



UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRAFICAS

**EFFECTO DE LAS VESICULAS DE MEMBRANA (MVs) EN LA MOTILIDAD  
DE BACTERIAS QUIMIOLITOAUTOTROFAS**

TESIS PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y  
OCEANOGRAFICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCION PARA OPTAR  
AL GRADO ACADEMICO TITULADO DE BIOLOGO MARINO

POR: MARIA IGNACIA SEGURA BIDERMANN

PROFESOR GUIA: DR. OSVALDO ULLOA GAETE

DIRECTOR DE TESIS: DR. MATIAS CASTRO GONZALEZ

Concepción - Chile

Abril - 2023

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

ESTE SEMINARIO DE TITULO HA SIDO REALIZAD EN EL DEPARTAMENTO DE OCEONOGRFIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRFICAS.

Profesor(a) Guía

\_\_\_\_\_X

Dr. Osvaldo Ulloa  
Universidad de Concepción, Concepción.

Director(a) de Tesis

\_\_\_\_\_X

Dr. Matías Castro  
Universidad de Concepción, Concepción.

Ha sido aprobada por la Siguiete Comisión Evaluadora:

\_\_\_\_\_X

Dr. Osvaldo Ulloa  
Universidad de Concepción, Concepción.

\_\_\_\_\_X

Dr. Marcelo Gutiérrez  
Universidad de Concepción, Concepción.

Jefe de Carrera

\_\_\_\_\_X

Dr. Ariel Valenzuela  
Universidad de Concepción, Concepción.

## **DEDICATORIA**

A mis padres ya que fueron las personas encargadas de formarme para alcanzar todos mis objetivos que me he propuesto día a día, con buenos sentimientos, hábitos y valores, por darme motivación, aliento y fuerza para seguir adelante sin decaer, por el constante apoyo y cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Matías Castro, que con su constante ayuda se logró el término del presente trabajo, que durante este largo camino siempre estuvo a mi lado guiándome y apoyándome en cada momento que fui desarrollando esta tesis, la que fue realizada con dedicación y constancia.

Al profesor Osvaldo Ulloa que con su ayuda apoyo en la realización del trabajo.

A Marcela Montoya por su constante compañía y apoyo en el laboratorio.

A mis amigos más cercanos, a mi querida mejor amiga Camila Marchant, también Alexandra Pereira, Camila Álvarez, Celeste Parra, Jimena González y a Nicolas Cruces, por el constante apoyo y fuerzas para lograr mis objetivos.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>5</b>
1.1. Suelos sulfatados Ácidos (ASS) .....	5
1.2. Rol de los acidithiobacilli en la oxidación de sustratos sólidos y fenotipos asociados .....	7
1.3. Motilidad flagelar bacteriana.....	9
1.4. Vesículas de membrana bacterianas (MVs).....	11
1.5. Hipótesis.....	13
1.6. Objetivos .....	14
1.6.1. Objetivos generales .....	14
1.6.2. Objetivos específicos .....	14
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>14</b>
2.1. Cepas y medios de cultivo líquidos .....	14
2.2. Estandarización del ensayo de motilidad tipo <i>swarming</i> en placas de medio semisólido .....	15
2.3. Evaluación del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la motilidad tipo <i>swarming</i> de los acidithiobacilli.....	15
2.4. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM) .....	16
2.5. Evaluación de la colonización bacteriana en el medio semisólido	16
2.6. Análisis estadístico .....	16
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Estandarización de condiciones del medio semisólido....	17

3.2.	Caracterización de la motilidad <i>swarming</i> en miembros de la clase <i>Acidithiobacillia</i> .....	18
3.2.1.	Motilidad <i>swarming</i> en <i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756 .....	19
3.2.2.	Motilidad <i>swarming</i> en <i>Acidithiobacillus albertensis</i> DSM 14366 .....	21
3.2.3.	Patrones de motilidad en <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	23
3.3.	Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en los <i>Acidithiobacillus</i> .....	24
3.3.1.	Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en <i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756 .....	24
3.3.2.	Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en <i>Acidithiobacillus albertensis</i> DSM 14366 .....	29
3.3.3.	Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	36
4.	<b>DISCUSION</b> .....	41
4.1.	Patrones de motilidad bacteriana en los <i>Acidithiobacillus</i> .....	41
4.2.	Efecto en la motilidad con PBS y vesículas de membrana (MVs) en los <i>Acidithiobacillus</i> .....	44
5.	<b>CONCLUSION</b> .....	46
6.	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	48
7.	<b>MATERAIL COMPLEMENTARIO</b> .....	54

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1:</b> Distribución global de los suelos de sulfatos ácidos (ASS).....	6
<b>Figura N°2:</b> Modelo del flagelo bacteriano - estructura y montaje.....	10
<b>Figura N°3:</b> Diferentes rutas conducen a la formación de distintos tipos de vesículas de membrana (MVs) .....	12
<b>Figura N°4:</b> Microscopia electrónica de transmisión (TEM) de los acidithiobacilli en medio semisólido de cepas de cultivo en medio semisólido de 0,07% .....	18
<b>Figura N°5:</b> Tipos de fenotipos de motilidad <i>swarming</i> en <i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756.....	20
<b>Figura N°6:</b> Tipos de fenotipos de motilidad <i>swarming</i> en <i>Acidithiobacillus albertensis</i> DSM 14366.....	22
<b>Figura N°7:</b> Tipos de fenotipo de la motilidad <i>swarming</i> en <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	23
<b>Figura N°8:</b> Evaluación 1, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. caldus</i> ATCC51756.....	25
<b>Figura N°9:</b> Evaluación 2, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. caldus</i> ATCC51756... ..	26
<b>Figura N°10:</b> Evaluación 3, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. caldus</i> ATCC51756... ..	28
<b>Figura N°11:</b> Evaluación 1, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. albertensis</i> DSM 14366.....	30
<b>Figura N°12:</b> Evaluación 2, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. albertensis</i> DSM 14366.....	31
<b>Figura N°13:</b> Evaluación 3, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. albertensis</i> DSM 14366.....	33
<b>Figura N°14:</b> Evaluación 4, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. albertensis</i> DSM 14366.....	35
<b>Figura N°15:</b> Evaluación 1, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	36

<b>Figura 16.</b> Evaluación 2, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	38
<b>Figura 17.</b> Evaluación 3, efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 .....	40

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1:</b> Preparación de placas semisólidas .....	17
-----------------------------------------------------------	----

## INDICE DE ANEXOS

<b>Figura 7.1.1.</b> Gráficos de curvas de crecimiento bacteriano en medio líquido para los 3 fenotipos A, B y C de <i>A. caldus</i> ATCC 51756 .....	54
<b>Figura 7.1.2.</b> Velocidad promedio para los fenotipos A, B y C de <i>A. caldus</i> ATCC 51756... ..	54
<b>Figura 7.1.3.</b> Fenotipo 1, total de réplicas de <i>A. caldus</i> ATCC 51756 de la evaluación 1.....	55
<b>Figura 7.1.4.</b> Fenotipo 2, total de réplicas de <i>A. caldus</i> ATCC 51756 de la evaluación 2... ..	55
<b>Figura 7.1.5.</b> Fenotipo 3, total de réplicas de <i>A. caldus</i> ATCC 51756 de la evaluación 3.....	56
<b>Figura 7.1.6.</b> Gráficos de curvas de crecimiento bacteriano en medio líquido para los 2 fenotipos A y B de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 .....	56
<b>Figura 7.1.7.</b> Velocidad promedio para cada fenotipo A y B de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 .....	57
<b>Figura 7.1.8.</b> Fenotipo 1, total de réplicas de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 de la evaluación 1.....	57
<b>Figura 7.1.9.</b> Total de réplicas de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 de la evaluación 2.....	58
<b>Figura 7.1.10.</b> Total de réplicas de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 de la evaluación 3.....	58
<b>Figura 7.1.11.</b> Total de réplicas de <i>A. albertensis</i> DSM 14366 de la evaluación 4.....	59
<b>Figura 7.1.12.</b> Gráfico de curva de crecimiento bacteriano en medio líquido para el fenotipo de <i>A. thiooxidans</i> ATCC19377 .....	59

<b>Figura 7.1.13.</b> Velocidad promedio para el fenotipo de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377...	60
<b>Figura 7.1.14.</b> Fenotipo 1, total de réplicas de <i>A. thiooxidans</i> ATCC19377 de la evaluación 1.....	60
<b>Figura 7.1.15.</b> Total de réplicas de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 de la evaluación 2.....	61
<b>Figura 7.1.16.</b> Total de réplicas de <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 de la evaluación 3.....	61

## RESUMEN

Los suelos sulfatados ácidos (ASS) son suelos altamente ácidos y ricos en sulfatos, estos representan una amenaza ambiental y para la salud humana debido a la producción de ácido y liberación de metales, los contaminan no solo los suelos, sino que también aguas subterráneas.

Los ASS se pueden encontrar en zonas costeras como en arroyos, ríos y estuarios, en donde se les conoce como suelos sulfatados ácidos costeros (CASS), ocasionando enfermedades y mortandad en peces.

La formación de ASS y CASS ocurre cuando los sulfuros metálicos presentes en los suelos entran en contacto con el aire y se oxidan, liberando los iones metálicos y produciendo ácido sulfúrico.

Este fenómeno es catalizado por el metabolismo bacteriano quimiolitotrófico de bacterias azufre-oxidantes, las que obtienen energía mediante la oxidación de distintos compuestos azufrados. Las bacterias del género *Acidithiobacillus* (los acidithiobacilli) participan particularmente en la oxidación de sulfuros metálicos. Se ha reconocido que la colonización de las superficies del sustrato por parte de estas bacterias se relaciona directamente con la oxidación del mineral y con la producción de ácido.

Una manera de colonizar la superficie del sustrato es la formación de biopelículas, lo que implica la producción de una matriz extracelular. Las vesículas de membrana (MVs), son estructuras esféricas compuestas por lípidos y proteínas que se forman a partir de la membrana celular de las bacterias. Recientemente, se han encontrado MVs, en las biopelículas de las bacterias del género *Acidithiobacillus*, y su rol está siendo investigado actualmente.

Otra forma de colonización bacteriana de superficie es la motilidad tipo *swarming*, la que depende de la presencia de flagelo y permite el desplazamiento multicelular coordinado sobre medios semisólidos. No obstante, el *swarming* de

los acidithiobacilli es prácticamente desconocido hoy en día, así como también lo es el efecto de las MVs sobre este tipo de colonización de superficies.

En esta tesis, se construyó un medio semisólido adecuado y se demostró que las especies de *Acidithiobacillus* (*A. caldus*, *A. albertensis* y *A. thiooxidans*) son capaces de moverse mediante *swarming* sobre él. Se observó que diferentes inóculos producen distintos patrones de *swarming*.

Además, se evaluó el efecto de las MVs obtenidas de *A. caldus* en el *swarming* de estas 3 especies. A través de un análisis estadístico, se comparó la colonización de las poblaciones inoculadas con y sin MVs y se observó que las MVs aumentaron la coordinación y velocidad de movimiento de las células de *A. caldus* solo en uno de los 3 fenotipos de *swarming* mostrado por esta especie.

Estos hallazgos son relevantes ya que proporcionan la primera evidencia del efecto de las MVs bacterianas en la motilidad *swarming*, lo que podría ser importante para la comprensión de la colonización bacteriana y la comunicación intercelular. Finalmente, se propone que este efecto pudiese ser debido a la entrega de proteínas flagelares desde las MVs hacia las células receptoras.

## ABSTRACT

Sulfate Acid Soils (ASS) are highly acidic and sulfate-rich soils that represent an environmental and human health threat due to the production of acid and release of metals, which contaminates not only the soils but also groundwater. ASS can be found in coastal areas such as streams, rivers, and estuaries, where they are known as Coastal Acid Sulfate Soils (CASS), causing diseases and fish mortality.

The formation of ASS and CASS occurs when metallic sulfides present in soils come into contact with air and oxidize, releasing metal ions and producing sulfuric acid. This phenomenon is catalyzed by the chemolithoautotrophic bacterial metabolism of sulfur-oxidizing bacteria, which obtain energy by oxidizing various sulfur compounds. Bacteria belonging to *Acidithiobacillus* genus (acidithiobacilli) participate particularly in the oxidation of metallic sulfides. It has been recognized that the colonization of the substrate surfaces by these bacteria is directly related to the mineral oxidation and acid production.

One way to colonize the substrate surface is by forming biofilms, which involve the production of an extracellular matrix. Membrane vesicles (MVs) are spherical structures composed of lipids and proteins that form from the cell membrane of bacteria. Recently, MVs have been found in the biofilms of *Acidithiobacillus* bacteria, and their role is currently being investigated.

Another way of bacterial surface colonization is swarming motility, which depends on the presence of flagella and allows coordinated multicellular movement on semi-solid media. However, the swarming of acidithiobacilli is practically unknown today, as is the effect of MVs on this type of surface colonization.

In this thesis, a suitable semi-solid medium was constructed, and it was demonstrated that *Acidithiobacillus* species *A. caldus*, *A. albertensis*, and *A. thiooxidans* are capable of swarming on it. It was observed that different inocula produce different swarming patterns. In addition, the effect of MVs obtained from *A. caldus* on the swarming of these three species was evaluated. Through statistical analysis, the colonization of inoculated populations with and without

MVs was compared, and it was observed that MVs increased the coordination and speed of movement of *A. caldus* cells only in one of the three swarming phenotypes shown by this specie.

These findings are relevant because they provide the first evidence of the effect of bacterial MVs on swarming motility, which could be important for understanding bacterial colonization and intercellular communication. Finally, it is proposed that this effect may be due to the delivery of flagellar proteins from MVs to recipient cells.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Suelos de sulfato ácidos (ASS)

Los suelos son una capa que recubre la superficie del planeta utilizada por los humanos para actividades elementales que incluyen la producción de alimentos, la extracción de agua potable y la construcción de infraestructura (FAO, 2000). Las regiones costeras junto con algunas áreas del interior, por ejemplo, en Australia, América del Norte y del Sur, Europa, Asia y África abarcan millones de hectáreas de potenciales suelos sulfatados ácidos (PASS) que contienen depósitos ricos en sulfuros metálicos (Boman et al., 2010). Los PASS son convertidos en verdaderos suelos sulfatados ácidos (ASS) a través de reacciones abióticas que implican la producción de ácido. Una vez que se excede la capacidad amortiguadora del suelo, la disminución del pH alcanza valores por debajo de 4 (Yli-Halla et al., 2006). Estos suelos están ampliamente distribuidos en regiones costeras, donde se denominan “coastal acid sulfate soil” (CASS). Hay dos entornos costeros principales en los que se forman sedimentos de pirita. El primero y más dominante es una tierra baja salina que incluye marismas y manglares (Pons y Van Breeman, 1982). El segundo es un ambiente sedimentario inferior de estuarios, ríos, lagos y arroyos salinos y salobres. Se estima que existen 24 millones de hectáreas de suelos sulfatados ácidos en el mundo (Muñoz PA y Muñoz PL, 2005) (figura 1). Los países mayormente afectados en América del Sur por este tipo de suelos son Brasil (1.200.000 ha) y Venezuela (2.000.000 ha) (FAO, 2000).



**Figura 1. Distribución global de los suelos de sulfatos ácidos (ASS).** Se distribuyen en tierras bajas de las costas y zonas continentales templadas (Países bajos, Alemania); costas tropicales de Sur-Asia (Indonesia, Vietnam, Tailandia) y Oceanía (Australia); Oeste de África (Senegal, Guinea, Gambia, sierra Leona, Liberia) y a lo largo de las costas noreste de América como en Brasil, Guayanas, Venezuela y Colombia (Tomado directamente de Ljung, K, 2009).

Los ASS conllevan un gran riesgo, ya que liberan soluciones cargadas de metales (por ejemplo, Ni, Cd, Al y Zn) desde el mineral y producen ácido sulfúrico. Estas sustancias tóxicas pueden filtrarse fuera del perfil del suelo con la lluvia y entrar en las vías fluviales y subterráneas cercanas, provocando mortandad de peces a gran escala, daño a la infraestructura debido a la corrosión del hormigón y el acero, y producir un gran daño para la salud humana (Cook et al., 2000; Fältmarsch et al., 2008). Se han sugerido muchos enfoques diferentes para minimizar los efectos negativos del drenaje de los ASS, pero neutralizar la acidez producida rara vez es factible debido a la enorme cantidad de cal necesaria (Wilson y col., 1999). Desde el punto de vista económico, la generación de ASS también es relevante. Por ejemplo, en Australia, se estimó un costo de \$62 millones de pesos australianos (\$42 millones de USD) en cal para neutralizar un área de 700 ha (Palko y Yli-Halla, 1993).

Los ASS se forman cuando sedimentos marinos anóxicos o marismas saladas ricos en pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y otros sulfuros metálicos entran en contacto con el oxígeno. Esto puede ocurrir en diversos ambientes naturales y antropogénicos que contienen minerales expuestos al oxígeno, generando uno de los problemas ambientales más graves que enfrentamos a nivel mundial. Los ASS se producen por son fenómenos naturales, tales como la baja de mareas y la elevación de la tierra isostática, así como también por razones antropogénicas como drenajes de suelos por fines industriales y la exposición de sulfuros metálicos por maquinaria agrícola (Dear et al., 2002, Dent, 1986). Un paso clave en la generación de los ASS es la catálisis de la oxidación de los sulfuros metálicos por medio del metabolismo bacteriano quimiolitotótrofo.

## **1.2. Rol de los acidithiobacilli en la oxidación de sustratos sólidos y fenotipos asociados**

Diversos microorganismos acidófilos han sido identificados en los ASS y en los CASS (Ling Y-C, 2015). Las bacterias acidófilas quimiolitotróficas que obtienen energía a través de la oxidación de sulfuros metálicos y otros compuestos inorgánicos ricos en azufre (RISCs) son impulsores clave en la formación de ASS (Hedrich S y Schippers A, 2021).

El género bacteriano *Acidithiobacillus* (los acidithiobacilli) es considerado entre los microorganismos más importantes en la oxidación de sulfuros metálicos y, en consecuencia, han sido el más estudiados hasta ahora (Moya-Beltrán et al., 2021). Son bacterias Gram-negativas que obtienen energía oxidando RISCs tales como sulfuros metálicos (pirita), azufre elemental, tiosulfato y tetratioato, siendo el subproducto final de oxidación el ácido sulfúrico. Por tanto, todos ellos también son acidófilos extremos, creciendo a valores de pH por debajo de 3. De forma importante, algunos miembros del género pueden, además de oxidar RISCs, oxidar ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Una característica distintiva

de los acidithiobacilli es la colonización de los sustratos sólidos, proceso que implica dos fenotipos: el unicelular/motil y el multicelular/adherido.

La mayoría de los *Acidithiobacillus* son capaces de desplazarse utilizando un aparato flagelar controlado por un sistema de quimiotaxis (Castro et al., 2017; Edwards et al., 2000; Meyer et al., 2002), el que eventualmente guía a la célula individual hacia sitios de adherencia sobre los sustratos sólidos como imperfecciones, fisuras y surcos de (Edwards et al., 2001; Bellenger et al., 2012). Tal como en otras bacterias, se sugiere que el primer contacto célula-superficie ocurre mediante adhesinas de membrana, incluyendo estructuras del sistema flagelar (como el filamento mismo).

