved in the regulation of the EPS biosynthesis [6]. In a previous study, we have shown that the QS system of *At. ferrooxidans* is linked to the biofilms formation since a more efficient adhesion to sulfur and pyrite has been observed when synthetic analogs of AHLs were added to the medium. Our main purpose is to characterize the QS regulon in *At. ferrooxidans* by functional genomics, and more particularly to identify the genes involved in biofilm formation. This will be done by analyzing the global expression of genes in *At. ferrooxidans* (transcriptomics) using Tetrazol as activator of the QS system [7]. The understanding of the adhesion of this bacterium to solid substrates is very important to control the bioleaching process.

## Material and Methods

**Bacterial strain and culture conditions.** *At. ferrooxidans* ATCC 23270 was grown at 30°C under oxic conditions (130 rpm) in modified 9K medium at pH 2.5 containing sulfur pills (50 g/l) as described previously [8].

**Cell adhesion assay.** *At. ferrooxidans* was grown in presence of sulfur ( $S^{\circ}$ ) coupons. These coupons were produced by heating elemental sulfur powder until melting; the liquid sulfur was poured on a cover glass, cooled, and sterilized by boiling in 9K basal salt medium. Coupons were added to cell cultures and extracted for microscopic observation [9]. Cells attached to sulfur coupons were coated in gold for electron microscopy.

**RNA extraction.** Total RNA of planktonic cell was extracted using a modified acid-phenol extraction method [10], including a preliminary TRIZOL® reagent (Invitrogen) extraction step.

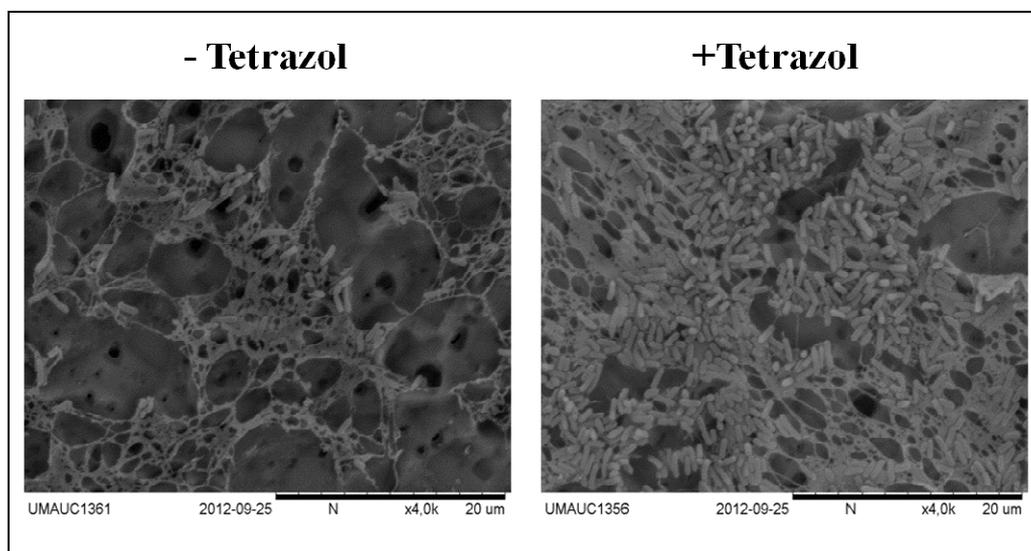
**Real-time PCR.** RT reactions were carried out as described previously [11].

## Results

### Tetrazol accelerates cellular adhesion to sulfur in *At. ferrooxidans*.

In previous experiments, we reported that *At. ferrooxidans* ATCC 23270 possesses a functional QS type AI-1 system capable of responding to different types of synthetic analogs of AHL [12]. To determine whether Tetrazol induces cell adhesion to the mineral surface, cell adhesion assays were performed and analyzed by electron microscopy.

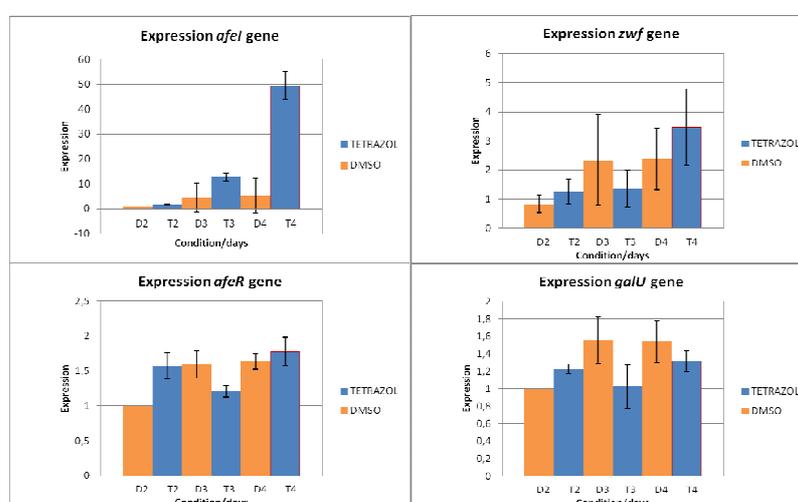
The sulfur coupons were stained after different days of incubation to visualize the biofilm formation process. The data obtained have shown that when *At. ferrooxidans* was grown in the presence of Tetrazol the cellular adhesion on the sulfur coupon surface was visible at day 3 compared to the cultures without Tetrazol (Fig. 1).