La adherencia celular a la superficie permite el desarrollo de estructuras multicelulares llamadas biopelículas (Vera et al., 2013), las que tienen ventajas en comparación con las células individuales, tales como, retención las enzimas extracelulares en una matriz, por ejemplo, proporcionando un sistema de digestión externo, retención de agua y protección contra la deshidratación (falta de agua, concentración de sal), tolerancia mejorada a desinfectantes, biocidas y otros estresores, también mejora de la comunicación intercelular (señalización célula-célula), regulación de la síntesis de la matriz, la separación y los factores de virulencia, entre otros, facilitación de la transferencia horizontal de genes mediante conjugación, transducción y transformación, y el comportamiento colectivo y coordinado (regulado por moléculas señalizadoras) (Toyofuku et al., 2018). Las células adheridas a sulfuros metálicos tienden a formar biopelículas de monocapas (González et al., 2012; Bellenberg et al., 2014), mientras que sobre el azufre elemental forman estructuras un poco más sofisticadas, que consisten en unas pocas capas de células (Castro et al., 2015).

La disolución de minerales se ha relacionado positivamente con la colonización de la superficie del sustrato y la formación de biopelículas de los acidithiobacilli (González, 2012). Es conocido que la adherencia de estas bacterias al sustrato

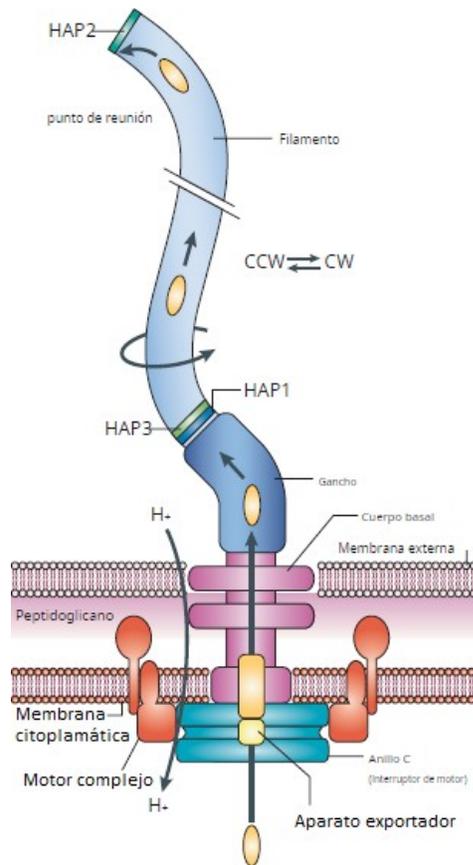
depende de la producción de una matriz extracelular (ECM) la que proporciona una interfase entre la célula y el mineral donde el sustrato es oxidado por complejos proteicos de membrana (Gehrke T, 1998). La ECM de los acidithiobacilli consiste en azúcares, proteínas y lípidos (Kearns B.D, 2010). Recientemente, se han identificado Vesículas de Membrana (MVs) como componentes importantes de la ECM de *Acidithiobacillus*, sugiriéndose un rol en la adherencia al sustrato (Rossonni et al., manuscrito en preparación).

A pesar de estos esfuerzos, nuestro conocimiento sobre los procesos determinantes en la colonización del sustrato, tales como la motilidad flagelar y las MVs de los acidithiobacilli, es tremendamente limitado.

### **1.3. Motilidad flagelar bacteriana**

La motilidad flagelar es un mecanismo bacteriano clave para encontrar y colonizar nuevos nichos, permitiendo además la adherencia celular sobre sustratos sólido y el desarrollo de biopelículas.

El flagelo es un organelo de locomoción ampliamente utilizado en bacterias. Presenta tres subestructuras: el cuerpo basal, que ancla la estructura en la envoltura celular y contiene el motor; el filamento, que tiene aproximadamente 20 nm de diámetro y se extiende a lo largo de varias longitudes celulares, actuando como hélice; y el gancho, es el que conecta el cuerpo basal y el filamento. El cuerpo basal consta de una varilla con una serie de anillos (figura 2). La rotación del flagelo es impulsada mediante la fuerza protón-motriz, o rara vez en algunos organismos marinos y alcalófilos, por un gradiente de sodio. En muchas bacterias, la dirección de la rotación flagelar está controlada por un sistema quimiotáctico de transducción de señales que monitorea el medio exterior (Jarrell K y McBride M, 2008).



**Figura 2. Modelo del flagelo bacteriano - estructura y montaje.** El flagelo bacteriano consta de tres partes: el filamento, el gancho y el cuerpo basal complejo. El flujo de protones a través de la membrana citoplásmica impulsa la rotación del rotor y el filamento. CCW, en sentido antihorario; CW, en el sentido de las agujas del reloj; HAP, proteína asociada al gancho (modificado de Jarrell K, 2008).

El aparato flagelar les permite desarrollar dos tipos de motilidad. La motilidad tipo *swimming* implica el movimiento de las células individuales en un medio líquido, mientras que la motilidad *swarming* es llevada a cabo por una población de células que en forma coordinada se desplazan sobre una superficie hidratada (Kearns B, 2010). Además de las biopelículas, la motilidad tipo *swarming* corresponde a otro tipo de colonización de superficies tremendamente importante

en diversas bacterias. La motilidad tipo *swimming* ha sido reconocida en varios miembros de la clase *Acidithiobacillia*, no obstante, a la fecha de hoy, el fenómeno de *swarming* no ha sido estudiado en los Acidithiobacilli, así como tampoco la influencia de los componentes de la ECM en este proceso de colonización.

La motilidad flagelar aparte de depender de apéndices celulares como el flagelo para su desplazamiento necesita de agentes químicos de superficie (surfactante), que son secretados por las células que actúan como lubricante para reducir la tensión superficial (Kearns B, 2010).

Recientemente, se ha comenzado a caracterizar la motilidad flagelar de los Acidithiobacilli. La mayoría de las especies tienen un flagelo polar, sin embargo, es preciso notar que algunas cepas han perdido la capacidad de sintetizar su propio flagelo (*A. ferrooxidans* ATCC 23270), mientras otras son capaces de ensamblar varios flagelos en un polo de la célula (lofótrico) (*A. albertensis* DSM 14366).

El aparato flagelar de dos especies de *Acidithiobacillus*, *A. albertensis* y *A. thiooxidans*, se ha comparado detalladamente a nivel genómico (Castro et al., 2017). No obstante, debido a la tremenda dificultad de ensayar fenotípicamente la motilidad de estas bacterias, solo se ha observado que el movimiento tipo *swarming* de *A. albertensis* es más rápido que el de *A. thiooxidans* (Gómez R, 2018)

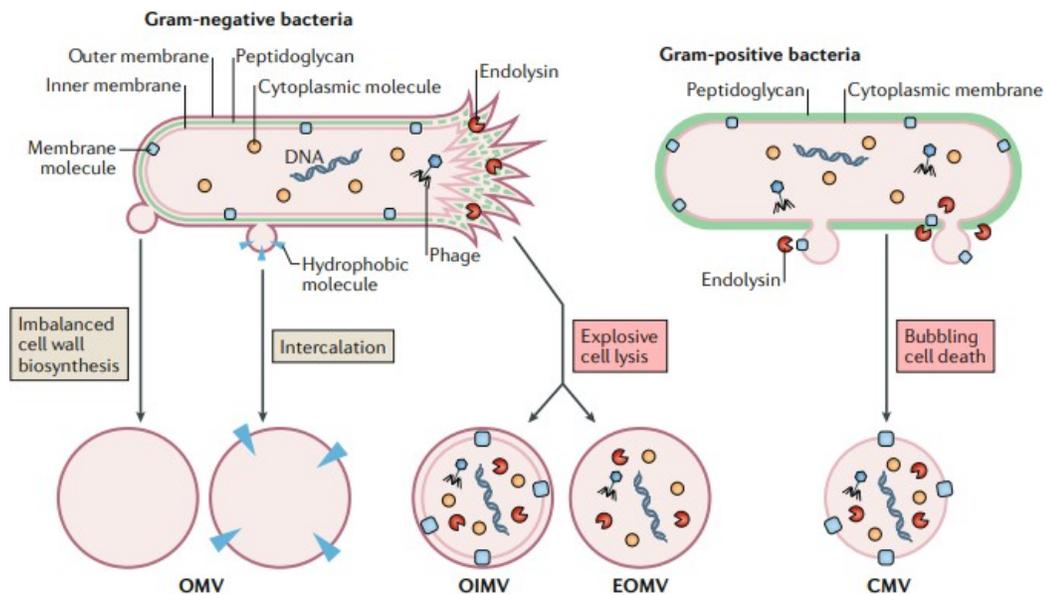
#### **1.4. Vesículas de membrana bacterianas (MVs)**

Las vesículas de membrana (MVs) son proteoliposomas de tamaño nanométrico (20 a 400 nm de diámetro aproximadamente) que se desprenden de la envoltura celular de las bacterias (Amano A et al., 2010) (figura 3). Recientemente, numerosos estudios reportan diferentes papeles de las MVs tales como interacción con otras células (procariotas y/o eucariotas) (Kuehn and Kesty, 2005), liberación de toxinas (Ismail et al., 2003), modulación del sistema inmune

(Klieve et al., 2005), transporte de moléculas de señalización entre células (Masburn-Warren y Whiteley, 2006), y la formación de biopelículas (McBroom y Kuehn, 2007).

Las MVs participan y afectan diversos procesos biológicos (Schwechheimer C, 2015), son muy abundantes en ecosistemas naturales, tales como en sistemas marinos (Biller et al., 2014), así también en biopelículas microbianas, donde son un componente integral de la ECM, cumpliendo funciones estructurales y de protección frente a agentes tóxicos (Grande R, 2015).

Las MVs de bacterias Gram-negativas a menudo llevan componentes como LPS, proteínas de membrana externa y peptidoglicano (Schwechheimer C y Kuehn M, 2015). Sin embargo, diferentes análisis también han revelado la presencia de proteínas citoplasmáticas y de membrana interna (Choi et al., 2011; Elhenawy et al., 2014), así como algunos metabolitos citoplasmáticos dentro de las MVs (Pérez-Cruz et al., 2013; Berleman et al., 2014).



**Figura 3. Diferentes rutas conducen a la formación de distintos tipos de vesículas de membrana.** Las bacterias Gram-negativas tienen dos rutas principales para la formación de vesículas: formación de ampollas en la membrana externa y lisis celular explosiva. La endolisina también desencadena la "muerte celular burbujeante" en bacterias Gram-positivas, en las que da lugar a vesículas de membrana citoplasmática

(CMV). Las CMV pueden contener componentes citoplasmáticos y de membrana (tomado directamente de Toyofuku M, 2018).

El flujo de información molecular mediante el tráfico de MVs es un área de investigación relativamente poco explorada, por lo que muchos de los efectos de las MVs no han sido investigados. Recientemente, se ha demostrado que la producción de MVs es un fenómeno común en distintas especies de *Acidithiobacillus*. Particularmente, las MVs producidas por *Acidithiobacillus caldus* han sido caracterizadas a nivel proteómico sugiriendo un rol no solo estructural, sino que también en la comunicación celular, y colonización y oxidación del sustrato sólido (Rossoni et al., manuscrito en preparación).

Como modelo principal de este estudio se utilizó a *Acidithiobacillus caldus* debido a la disponibilidad de MVs purificadas desde cultivos de esta bacteria. Además, debido a existencia de antecedentes en *A. albertensis* y *A. thiooxidans*, estas especies también fueron incluidas en este trabajo. Las preguntas que se busca responder en esta tesis son:

¿Es la motilidad tipo *swarming* de los *Acidithiobacillus* afectada por MVs?

¿Cuál es el rol de las MVs en la motilidad tipo *swarming* de los *Acidithiobacillus*?

### **1.5. Hipótesis:**

Los acidithiobacilli son capaces de colonizar y desplazarse mediante *swarming*, proceso que es modulado por vesículas de membrana (MVs).

## 1.6. Objetivos

### 1.6.1. Objetivo general:

Caracterizar la motilidad tipo *swarming* en especies pertenecientes al género *Acidithiobacillus* y evaluar su respuesta a vesículas de membrana.

### 1.6.2. Objetivos específicos:

- I. Desarrollar un método para evaluar la motilidad tipo *swarming* en las especies *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus albertensis* y *Acidithiobacillus thiooxidans*.
- II. Evaluar, mediante el método implementado en el OE1, el efecto de las MVs en la motilidad tipo *swarming*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas y medios de cultivo líquidos

Se utilizaron las cepas *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756, *Acidithiobacillus albertensis* DSM 14366 y *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377. Las tres cepas fueron cultivadas en medio BART 1X. Se preparó un medio concentrado (50X) compuesto de 3,3 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; 22,5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,5 g KCL; 25 g  $\text{MgSO}_4$ ; 1,6 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0,71 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  por litro, y se diluyó con agua estéril a una concentración de 1X. Como fuente energética se utilizó el sustrato soluble tetrionato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ ) (0,15% p/v). El pH del medio de sales basales fue ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 2.8. Las bacterias fueron inoculadas a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml y se incubaron con agitación constante (120 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial tardía, a una temperatura de 40°C cuando se usó *A. caldus* ATCC 51756, y 30°C cuando se usó *A. albertensis* DSM 14366 y *A. thiooxidans* ATCC 19377. El crecimiento

bacteriano fue monitoreado mediante conteo celular en cámara de Neubauer observada por microscopía de contraste de fases con una magnificación de 400x (microscopio Zeiss AXIO).

## **2.2. Estandarización del ensayo de motilidad tipo *swarming* en placas de medio semisólido**

Para caracterizar la motilidad tipo *swarming* de estas cepas. Se desarrolló un medio semisólido para que permitiese el desplazamiento de las bacterias. Se realizaron diferentes ensayos en placa con distintas concentraciones, de 0,5%, 0,3%, 0,2%, 0,1% y de 0,07% del medio semisólido.

Las placas fueron inoculadas con cultivos bacterianos líquidos. Cuando estos alcanzaron la fase exponencial tardía ( $5 \times 10^8$  células/ml) 1 ml de cultivo fue centrifugado, separando las células del sobrenadante, el que fue retirado mediante micropipeta. Las células fueron resuspendidas en 20  $\mu$ l de medio fresco sin fuente energética y se inocularon 5  $\mu$ l, que contenía  $5 \times 10^7$  células, en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas en una estufa a temperaturas de 30°C o 40°C. La colonización bacteriana se monitoreó diariamente mediante un estereoscopio (LEICA EZ4 W) (10X) y se tomaron fotografías con una cámara (Canon Power Shot G12) a una distancia focal de 21,461 mm.

## **2.3. Evaluación del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la motilidad tipo *swarming* de los acidithiobacilli**

Se escogió el medio semisólido a una concentración adecuada la cual fuera los suficientemente firme, para que las bacterias no se filtren hacia abajo, y dure el tiempo de ensayo, pero suficientemente suave para que haya movimiento. Las placas se inocularon de forma similar a como se describió anteriormente con la variación de que una vez separado el sobrenadante de las células, estas fueron resuspendidas en 20  $\mu$ l medio fresco sin fuente energética, luego 10  $\mu$ l de este fueron mezcladas con 8  $\mu$ l de PBS (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino) y 10  $\mu$ l con 8  $\mu$ l de un extracto

de MVs (en PBS). Las MVs utilizadas en el estudio pertenecen a la especie *Acidithiobacillus caldus* y que fueron proporcionadas por la tesis de Magister de Stefano Rossoni.

#### **2.4. Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)**

A través de la microscopia de transmisión electrónica, se realizó la visualización de las células extraídas de las placas con medio semisólido, de cada cepa en estudio. Las células presentes en el borde de emigración fueron tomadas directamente de la placa de motilidad y fijadas en glutaraldehído a 0,5%. 10 µl de la suspensión fueron puestos en una grilla de cobre recubierta con carbón y teñidas con acetato de uranilo. Las células fueron observadas en un microscopio electrónico Philips Tecnai 12 (Biotwin), Unidad de Microscopía Avanzada (UMA), Universidad Católica de Chile).

#### **2.5. Evaluación de la colonización bacteriana en el medio semisólido**

Debido a la forma circular imperfecta de las colonias bacterianas, no se tomaron en cuenta medidas como los cálculos del área circular. Como medida de colonización se midió el diámetro total de la superficie colonizada por la bacteria y desde el borde interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo de motilidad a los tiempos seleccionados para cada ensayo. Las mediciones fueron realizadas usando el programa ImageJ.

#### **2.6. Análisis estadístico**

Para evaluar la diferencia entre el swarming con y sin MVs, las mediciones de colonización fueron sometidas a un análisis de T Student para muestras independientes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Estandarización del medio en placas de semisólido

Un medio semisólido adecuado para que ocurra *swarming* debe presentar una consistencia lo suficientemente blanda y húmeda para que el flagelo pueda rotar, pero, además, lo suficientemente firme para que se mantenga durante el tiempo del ensayo y para que las células no se filtren hacia el fondo de la placa.

Con el objetivo de seleccionar un medio con una consistencia adecuada, se construyeron medios basados en el medio de cultivo líquido habitual mezclado con diferentes cantidades del agente gelificante Phytigel, de la manera que lo muestra la tabla 1.3.1.

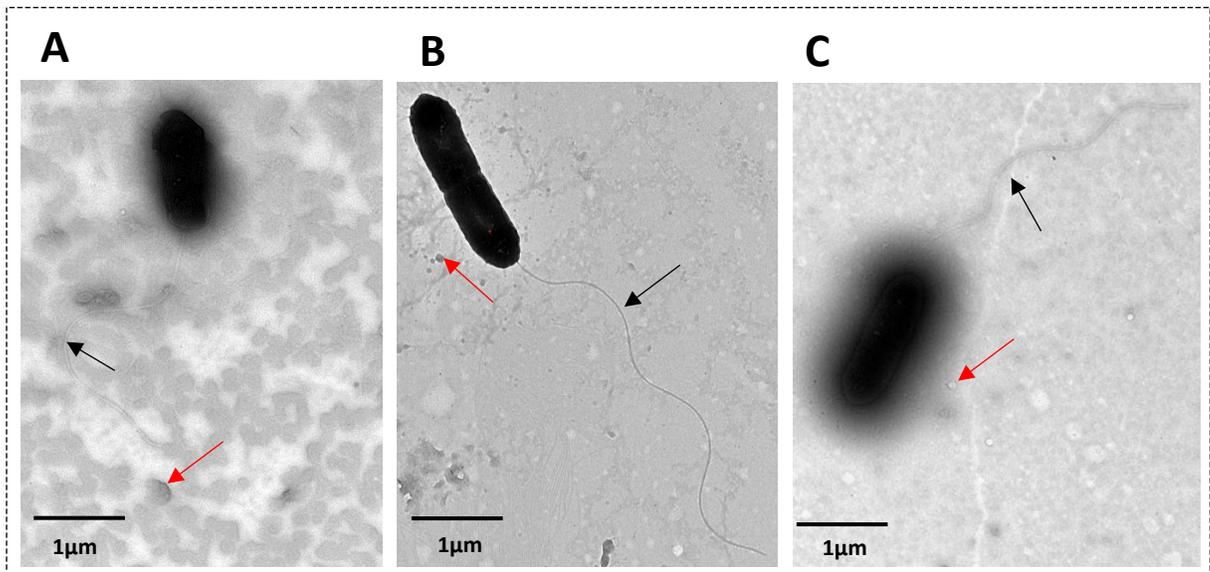
**Tabla 1.3.1. Preparación de placas semisólidas.**

<b>Concentración Final del medio semisólido</b>	<b>Volumen de Phytigel (1,8% p/v)</b>	<b>Volumen de agua</b>	<b>BART 50X</b>	<b>Tetrationato (K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) (1,5% p/v)</b>	<b>Volumen total (ml)</b>
<b>0,5%</b>	13,9 ml	7,1 ml	25 ml	4 ml	50ml
<b>0,3%</b>	8,3 ml	12,7 ml	25 ml	4 ml	50ml
<b>0,2%</b>	5,6 ml	15,4 ml	25 ml	4 ml	50ml
<b>0,1%</b>	2,8 ml	18,2 ml	25 ml	4 ml	50ml
<b>0,07%</b>	1,9 ml	19,1 ml	25 ml	4 ml	50ml

Los medios se inocularon con 5 µl de cultivo y se incubaron a una temperatura de 30°C o 40°C durante 10 a 20 días. Los patrones multicelulares de desplazamiento, que se observaron a través de un estereoscopio (figuras 5, 6 y 7). El mejor medio resultó ser el medio con 0,07% de Phytigel, ya que este duró el tiempo suficiente para desarrollar el ensayo, es lo suficientemente blando y húmedo para permitir el *swarming*, pero suficientemente firme para que las

células no se filtren al fondeo de la placa. Los medios con mayor porcentaje Phytigel no fueron lo suficientemente húmedos como para permitir que las células pudieran desplazarse en el medio.

Para confirmar la motilidad tipo *swarming* en este medio semisólido a la concentración de 0,07% se observó el flagelo en las células que componían el borde de migración mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (figura 4).



**Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los acidithiobacilli en medio semisólido de cepas de cultivo en medio semisólido de 0,07%. Muestras tomadas de placas de semisólido con tetrationato como fuente de energía. En A) *A. caldus* ATCC 51756, B) *A. albertensis* DSM 14366 y el C) *A. thiooxidans* ATCC 19377. Además del flagelo (flechas negras) se puede observar una densa matriz extracelular sobre las células y la presencia de MVs (flechas rojas). La barra representa 1 micrómetro.**

### **3.2. Caracterización de la motilidad *swarming* en miembros de la clase *Acidithiobacillia***

Usando el medio seleccionado anteriormente, se procedió a caracterizar la motilidad tipo *swarming* de 3 especies de *Acidithiobacillus*: *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756, *Acidithiobacillus albertensis* DSM 14366, *Acidithiobacillus*

*thiooxidans* ATCC 19377. El medio semisólido fue inoculado con células cosechadas desde cultivos líquidos y el desplazamiento fue monitoreado en los tiempos determinados mediante estereoscopio.

### **3.3. Motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756**

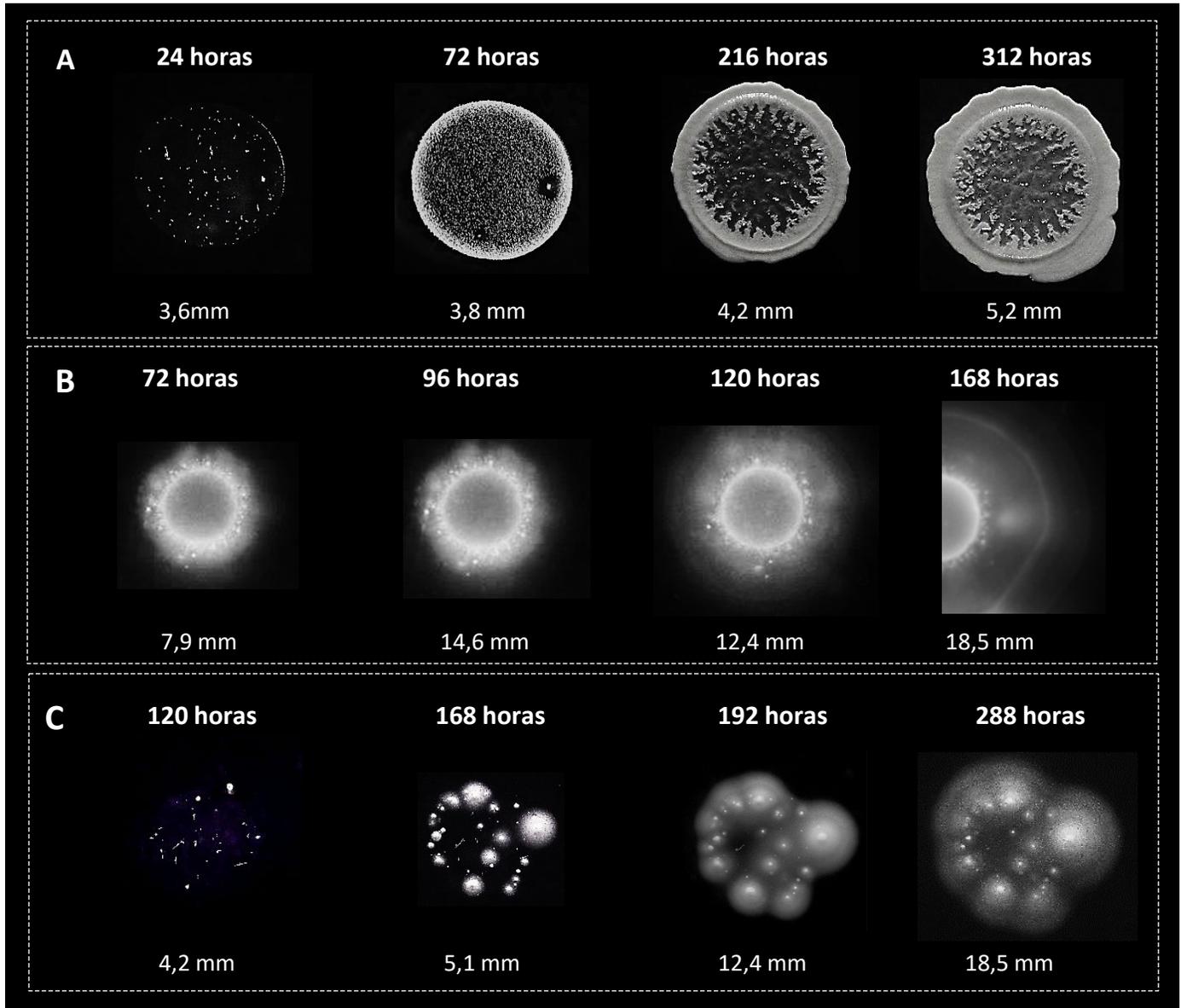
Se realizaron 3 ensayos de motilidad tipo *swarming* (A, B y C), cada uno utilizando células provenientes de cultivos independientes. La figura 4 muestra 1 de las 3 réplicas de cada uno de los ensayos. Las figuras suplementarias 7.1.3, 7.1.4 Y 7.1.5 muestran la evolución temporal de cada una de las 3 réplicas por ensayo.

Se observó que *A. caldus* ATCC 51756 presenta distintos fenotipos de desplazamiento en cada uno de los ensayos realizados, los cuales también se diferencian en el tiempo de duración del ensayo. En el ensayo A se siguieron las células durante 312 horas, al cabo de las cuales se apreció la formación de 1 anillo. Además de moverse hacia afuera, se observó que las células se desplazaron hacia el centro de la zona inoculada. La rugosidad de la colonia sugiere la formación de una biopelícula más que de motilidad *swarming*.

El fenotipo B muestra una migración descoordinada en primera instancia, seguida de la formación del primer anillo de motilidad, para luego desplazarse de manera coordinada hasta establecerse formando un segundo anillo. Este comportamiento de desplazamiento-establecimiento se repitió 4 veces, formando un total de 5 anillos, como se observa a las 168 horas transcurridas.

El fenotipo C muestra a las 168 horas la formación de pequeñas colonias dentro de la zona inoculada. El fenotipo C muestra, al principio, la formación de pequeñas colonias dentro de la zona inoculada. Cada una de ellas comienza a expandirse mediante *swarming*; sin embargo, la expansión no es simétricamente radial. De manera que el lado de las colonias que se ubica hacia el centro de la zona inoculada y está próximo a otras colonias avanza más lento que el lado que

está ubicado hacia el exterior de la zona de inóculo. Esto permite posteriormente que este borde de migración "rápido" forme el primer anillo de motilidad.



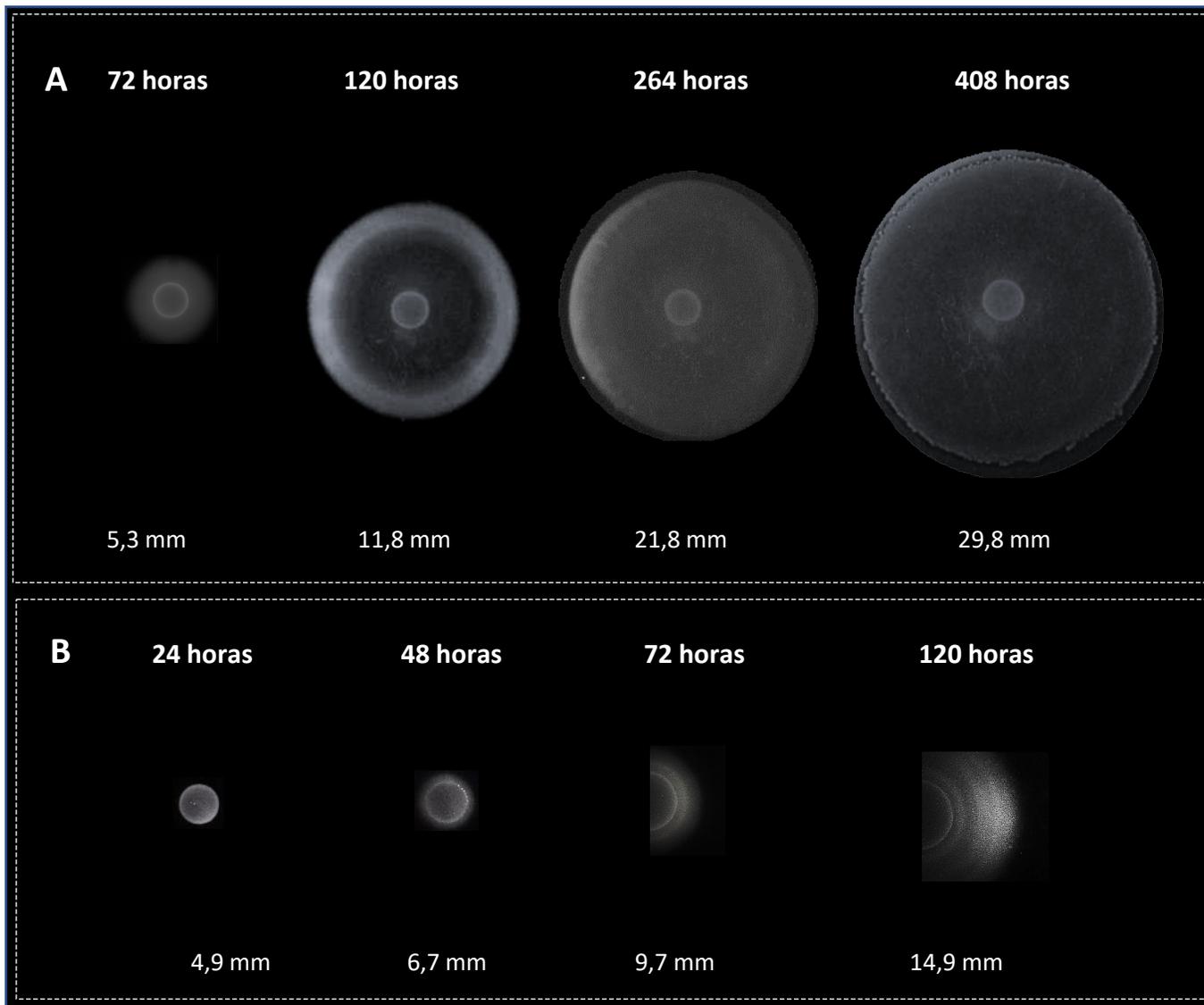
**Figura 5. Tipos de fenotipos de motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756.** La inoculación para cada uno de los fenotipos fue realizada en las placas con el medio semisólido a la concentración de 0,07% de Phytigel. El desplazamiento de las células se monitoreó a distintas horas, como se puede apreciar en la figura para cada uno de los fenotipos (A, B y C).

Debido a que se utilizó el mismo medio semisólido en los 3 fenotipos, las diferencias en los fenotipos pueden deberse a la concentración del inóculo celular inicial, (fenotipo A:  $6,9 \times 10^7$  cel; fenotipo B:  $6,3 \times 10^7$  cel; fenotipo C:  $8,8 \times 10^7$  cel) figura suplementaria 7.1.1.

#### **3.4. Motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus albertensis* DSM 14366**

Se realizaron 2 ensayos de motilidad A y B, cada uno utilizando células provenientes de cultivos independientes. La figura 6 muestra 1 de las 2 réplicas de cada uno de los ensayos. La figura suplementaria 7.1.8 y 7.1.9 muestra la evolución temporal de las 2 réplicas de cada ensayo.

Se observó que en *A. albertensis* DSM 14366, cada uno de los ensayos presento distintos fenotipos de desplazamiento y diferente tiempo de duración. En el fenotipo A se observó un desplazamiento que a las 72 horas se formó el primer anillo, donde luego a las 120 horas se observó un desplazamiento con mayor rapidez logrando la formación de 3 anillos de motilidad durante el transcurso de las 408 horas. El fenotipo B mostró una migración coordinada durante las 120 horas de incubación, donde a las 72 horas se observó la formación 2 anillos de motilidad, este proceso se repitió 4 veces, formando 4 anillos en total, gracias al comportamiento de desplazamiento-establecimiento.



**Figura 6.** Tipos de fenotipos de motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus albertensis* DSM 14366. La inoculación para cada uno de los fenotipos fue realizada en las placas con el medio semisólido a la concentración de 0,07% de Phytigel. El desplazamiento de las células y se monitoreo a distinta cantidad de horas para cada uno de los fenotipos (A y B).

Debido a que se utilizó el mismo medio semisólido en los 2 fenotipos, las diferencias en los fenotipos pueden deberse a la concentración del inóculo celular inicial, (fenotipo A:  $5,5 \times 10^7$  cel; fenotipo B:  $3 \times 10^7$  cel; figura suplementaria 7.1.6.

### 3.5. Motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377

Se realizó un ensayo de motilidad, en la figura 7 se muestra una de las réplicas que se realizó en ese ensayo. La figura suplementaria 7.1.12 muestra la evolución temporal de este ensayo. Se apreció que *A. thiooxidans* ATCC 19377 presenta un fenotipo cual en una primera instancia de 120 horas no tuvo un mayor desplazamiento, pero si destacando que el borde de emigración se presenta más concentrado, hasta la 216 hora, se observa un desplazamiento descoordinado de las células, pero antes un desplazamiento coordinado.

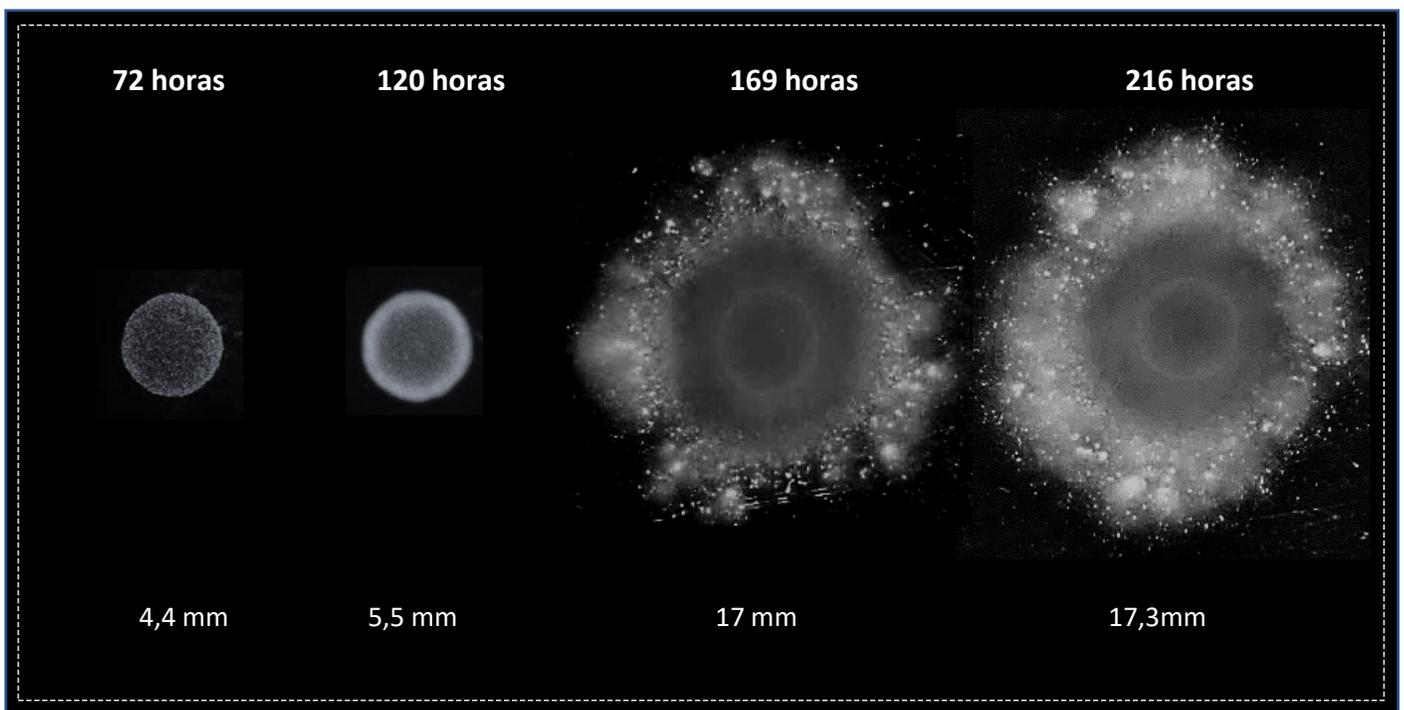


Figura 7. Tipo de fenotipo de la motilidad *swarming* en *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377. La inoculación fue realizada en la placa con el medio

semisólido a la concentración de 0,07% de Phytigel. El desplazamiento de las células se monitoreo durante 216 horas.