**Figure 1.** Photomicrographs of sulfur coupons obtained from *At. ferrooxidans* grown with or without Tetrazol (5  $\mu$ M). Sulfur coupons were obtained at day 3 during the growth of *At. ferrooxidans*. Coupons were observed by electron microscopy.

## Transcriptional analysis of some genes predicted to be involved in the QS regulon in *At. ferrooxidans* by real-time PCR.

The expression of some genes supposedly belonging to the QS regulon was analyzed by real-time PCR. Total RNA were prepared from planktonic cells of *At. ferrooxidans* grown in the presence or in the absence of Tetrazol. The *afeI* (AHLs synthase) gene was significantly upregulated in the presence of Tetrazol, (ii) *zwf* (involved in the level of glucose-6P, a precursor of the EPS) increased all along the growth and increased reproducibly in the presence of Tetrazol at day 4, (iii) *afeR* (transcriptional regulator) and *galU* (involved in EPS formation) were constitutively expressed in the presence of Tetrazol (Fig. 2).



**Figure 2.** Transcription analysis of *afeI*, *zwf*, *afeR* and *galU* by real-time PCR. RT reactions were carried out with 1µg of total RNA from *At. ferrooxidans* grown with or without Tetrazol (cultures with DMSO, the solvent in which the Tetrazol is dissolved). The samples were taken at different incubation times (2, 3 and 4 days).

## Conclusions

This study has shown that Tetrazol accelerated the adhesion of *At. ferrooxidans* cells to sulfur coupons. Real-time experiments indicated no significant effect of Tetrazol on the expression of *afeR* and *galU* in *At. ferrooxidans* planktonic cells in early exponential phase, while that of *afeI* and *zwf* genes were up-regulated, results that agree with the microarray experiments performed with NG7 AHL synthetic analogue [12]. We are currently studying the expression of these genes in sessile cells to determine when the QS mechanism is triggered. Our next future experiments will aimed to identify the genes belonging to the QS regulon by performing microarrays analysis on planktonic and sessile cells grown with or without Tetrazol. Furthermore, the transcriptional regulator AfeR will be heterologously produced in *Escherichia coli*, its binding site on DNA will be determined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and the genes predicted by bioinformatics analysis to have these sequences in their regulatory regions will be checked by EMSA.

**Acknowledgments.** This work was supported by CNRS and CONY CIT (PICS n° 5270), FONDECYT (1120295) and a scholarship for doctoral studies in Chile CONICYT 2009.

## References.

- [1] G. Rossi, Biohydrometallurgy, McGraw-Hill, New York, N.Y, 1990.
- [2] C.L. Brierley, Microbiological mining: Technology status and commercial opportunities, World Biotech. Rep. Vol. 1 (1984), p. 599.
- [3] B. Vu, M. Chen, R.J Crawford, and E.P. Ivanova, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation, Molecules Vol. 14 (2009) p. 2535.
- [4] T.R. De Kievit and B.H. Iglewski, Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms, Methods. Enzymol. Vol. 310 (1999) p. 117.
- [5] M.B. Miller and B.L. Bassler, Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. Vol. 55 (2001) p. 165.
- [6] C.Farah, M. Vera, D. Morin, D. Haras, C.A. Jerez and N. Guiliani, Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 71(2005) p. 7033.
- [7] L.M. Ruiz, S. Valenzuela, M. Castro, A. Gonzalez, M. Frezza, L. Soulère, T. Rohwerder, Y. Queneau, A. Doutheau, W. Sand, C.A. Jerez and N. Guiliani, AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. Hydrometallurgy Vol. 94 (2008) p. 133.
- [8] A.M. Amaro, D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano and C.A. Jerez, Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. Vol. 173 (1991) p. 910.
- [9] A. González, S. Bellenberg, S. Mamani, L. Ruiz, A. Echeverría, L. Soulère, A. Doutheau, C. Demergasso, W. Sand, Y. Queneau, M. Vera and N. Guiliani, AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 3 (2012) p. 4229.
- [10] H. Aiba, S. Adhya, B. de Crombrughe, Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. J. Biol. Chem. Vol. 256 (1981) p. 11905.
- [11] R. Quatrini, C. Appia-Ayme, Y. Denis, E. Jedlicki, D.S. Holmes and V. Bonnefoy, Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Genomics. Vol. 10 (2009) p. 394.
- [12] S. Mamani, Y. Denis, L. Soulère, A. Doutheau, Y. Queneau, C. Demergasso, V. Bonnefoy, N. Guiliani, Quorum Sensing in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, G. Qiu, T. Jiang, W. Qin, X. Liu, Y. Yang, H. Wang (Eds.), Biohydrometallurgy: Biotech key to unlock mineral resources value, Changsha, (2011) pp. 472-475.