### **3.6. Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la motilidad *swarming* en los *Acidithiobacillus***

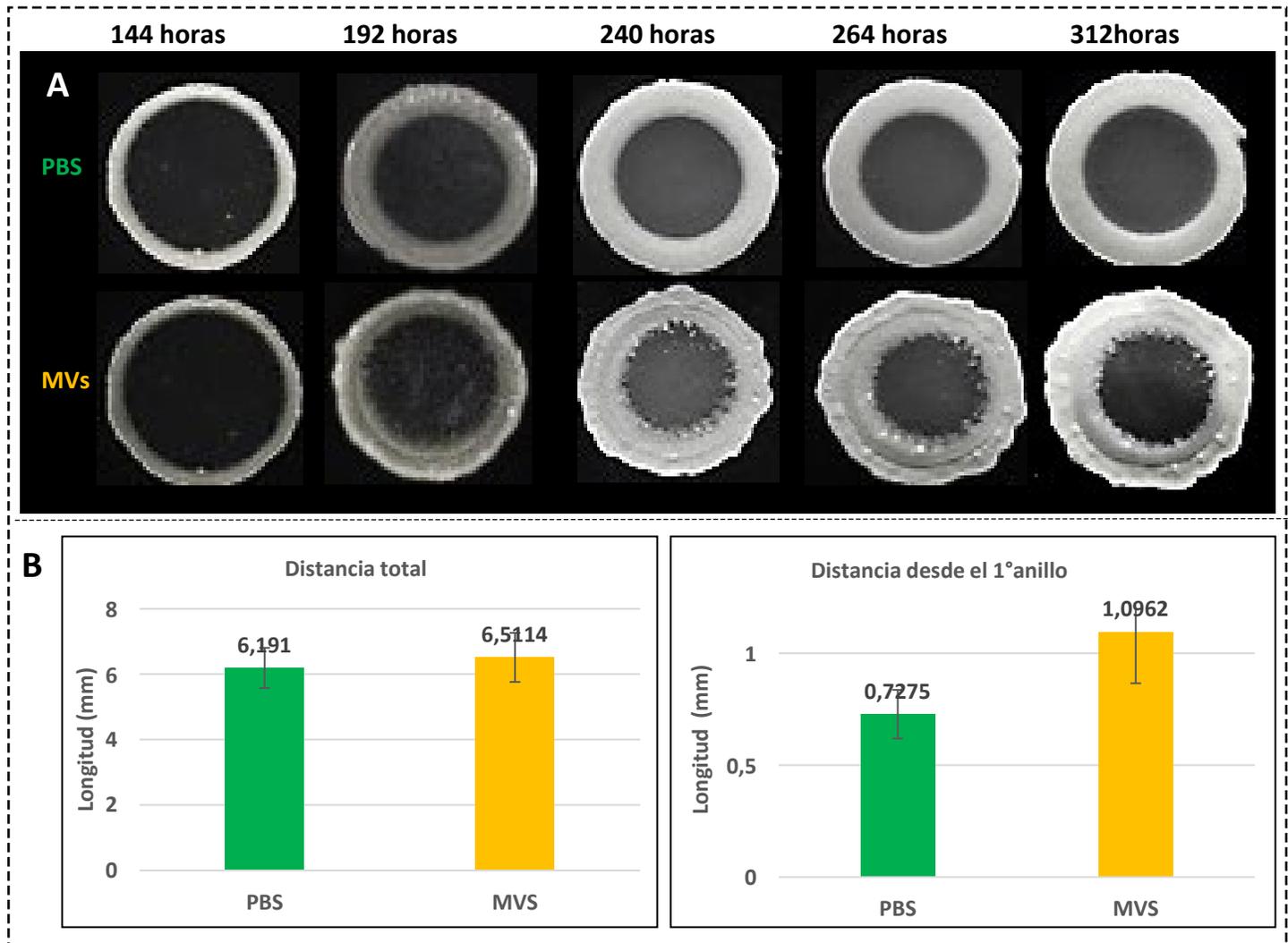
Una vez caracterizada la motilidad *swarming* de las especies del género de *Acidithiobacillus*, se procedió a evaluar si las MVs tienen algún efecto en los fenotipos de la motilidad *swarming* encontrados. El protocolo de purificación de MVs es largo, engorroso y necesita de equipamiento especializado. Las MVs utilizadas en esta tesis fueron purificadas desde cultivos de *A. caldus* en el contexto de la tesis de magister de Stefano Rossoni (U. Andrés Bello) (Rossoni y cols., 2023 en preparación). Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente con la diferencia de que inmediatamente antes de inocular las células, estas se mezclaron con MVs resuspendidas en buffer PBS. Como control se utilizó solo buffer PBS en lugar de MVs.

Como medida de la colonización se determino el diámetro total de la zona colonizada por las células, y también la distancia entre el borde interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, esto captado a cuatro y cinco tiempos (horas) distintos, definidos para cada cepa y ensayo determinado. Los valores de estas medidas fueron comparados estadísticamente mediante una prueba de T Student debido a que eran dos variables.

#### **3.6.1. Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756**

Se realizaron 3 ensayos de motilidad, cada uno con al menos 2 réplicas. La figura 8A muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. La figura suplementaria 7.1.3 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo de motilidad, en la figura 8B muestra que en este ensayo no hay diferencias entre distancias de la

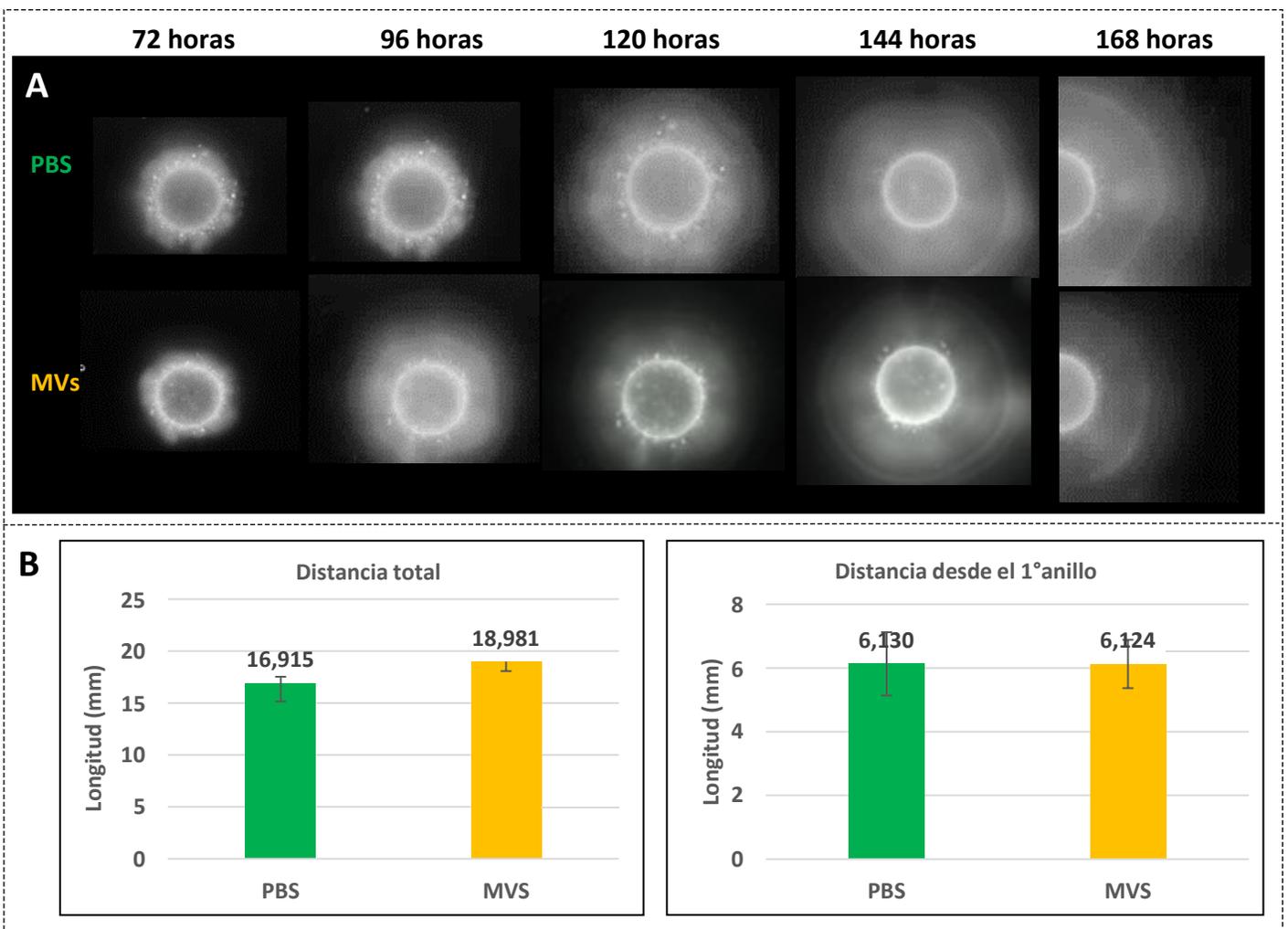
colonización de las células con y sin MVs. Los análisis realizados en 8B utilizaron datos de las 312 horas de la colonización.



**Figura 8. Evaluación 1 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. caldus* ATCC 51756.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. caldus* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $6,3 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 312

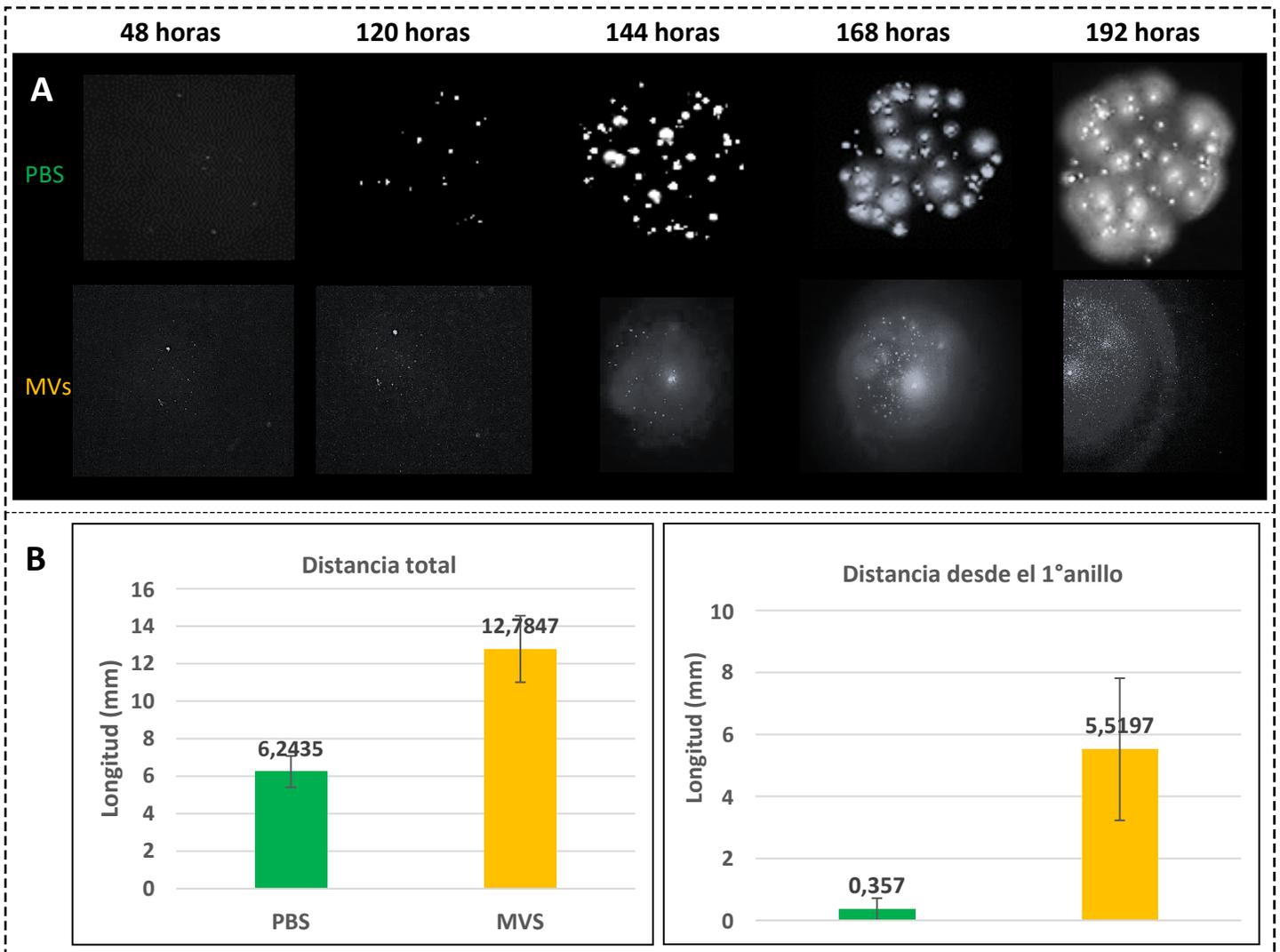
horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 4 réplicas de placas sembradas con PBS y 5 réplicas sembradas con MVs.

La figura 9A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. La figura suplementaria 7.1.4 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo de motilidad, en la figura 9B muestra que en este ensayo no hay diferencias entre distancias de la colonización de las células con y sin MVs. El análisis obtenido en la figura 9B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 120 horas de incubación de las placas.



**Figura 9. Evaluación 2 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. caldus* ATCC 51756.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. caldus* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $4,2 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 168 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 4 réplicas de placas sembradas con PBS y 4 réplicas sembradas con MVs.

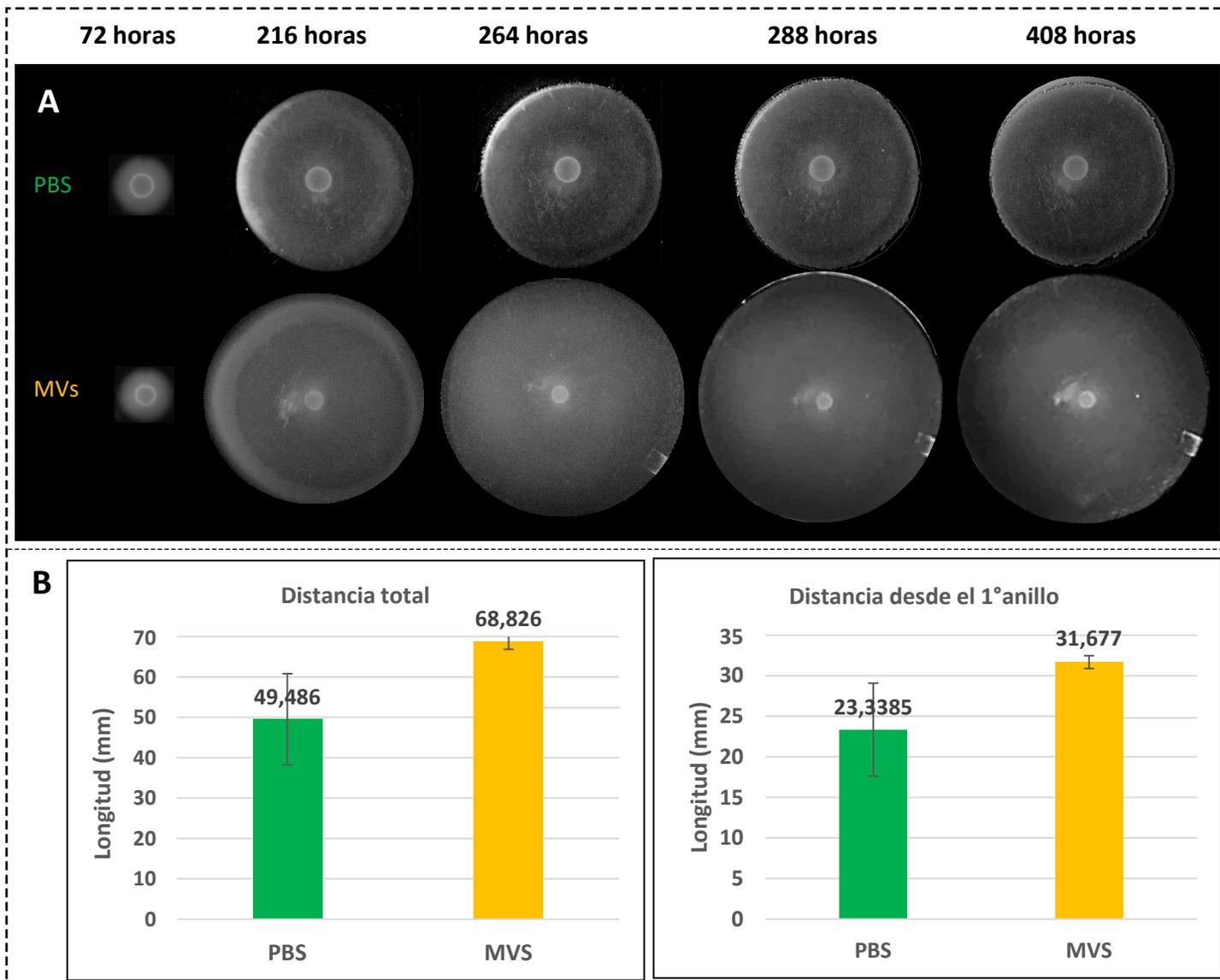
La figura 10A, se observa la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. La figura suplementaria 7.1.5 muestra el resto de las réplicas del ensayo. El análisis realizado para el diámetro indicó que, si hay diferencia de significativa entre la colonización de las células con y sin MVS, pero para la distancia desde el primer borde del primer anillo hasta el borde más externo del último anillo no indico un desplazamiento significativo en la figura 10B. El análisis obtenido en la figura 10B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 192 horas de incubación de las placas.



**Figura 10. Evaluación 3 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. caldus* ATCC 51756.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. caldus* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $6,9 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho) después de las 192 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 4 réplicas de placas sembradas con PBS y 3 réplicas sembradas con MVs.

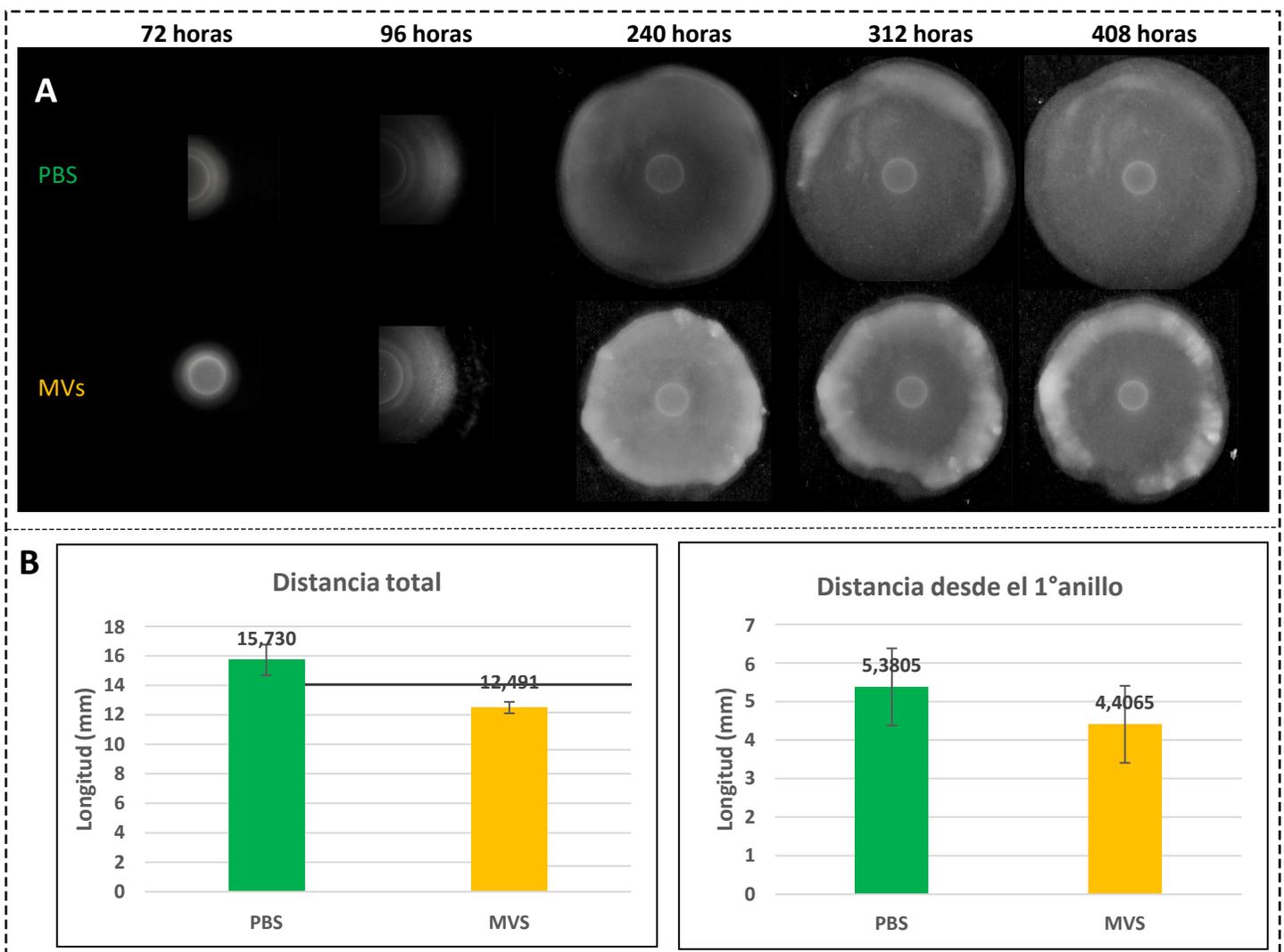
### **3.6.2. Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en *Acidithiobacillus albertensis* DSM 14366**

Se realizaron 4 ensayos de motilidad, cada uno con al menos 2 réplicas. La figura 11A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.8. muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el primer borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, en la figura 11B se muestra que en este ensayo no hay diferencias entre las longitudes de la colonización de las células con y sin MVs. El análisis obtenido en la figura 11B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 408 horas de incubación de las placas.



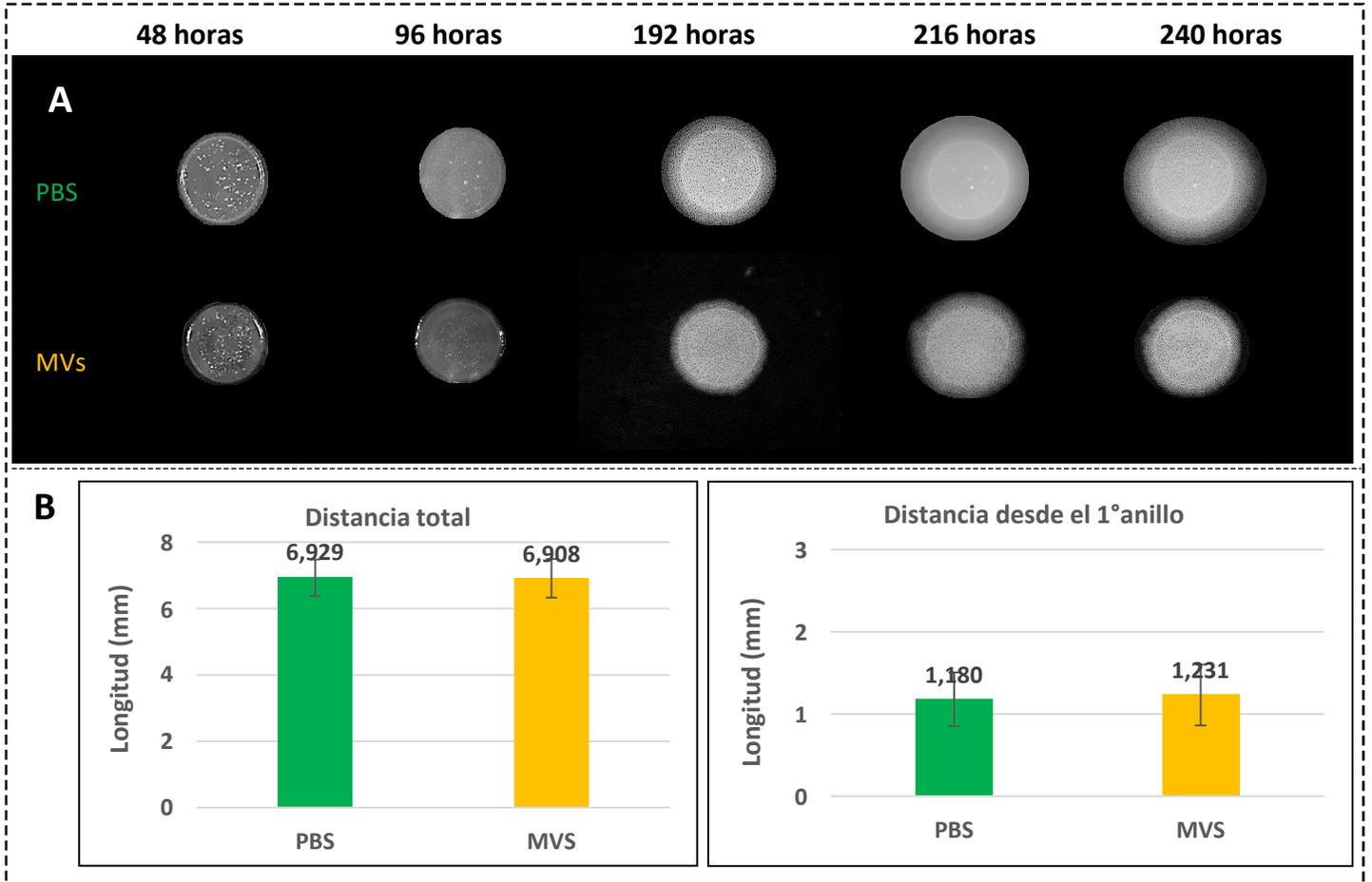
**Figura 11. Evaluación 1 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. albertensis* DSM 14366.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. albertensis* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $1,8 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 408 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 2 réplicas de placas sembradas con PBS y 2 réplicas sembradas con MVs.

La figura 12A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.9 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, muestra que en este ensayo no hay diferencias significativas de las distancias de la colonización de las células con y sin MVs. El análisis obtenido en la figura 12B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 96 horas de incubación de las placas.



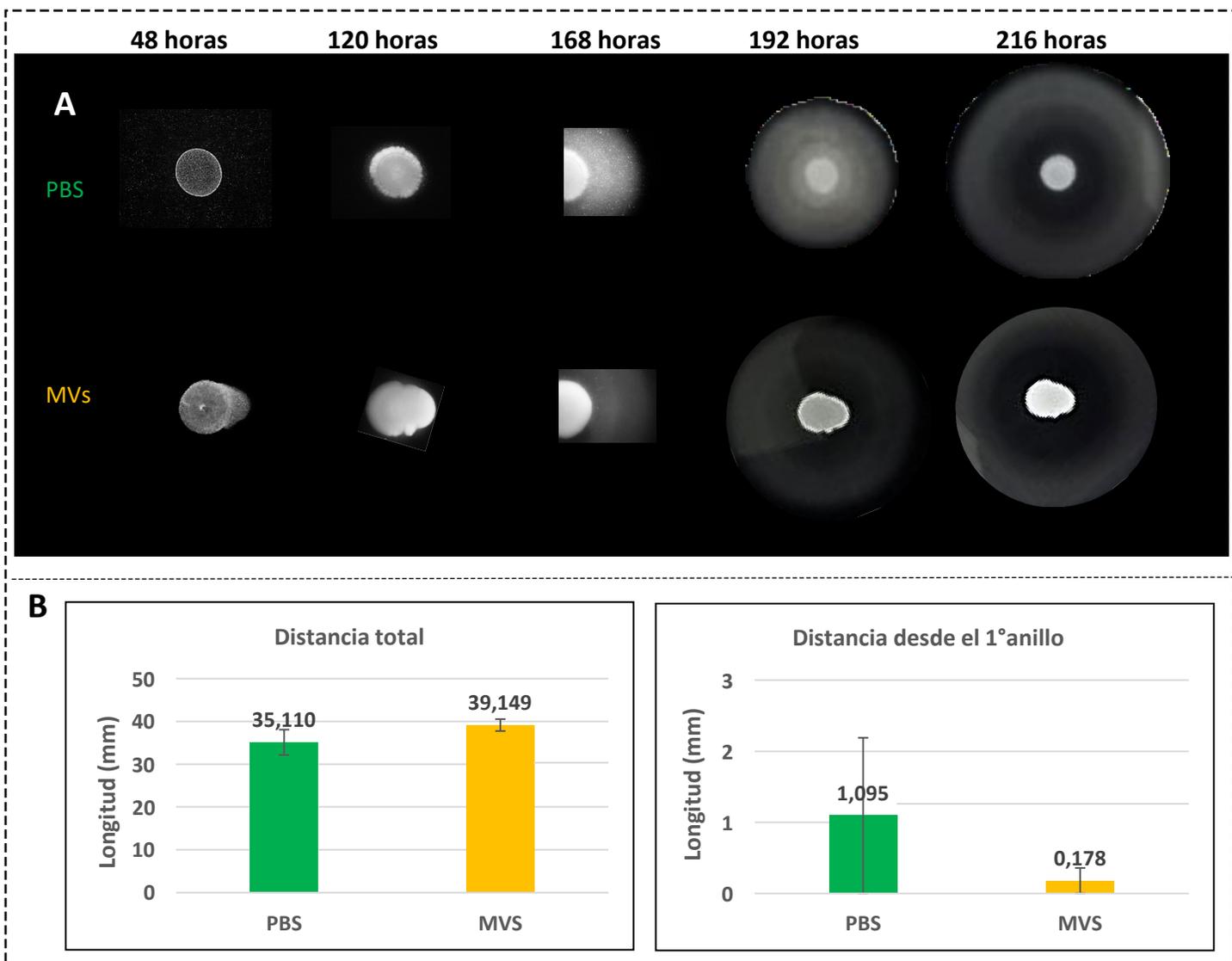
**Figura 12. Evaluación 2 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. albertensis* DSM 14366.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. albertensis* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $6,1 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo de motilidad (panel derecho), después de las 408 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 2 réplicas de placas sembradas con PBS y 2 réplicas sembradas con MVs.

La figura 13A, se muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.10 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo, muestra que en este ensayo no hubo diferencias entre la colonización de las células con y sin MVs en la figura 13B. El análisis obtenido en la figura 13B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 240 horas de incubación de las placas.



**Figura 13. Evaluación 3 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. albertensis* DSM 14366.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. albertensis* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $8,3 \times 10^7$  células usando una gota de  $5 \mu\text{l}$ . En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 240 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 3 réplicas de placas sembradas con PBS y 3 réplicas sembradas con MVs.

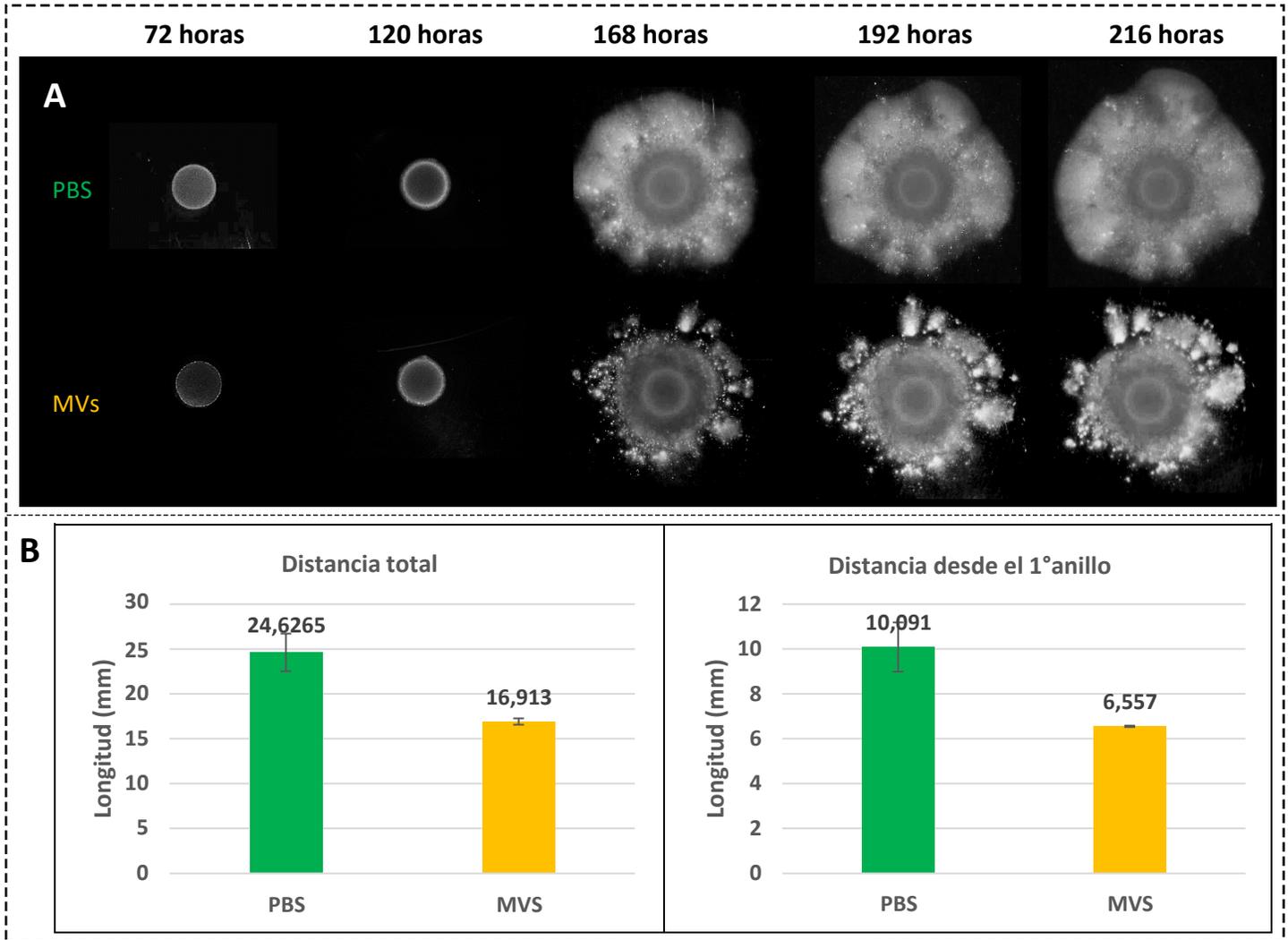
La figura 14A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.11 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde borde más interno hasta el borde más externo del último anillo, muestra que en este ensayo no hay diferencias significativas entre las distancias de la colonización de las células con y sin MVs, en la figura 14B. El análisis obtenido en la figura 14B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 216 horas de incubación de las placas.



**Figura 14. Evaluación 4 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. albertensis* DSM 14366.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. albertensis* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $7,3 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el primer borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 216 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 2 réplicas de placas sembradas con PBS y 2 réplicas sembradas con MVs.

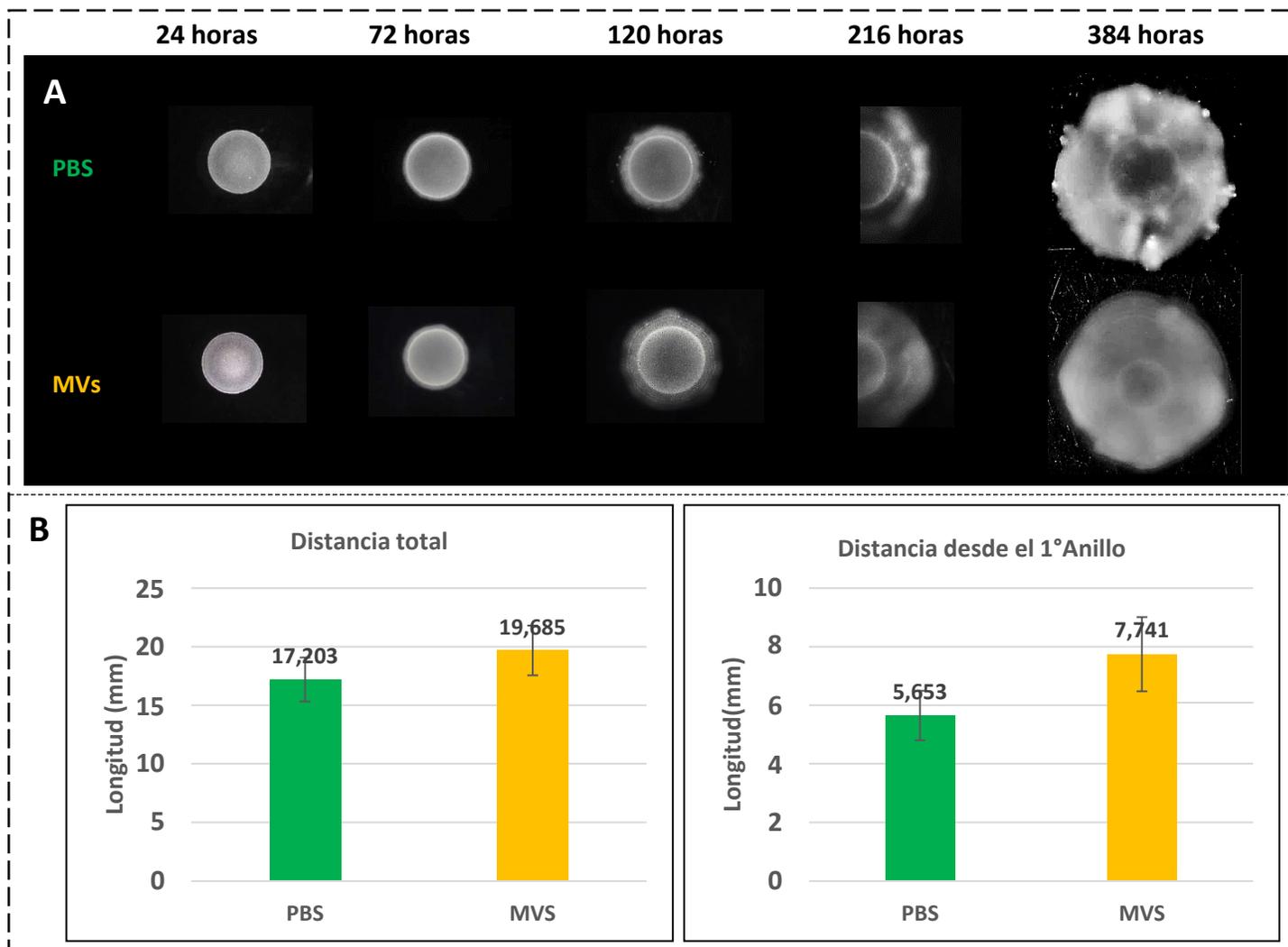
### 3.6.3. Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377

La figura 15A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.14 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, muestra que en este ensayo no hay diferencias significativas entre la colonización de las células con y sin MVs. El análisis obtenido en la figura 15B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 216 horas de incubación de las placas.



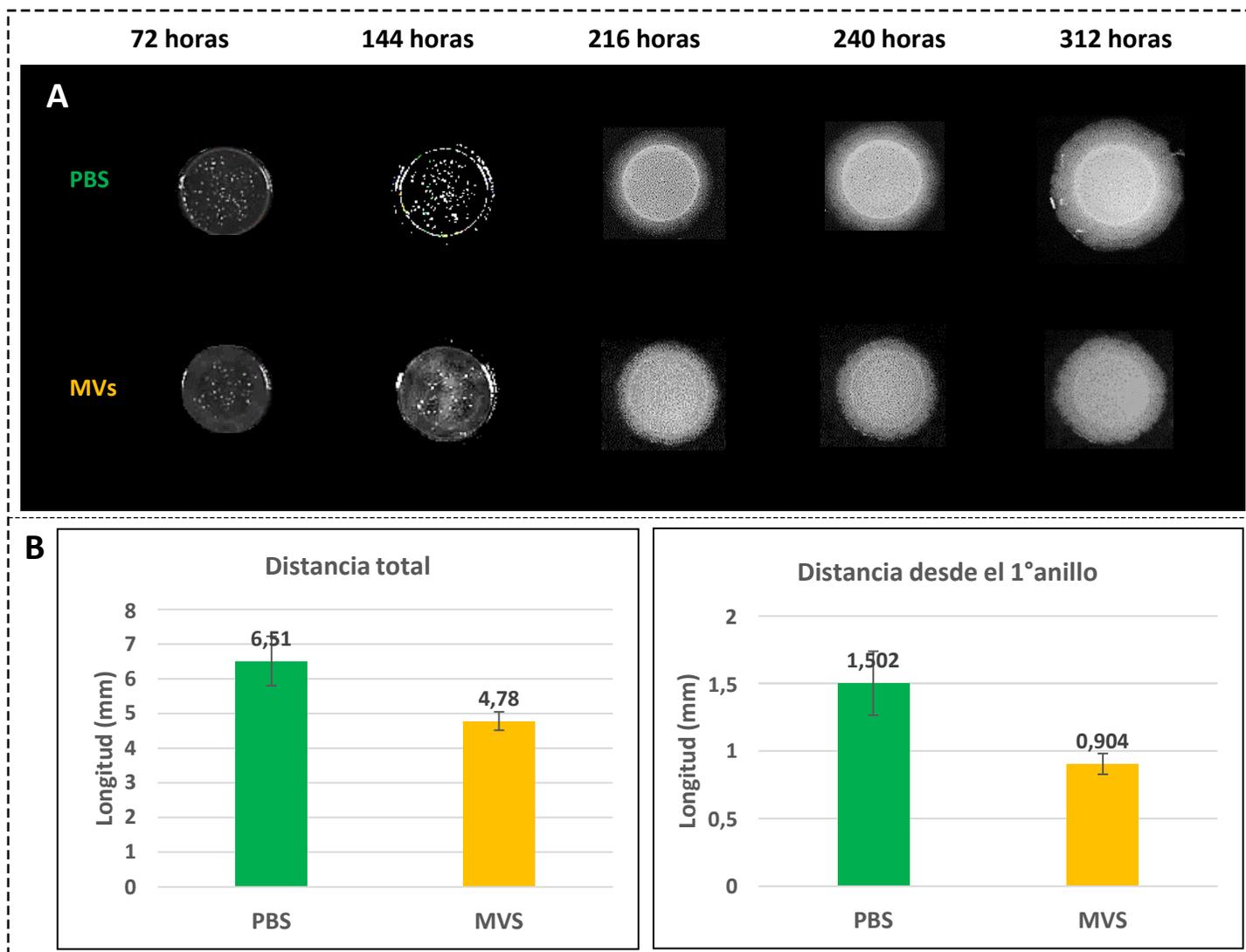
**Figura 15. Evaluación 1 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. thiooxidans* ATCC 19377.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. thiooxidans* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $3.7 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel derecho) y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel izquierdo), después de 216 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 2 réplicas de placas sembradas con PBS y 2 réplicas sembradas con MVs.

La figura 16A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.15 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, muestra que en este ensayo no hay diferencias significativas entre la colonización de las células con y sin MVs, en la figura 16B. El análisis obtenido en la figura 16B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 384 horas de incubación de las placas.



**Figura 16. Evaluación 2 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. thiooxidans* ATCC 19377.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. thiooxidans* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $5,6 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), después de 384 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 2 réplicas de placas sembradas con PBS y 3 réplicas sembradas con MVs.

La figura 17A, muestra la evolución temporal de una de las réplicas del ensayo con PBS y MVs. Las figuras suplementarias 7.1.16 muestra el resto de las réplicas del ensayo. Tanto el diámetro y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo, muestra que en este ensayo no hay diferencias significativas entre la colonización de las células con y sin MVs. El análisis obtenido en la figura 17B se realizaron con los datos de las mediciones realizadas a las 312 horas de incubación de las placas.



**Figura 17. Evaluación 3 del efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la colonización de *A. thiooxidans* ATCC 19377.** En A) se muestra la evolución temporal de la colonización de *A. thiooxidans* inoculado sin MVs (arriba) y con MVs (abajo). Se inocularon  $5,6 \times 10^7$  células usando una gota de 5  $\mu$ l. En B) se muestra, el diámetro de la zona colonizada (panel izquierdo) y la distancia desde el borde más interno del primer anillo de motilidad hasta el borde más externo del último anillo (panel derecho), desde 312 horas de incubación. Las barras indican las desviaciones estándar en base a 3 réplicas de placas sembradas con PBS y 3 réplicas sembradas con MVs

## 4. DISCUSIÓN

### 4.3. Patrones de motilidad tipo *swarming* en los *Acidithiobacillus*

Las 3 especies de *Acidithiobacillus* estudiadas en este trabajo mostraron patrones diferentes de motilidad tipo *swarming*.

En *A. caldus* se observaron tres patrones de colonización distintos los cuales son:

El fenotipo A fue el que presentó menos distancia colonizada al final del ensayo (4,3 mm en promedio). La rugosidad de la colonia de este fenotipo sugiere la formación de una biopelícula en lugar de una población celular moviéndose mediante *swarming*.

El fenotipo B mostró la mayor distancia colonizada (13,1 mm en promedio) y patrones de migración-establecimiento repetitivos que permiten desarrollar anillos definidos, tal como ha sido descrito para otras bacterias (*B. subtilis* y *P. mirabilis*).

Migración se refiere al movimiento de las bacterias, mientras que la consolidación se refiere a su capacidad para formar estructuras multicelulares en el medio semisólido (Kearns, 2018).

Se pudo observar que, en un inicio, la migración no es coordinada totalmente, siendo apreciable subpoblaciones de células que migran primero que otras. No obstante, posteriormente la población celular coordina su movimiento, permitiendo un nado *smooth*, el cuál es la capacidad de ciertas bacterias para moverse con una velocidad constante y una trayectoria recta en un medio semisólido (Fraser, 1999).

El fenotipo C se comporta parecido al fenotipo B hacia el final del ensayo, sin embargo, en tiempos tempranos, este fenotipo revela lo que ocurre antes de la formación del primer borde de migración: primero las células se agrupan formando pequeñas colonias, las que se desplazan de manera asimétrica, más

rápido hacia el lado que se encuentra hacia el exterior, lo que permite finalmente la formación del primer borde de migración.

Debido a que el medio semisólido utilizado en los ensayos fue el mismo, la diferencia entre los patrones de *swarming* probablemente se deba al inóculo inicial. No obstante, en términos de cantidad de células, los inóculos son similares:  $6,9 \times 10^7$  cel para el fenotipo A,  $6,3 \times 10^7$  cel para el B y  $8,8 \times 10^7$  cel para el C. La diferencia puede deberse al estado fisiológico de las células de los inóculos. La velocidad de crecimiento de los cultivos líquidos desde donde se obtuvieron las células para inocular el medio semisólido fueron distintos (Figura complementaria 7.1.1). El inóculo que dio origen al fenotipo B provino de un cultivo líquido que alcanzó su fase exponencial tardía a las 144 h, mientras que los inóculos que dieron origen a los fenotipos C y A alcanzaron la fase exponencial tardía a las 168 h y 192 h, respectivamente. Entonces, parece ser que el inóculo más joven (B) es capaz desarrollar *swarming* de manera inmediata, el más viejo (A) desarrolla una biopelícula, mientras que el inóculo del fenotipo C (El que se encuentra entre el de A y B) forma pequeñas biopelículas de colonia pero que finalmente se disponen formando un borde de migración que permite el *swarming*.

Con respecto a lo anterior, las observaciones realizadas por microscopía óptica, de inóculos provenientes de medio líquido, se observó solo en algunos periodos de tiempos la motilidad de estas células mediante el flagelo, para luego ser inoculados en el medio semisólido, ya que esto podría ser una ventaja para la motilidad *swarming* proporcionándole una mayor rapidez en el medio semisólido.

En el caso de *A. albertensis* los inóculos suministrados en medio semisólido donde se usó el mismo medio para ambos ensayos, es por esto que una diferencia entre los patrones de *swarming* de los fenotipos, se deba a la cantidad inicial de células inoculadas; aunque en términos de cantidad de células los inóculos también son similares;  $5,5 \times 10^7$  cel para el fenotipo A,  $3 \times 10^7$  cel para el fenotipo B. La diferencia también en esta especie, puede deberse al estado

fisiológico de las células de los inóculos. La velocidad de crecimiento de los cultivos líquidos desde donde se obtuvieron las células para inocular el medio semisólido fueron distintos (figura complementaria 7.1.6.) El inóculo que dio origen al fenotipo A provino de un cultivo líquido que alcanzó su fase exponencial tardía a las 192 h y para el fenotipo B provino de un cultivo líquido que alcanzó su fase exponencial tardía a las 96 h, para este caso el inóculo más joven (B) es capaz de desarrollar *swarming* y una mayor cantidad de patrones de motilidad a diferencia del inóculo más viejo que igual fue capaz de realizar un *swarming* rápido, pero con una cantidad menor de anillos de motilidad.

En el caso de *A. thiooxidans* solo se obtuvo un fenotipo característico, esto debido a que solo se observó repetidas veces el mismo fenotipo y no otro. Pero como en las especies de *A. caldus* y *A. albertensis*, el medio semisólido utilizado en este ensayo fue el mismo, el inóculo suministrado provino de un cultivo líquido que alcanzó su fase exponencial tardía a las 216 h, el que también desarrollo *swarming*, pero de manera más lenta y descoordinada.

Los estudios realizados en estas cepas son limitados, por lo que hay poco conocimiento sobre su comportamiento de colonización. Kearns en 2010 menciona que cada tipo de bacteria que realiza *swarming* puede producir una gran variedad de patrones, aunque el significado de cada patrón en particular no está claro. En esta tesis se observó la formación de ciclos con zonas de consolidación o terrazas. En otras bacterias se ha observado que las terrazas surgen debido a una elongación de la célula y un aumento del número de flagelos para un desplazamiento más eficaz.

En la tesis en cuestión se analizaron las células de *A. caldus*, *A. albertensis* y *A. thiooxidans* y se observó que, durante el período de estudio, estas células mantuvieron su forma y estructura original, y de igual manera se formaron estas terrazas. En la tesis de Gómez en 2018, se realizaron ensayos de motilidad tipo *swarming* con cepas de *A. albertensis* y *A. thiooxidans* utilizando dos fuentes energéticas diferentes y diferentes concentraciones del medio donde se

apreciaron patrones de motilidad similares a los ensayos realizados en esta tesis, esto puede deberse a la cantidad de células inoculadas y a la concentración del medio utilizada.

#### **4.2. Efecto de las vesículas de membrana (MVs) en la motilidad *swarming* de los *Acidithiobacillus***

La motilidad es un proceso crucial para la colonización bacteriana, ya que permite el movimiento hacia zonas favorables para su crecimiento y supervivencia. En este estudio se investigó el efecto de las MVs en la colonización de las bacterias quimiolitotróficas y que efecto podría tener.

Respecto a los resultados obtenidos en los experimentos realizados con las especies de *Acidithiobacillus albertensis* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las mediciones asociadas a la colonización de las células en los inóculos suministrados con PBS y en los inóculos suministrados con MVs. Sin embargo, es importante mencionar que las MVs utilizadas en estos ensayos fueron de *Acidithiobacillus caldus*.

El paradigma de la comunicación celular mediante MVs involucra la secreción de las MVs por una célula dadora y la recepción y fusión de las MVs por una célula receptora (Toyofuku, 2018). Podría ser posible que las MVs de *A. caldus* no se fusionen con las células de los otros acidithiobacilli, al menos en las condiciones en las que se hicieron los ensayos, impidiendo su efecto.

En un ensayo realizado con *A. caldus* se observó diferencias significativas entre las distancias de colonización alcanzadas por células inoculadas con y sin MVs. En el fenotipo 3 sin MVs se apreciaron pequeñas colonias la que se fueron desplazando hacia el lado exterior para luego ir formando los anillos de motilidad, pero en el caso del inóculo suministrado con MVs no ocurrió la formación de estas pequeñas colonias permitiendo la migración celular y la formación de los anillos de motilidad. El efecto de las MVs se vio reflejado, de manera que el desplazamiento de las células fuera más rápido y coordinado para formar los

anillos de motilidad a diferencia de las células sin MVs que mostraron un desplazamiento lento y descoordinado.

Se sabe hasta ahora, que las MVs son pequeñas estructuras que se liberan de la superficie de las células bacterianas y contienen diferentes moléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos como se menciona en Toyofuku en 2018. En algunos casos, las vesículas pueden contener componentes que tienen efectos tóxicos o beneficiosos para las células receptoras. Las vesículas pueden contener proteínas o lípidos que actúan como señales para activar o desactivar procesos celulares, incluyendo la función del flagelo. Si las vesículas contenían componentes que estimulan la actividad del flagelo, esto podría aumentar la motilidad de las células y mejorar su capacidad para moverse hacia los nutrientes. Es posible que los patrones de motilidad observados sean el resultado de una respuesta coordinada de las células receptoras a los componentes de las vesículas. Las células bacterianas tienen la capacidad de comunicarse y coordinar su comportamiento a través de señales químicas, por lo que las vesículas podrían estar estimulando una respuesta coordinada en las células receptoras que resulta en un patrón de motilidad observable. Recientemente, se han secuenciado las proteínas que llevan las MVs de *A. caldus* (Rossoni et al., en preparación). Se encontraron cerca de 500 proteínas, incluyendo algunas que forman el cuerpo basal (FlgC, FlgA, FlgG, FlgI, FliL, FlgB, FliE), el motor (FliG, FliN, FliG, MotA), y el gancho (FliK, FlgL, FlgK, FliE, FlgL) del flagelo. Si una célula recibe e incorpora MVs con estas proteínas en su membrana, podría utilizarlas para ensamblar rápidamente su flagelo, lo que podría a su vez explicar la diferencia del movimiento entre células inoculadas con y sin MVs.

Es importante notar que este efecto no se dio en los otros ensayos (A y B), por lo que aparentemente el estado fisiológico inicial de las células determina la influencia de las MVs. Un estado particular podría permitir o no la fusión de las MVs a una célula receptora.

De forma importante, estos resultados indican por primera vez un efecto de MVs bacterianas en el fenotipo de motil.

## 5. CONCLUSION

El foco de esta tesis era poder obtener un medio para que las bacterias del género *Acidithiobacillus* pudieran desarrollar patrones de motilidad tipo *swarming* y el efecto que podrían tener las MVs en la motilidad *swarming* en estas bacterias.

1. Se demostró que las tres especies del género de *Acidithiobacillus* se desplazaron en un medio semisólido formando distintos patrones de motilidad tipo *swarming*, para *A. caldus* con tres tipos de fenotipos, para *A. albertensis* con dos tipos de fenotipos y *A. thiooxidans* solo un fenotipo característico. Evidenciando en cada fenotipo de cada cepa que el desplazamiento en el medio semisólido depende de los tiempos en los cuales se encuentre el medio líquido y si se encuentra motil la célula para una mayor o menor velocidad en el medio semisólido.

2. Con respecto al punto anterior, los fenotipos de *A. caldus* fueron inoculados a distintos tiempos en cada uno de los fenotipos, lo que indica que el cultivo inoculado primero al ser más joven favorece al *swarming* en las placas con un desplazamiento más rápido y el cultivo inoculado más tarde al ser más viejo esto desfavoreció al *swarming* de tal manera que su desplazamiento fue más lento.

3. El efecto de las MVs solo se observó de manera significativa en *A. caldus*, aumentando la coordinación y la velocidad de movimiento de las células.

4. Además, lo que contribuiría a la diferencia de efecto en la motilidad en *A. caldus*, sería la presencia de ciertas proteínas en las MVs. Esto sugiere que las proteínas de las MVs podrían ser un factor importante a considerar en la motilidad

*swarming* de estas células, pudiendo explicar la diferencia en la motilidad de las células inoculadas con MVs y células inoculadas con MVs.

Estos hallazgos son importantes porque indican por primera vez un efecto de las MVs bacterianas en el fenotipo de motil, lo que puede tener implicaciones significativas en la comprensión de la colonización bacteriana y la comunicación intercelular. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos detrás de estos efectos y cómo pueden variar según el estado fisiológico de las células.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Amano, A., Takeuchi, H. y Furuta, N. (2010). Las vesículas de la membrana externa funcionan como armas ofensivas en las interacciones huésped-parásito. *Microbios e infección*, 12, 791 - 798.
- Bellenberg, S., Barthen, R., Boretska, M., Zhang, R., Sand, W., & Vera, M. (2015). Manipulation of pyrite colonization and leaching by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1435-1449.
- Bellenberg, S., Leon-Morales, C.F, Sand, W., & Vera, M. (2012). Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 129, 82-89.
- Biller, S.J, Schubotz, F., Roggensack, S.E, Thompson, A.W, Summons, R.E., & Chisholm, S.W. (2014). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *science*, 343(6167), 183-186.
- Boman, A., Fröjdö, S., Backlund, K., Åström, M.E. (2010). Impact of isostatic land uplift and artificial drainage on oxidation of brackish-water sediments rich in metastable iron sulfide *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74, pp. 1268-1281, 10.1016/j.gca.2009.11.026.

- Castro, M., Deane, S.M., Ruiz, L., Rawlings, D.E., & Guiliani, N. (2015). Diguanylate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway regulates the motility and adherence of the extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus*. PLoS One, 10(2), e0116399.
- Castro, M., Moya-Beltrán, A., Covarrubias, P.C., González, M., Cardenas, J.P., Issotta, F., ... Quatrini, R. (2017). Draft genome sequence of the typestrain of the sulfur-oxidizing acidophile, *Acidithiobacillus albertensis* (DSM14366). Santiago: BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0282-y>.
- Castro, M., Díaz, M., Beltrán, A.M., & Guiliani, N. (2020). Cyclic di-GMP Signaling in Extreme Acidophilic Bacteria. Microbial Cyclic Di-Nucleotide Signaling, 337.
- Choi, D.S., Kim, D.K., Choi, S.J., Lee, J., Choi, J.P., Rho, S., ... & Gho, Y.S. (2011). Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. Proteomics, 11(16), 3424-3429.
- Cook, F.J, Hicks, W., Gardner, E.A., Carlin, G.D., Froggatt, D.W. (2000). Export of Acidity in Drainage Water from Acid Sulphate Soils., 41(7-12), 319–326. doi:10.1016/s0025-326x(00)00138-7
- Dear, S., Moore, N., Dobos, S., Walting, K., & Ahern, C. (2002). Soil Management Guidelines. In Queensland Acid Sulfate Soil Technical Manual. Queensland, Australia: Department of Natural Resources and Mines. 71p.
- Dent, D. (1986). Acid sulphate soils: a baseline for research and development. Publication 39. Wageningen: International Institute of Land Reclamation and Improvement -ILRI-. 204 p.

- Edward, K.J., Bond, P.L., & Banfield, J.F. (2000). Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environmental microbiology*, 2(3), 324-332.
- Edward, K.J., & Rutenberg, A.D. (2001). Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology*, 180(1-4), 19-32.
- FAO. (2000). Soil problema in the World. Technical In form. Retrieved from [http:// www.fao.org](http://www.fao.org).
- Fältmarsch, R.M., Åström, M.E., Vuori, K-M. (2008). Environmental risks of metals mobilised from acid sulphate soils in Finland: a literature review. *Boreal Env Res*, 13, pp. 444-456.
- Fraser, G.M., & Hughes, C. (1999). *Swarming* motility. *Current opinion in microbiology*, 2(6), 630-635.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., & Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and environmental microbiology*, 64(7), 2743-2747.
- González, A. (2012). AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY.
- Gómez, R. (2018). Contribución de la variabilidad genética en el fitness biológico de bacterias biolixiviación del género *Acidithiobacillus*. Memoria de título para optar al título de ingeniería civil en biotecnología. Universidad san Sebastián.

- Grande, R., et al. (2015). *Helicobacter pylori* ATCC 43629 / NCTC 11639 vesículas de membrana externa (OMV) de biofilm y fase planctónica asociada con ADN extracelular (eDNA). Parte delantera. *Microbiol.* 6, 1369.
- Hedrich, S., & Schippers, A. (2021). Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic environments. *Current issues in molecular biology*, 40(1), 25-48.
- Ismail, S., Hampton, M.B., & Keenan, J.I. (2003). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* 71: 5670–5675.
- Jarrell, K.F., & McBride, M.J. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 466-476.
- Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial *swarming* motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644.
- Klieve, A.V., Yokoyama, M.T., Forster, R.J., Ouwerkerk, D., Bain, P.A., Mawhinney, E.L., & Canada, A. (2005). Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. *Applied Environmental Microbiology*, 71(8), 4248-4253.
- Kuehn, M.J., & Kesty, N.C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 19:2645–2655.doi:10.1101/gad.1299905.
- Ling, Y-C., Bush, R., Grice, K., Tulipani, S., Berwick, L., and Moreau, J.W. (2015). Distribution of iron- and sulfate-reducing bacteria across a coastal acid

sulfate soil (CASS) environment: implications for passive bioremediation by tidal inundation. *Front. Microbiol.* 6:624. doi: 10.3389/fmicb.2015.00624.

Ljung, K., Maley, F., Cook, A., & Weinstein, P. (2009). Acid sulfate soils and human health—a millennium ecosystem assessment. *Environment international*, 35(8), 1234-1242.

Schwechheimer, C., & Kuehn, M.J. (2015). Vesículas de la membrana externa de bacterias Gram-negativas: biogénesis y funciones. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 605–619.

Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2018). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13-24.

Mashburn-Warren, L.M., & Whiteley, M. (2006). Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 61(4), 839-846.

McBroom, A., & Kuehn, M.J. (2005). Outer membrane vesicles. In *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology* (ed. R. Curtiss III), Chapter 2.2.4 [Online]. ASM Press, Washington, DC.

Meyer, G., Schneider-Merck, T., Böhme, S., & Sand, W. (2002). A simple method for investigations on the chemotaxis of *A. ferrooxidans* and *D. vulgaris*. *Acta biotechnologica*, 22(3-4), 391-399.

Moya-Beltrán, A., Beard, S., Rojas-Villalobos, C., Issotta, F., Gallardo, Y., Ulloa, R., ... & Quatrini, R. (2021). Genomic evolution of the class *Acidithiobacillia*: deep-branching Proteobacteria living in extreme acidic conditions. *The ISME Journal*, 1-18.

- Muñoz, P.A., & Muñoz, P.L. (2005). Evaluación de impacto ambiental de los suelos sulfatados ácidos sobre la calidad fisicoquímica de las aguas de drenaje y diagnóstico de manejo. Distrito de riego Usochicamocha (Boyacá).
- Palko, J., Yli-Halla, M. (1993). Assessment and management of acidity release upon drainage of acid sulfate soils in Finland. In: Dent D, van Mensvoort M, editors. Selected papers of the Ho Chi Minh City Symposium on Acid Sulfate Soils. Ho Chi Minh City, Vietnam: ILRI Publications; p. 411–8.
- Pérez-Cruz, C., et al. (2013). New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T: implications for DNA content. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1874–1881.
- Pons, L.J., Van, B.N. (1982). Factors influencing the formation of potential acidity in tidal swamps. Pp. 37-51. In. Proceedings from the Second International Symposium on acid sulfate soils. Dost H (ed.), ILRI Publ. No. 31, International Institute for Land Reclamation and Improvement, The Netherlands.
- Wilson, B., White, I., Melville, M. (1999). Floodplain hydrology, acid discharge and change in water quality associated with a drained acid sulfate soil. *Marine Freshwater Res.* 50:149–57.
- Yli-Halla, M., Puustinen, M., Koskiahho, J., Carlin, G.D., Froggatt, D.W. (2006). Area of cultivated acid sulfate soils in Finland. *Soil Use Manag.*, 15, pp. 62-67, 10.1016/S0025-326x(00)00138-7.

## 7. MATERIAL COMPLEMENTARIO

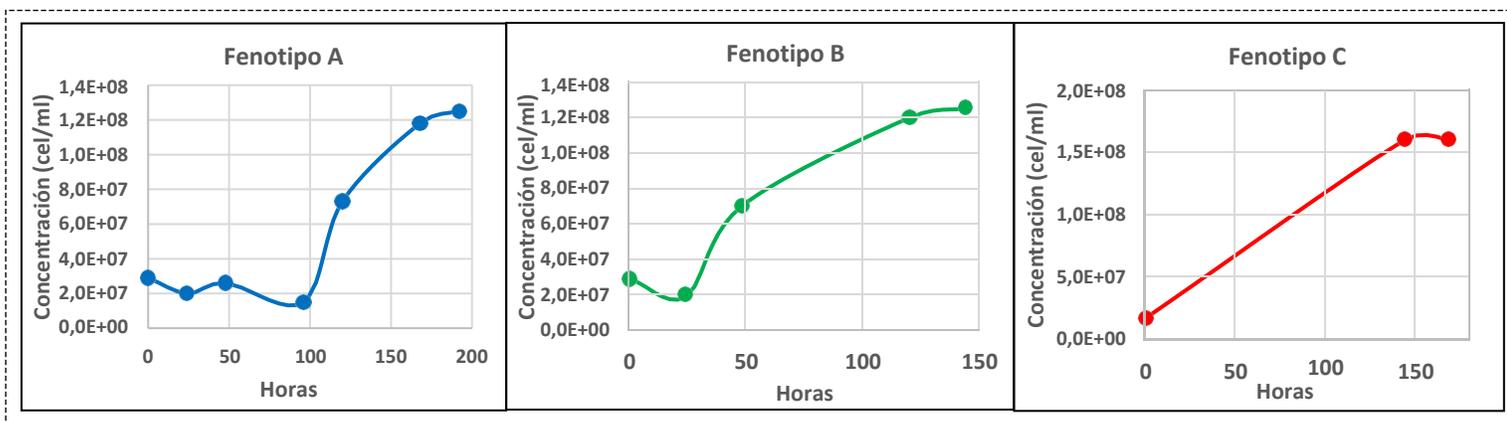


Figura 7.1.1. Gráficos de curvas de crecimiento bacteriano en medio líquido para los 3 fenotipos A, B y C de *A. caldus* ATCC 51756.

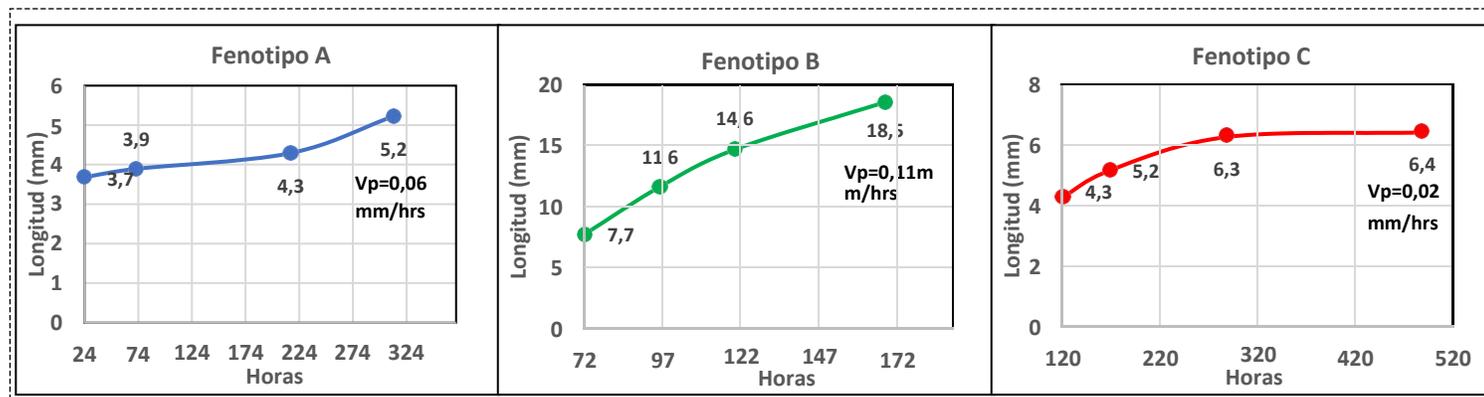
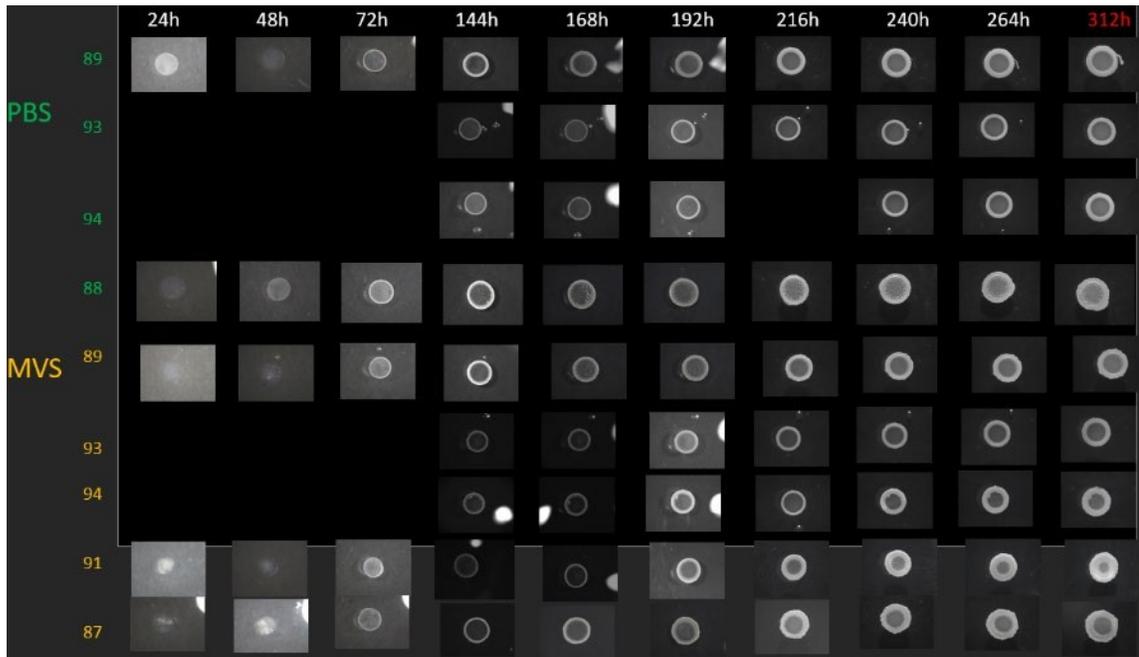
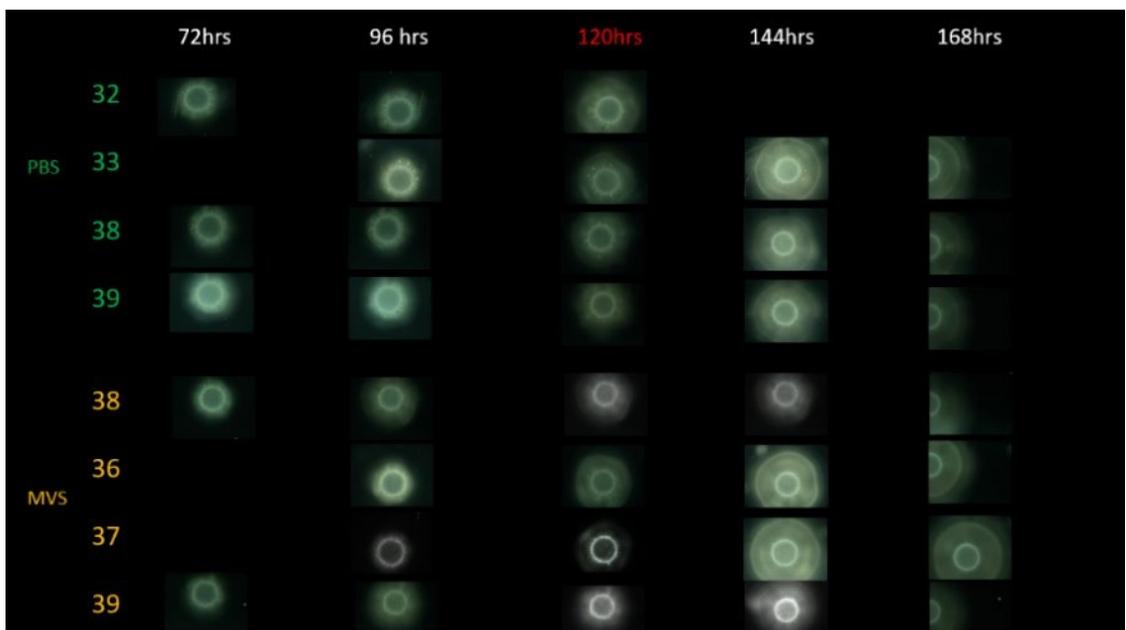


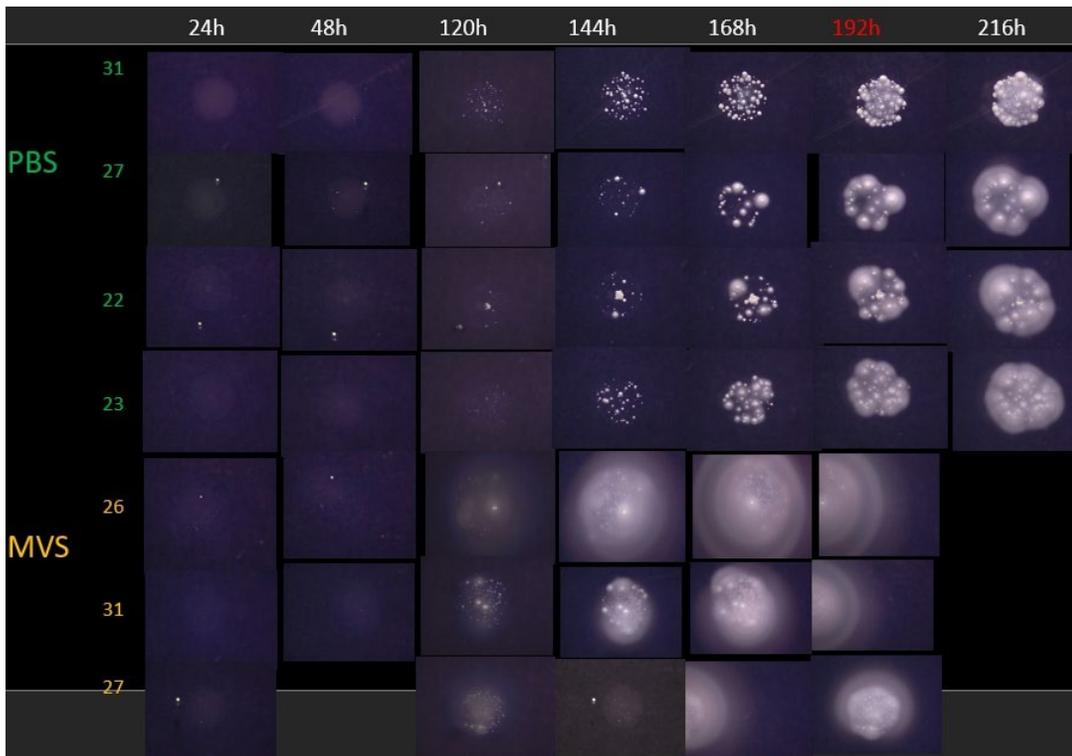
Figura 7.1.2. Velocidad promedio de colonización para los 3 fenotipos A, B y C de *A. caldus* ATCC 51756.



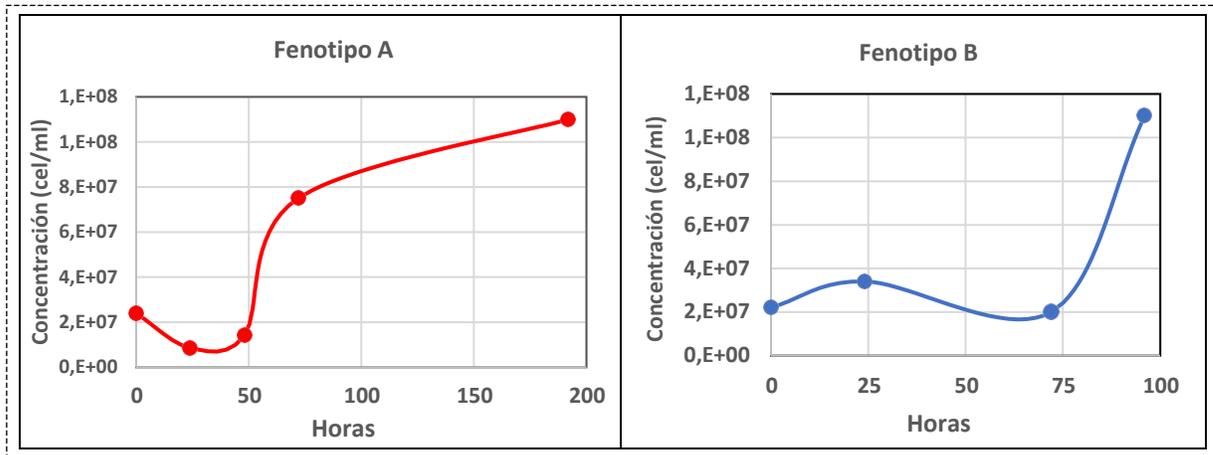
**Figura 7.1.3. Fenotipo 1, total de réplicas de *A. caldus* ATCC 51756 de la evaluación 1.** Se realizaron un total de 4 réplicas con PBS y 5 réplicas con MVs.



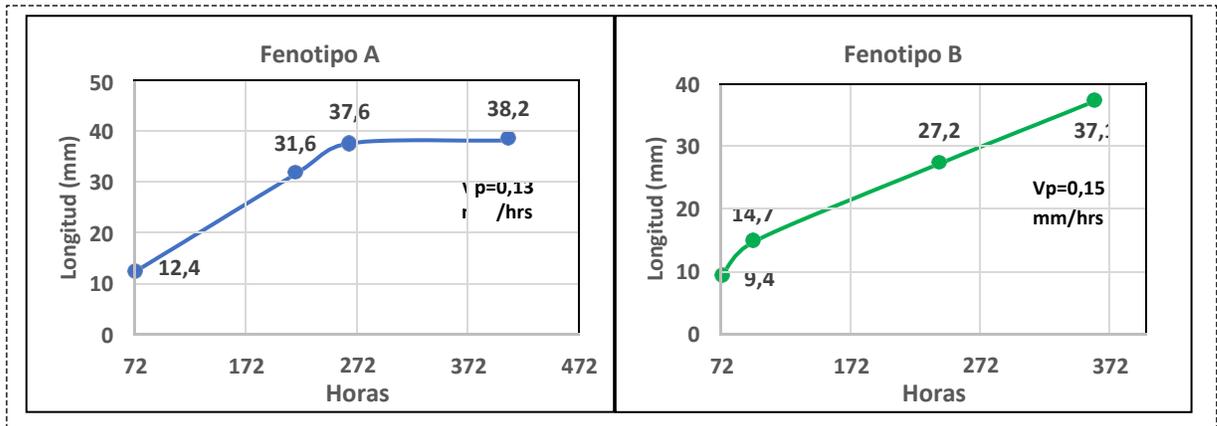
**Figura 7.1.4. Fenotipo 2, total de réplicas de *A. caldus* ATCC 51756 de la evaluación 2.** Se realizaron un total de 4 réplicas con PBS y 4 réplicas con MVs.



**Figura 7.1.5. Fenotipo 3, total de réplicas de *A. caldus* ATCC 51756 de la evaluación 3. Se realizaron un total de 4 réplicas con PBS y 3 réplicas con MVs.**



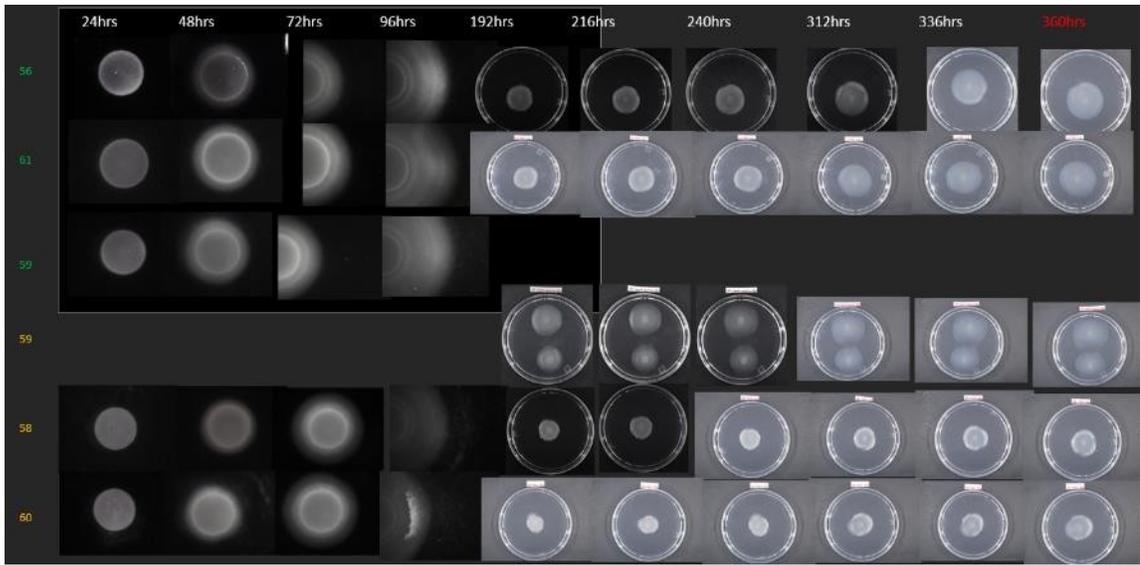
**Figura 7.1.6. Curvas de crecimiento para los dos fenotipos A y B de *A. albertensis* DSM 14366.**



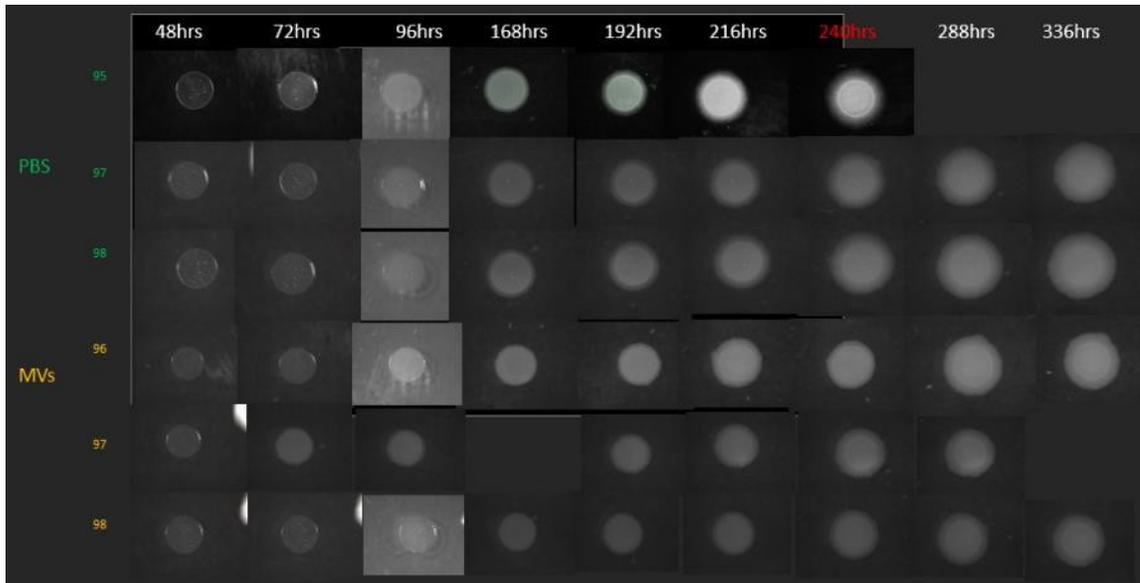
**Figura 7.1.7. Velocidad promedio de colonización para cada fenotipo A y B de *A. albertensis* DSM 14366.**



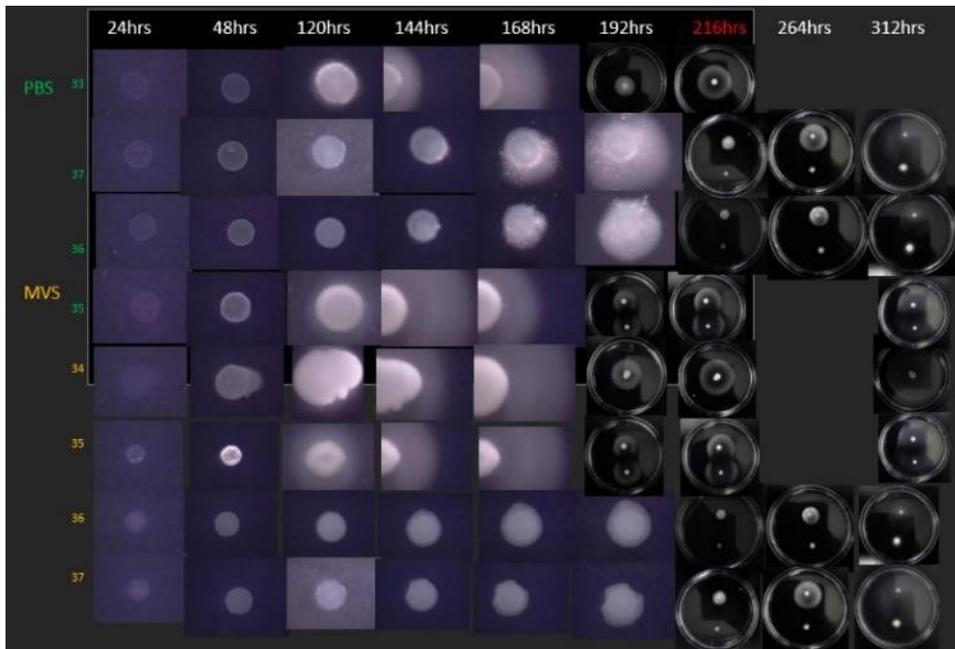
**Figura 7.1.8. Fenotipo 1, total de réplicas de *A. albertensis* DSM 14366 de la evaluación 1. Se realizaron un total de 2 réplicas con PBS y 2 réplicas con MVs.**



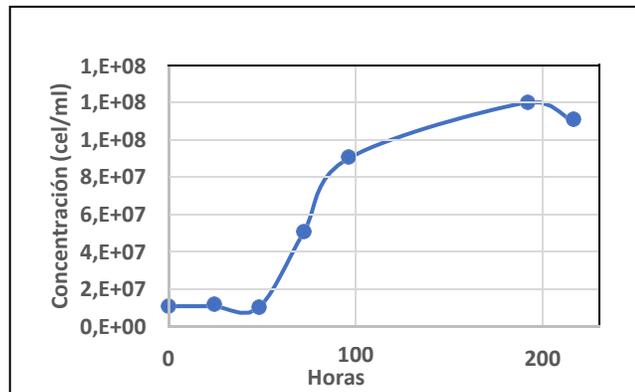
**Figura 7.1.9. Fenotipo 2, total de réplicas de *A. albertensis* DSM 14366 de la evaluación 2. Se realizaron un total de 4 réplicas con PBS y 4 réplicas con MVs.**



**Figura 7.1.10. Total de réplicas de *A. albertensis* DSM 14366 de la evaluación 3. Se realizaron un total de 3 réplicas con PBS y 3 réplicas con MVs.**



**Figura 7.1.11. Total de réplicas de *A. albertensis* DSM 14366 de la evaluación 4.** Se realizaron un total de 4 réplicas con PBS y 4 réplicas con MVs.



**Figura 7.1.12. Curva de crecimiento bacteriano para el fenotipo de *A. thiooxidans* ATCC 19377.**

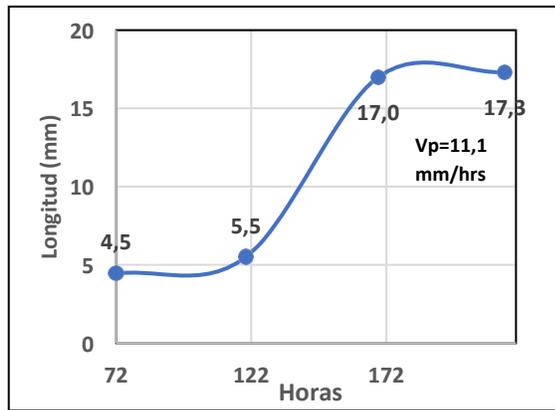


Figura 7.1.13. Velocidad promedio de colonización del fenotipo de *A. thiooxidans* ATCC 19377.

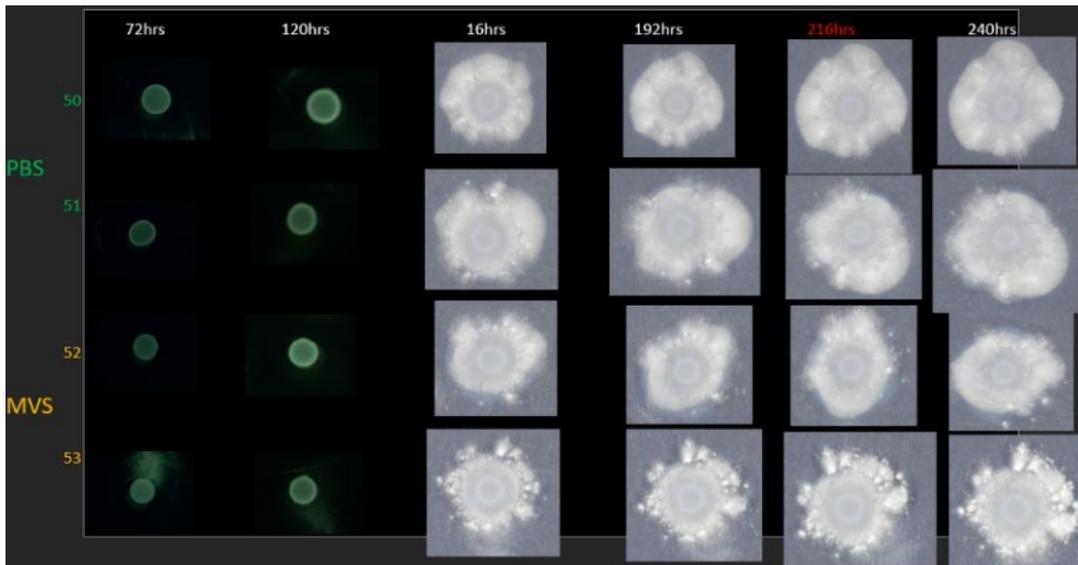
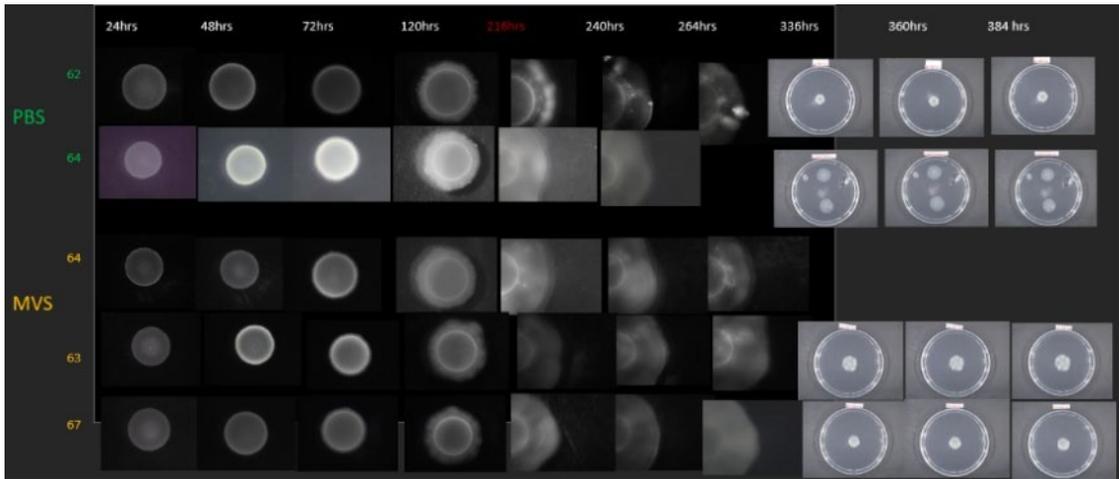
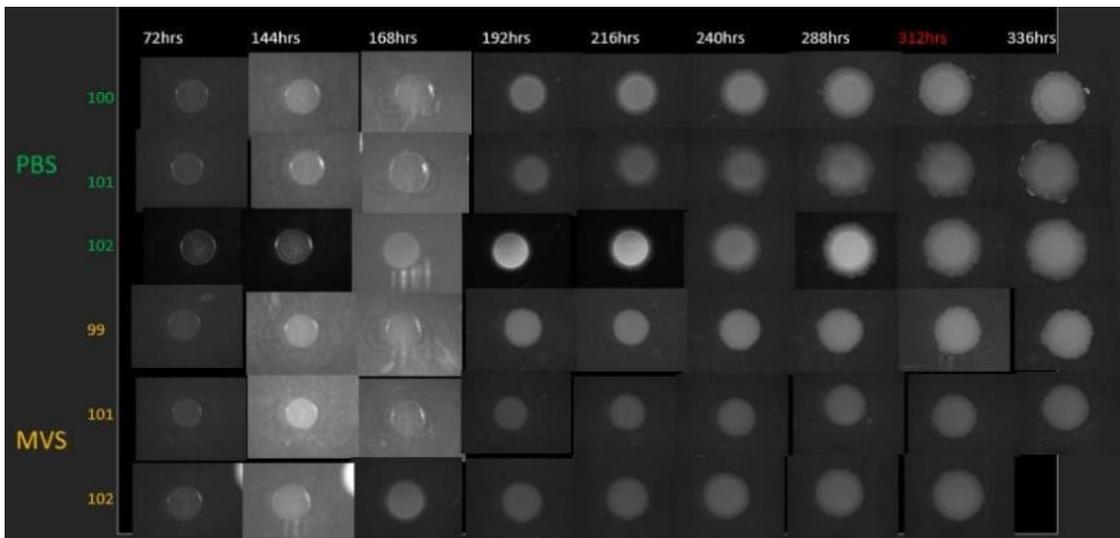


Figura 7.1.14. Fenotipo 1, total de réplicas de *A. thiooxidans* ATCC 19377 de la evaluación 1. Se realizaron un total de 2 réplicas con PBS y 2 réplicas con MVs.



**Figura 7.1.15. Total de réplicas de *A. thiooxidans* ATCC 19377 de la evaluación 2.** Se realizaron un total de 2 réplicas con PBS y 3 réplicas con MVs.



**Figura 7.1.16. Total de réplicas de *A. thiooxidans* ATCC 19377 de la evaluación 3.** Se realizaron un total de 3 réplicas con PBS y 3 réplicas con MVs.

