

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL c-di-GMP
EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA
RESISTENCIA A CADMIO EN *Cupriavidus*
metallidurans CH34

PABLO ALVIZ GAZITÚA

2018

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL c-di-GMP
EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA
RESISTENCIA A CADMIO EN *Cupriavidus*
metallidurans CH34

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Pablo Alviz Gazitúa

Directores de Tesis:

Dr. Nicolás Guiliani Guerin & Dr. Michael Seeger
Pfeiffer

Santiago- Chile

2018

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado altamente tóxico para los sistemas biológicos. El estudio de microorganismos para la biorremediación de metales pesados, ha destacado a *Cupriavidus metallidurans* CH34, β -proteobacteria aislada desde instalaciones metalúrgicas, como modelo de resistencia a estos elementos. La biorremediación *ex situ* de metales pesados es comúnmente llevada a cabo en biorreactores de lecho fijo, donde los metales pesados en solución se concentran en la biomasa de comunidades de microorganismos adheridos a superficies llamadas “biopelículas”. El efecto de los metales pesados sobre la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34 no ha sido descrito. Durante las últimas décadas, la vía de señalización mediada por un dinucleótido cíclico llamado “c-di-GMP” ha sido establecida como central en la regulación del estilo de vida bacteriano. La interacción de c-di-GMP con distintos receptores macromoleculares promueve del estilo de vida comunitario. Pese al rol fundamental de las biopelículas en los procesos de biorremediación, el efecto de los metales pesados sobre esta vía de señalización en bacterias ha sido poco estudiado. El objetivo de esta tesis es determinar el efecto del cadmio sobre la vía del c-di-GMP y la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34.

El cadmio inhibió la formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Esto se correlaciona con la descripción de una baja en los niveles de c-di-GMP tras la exposición a este metal pesado, concomitante con un aumento en la abundancia de un transcrito del gen *urf2* de los operones de resistencia a mercurio Tn4378 (*urf2.1*) y Tn4380 (*urf2.2*), que codifica una potencial fosfodiesterasa. Ensayos de complementación con el gen *urf2.2* de la cepa mutante nula *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$, carente de la fosfodiesterasa RocR, restituyeron la formación de biopelículas y concentración intracelular de c-di-GMP a niveles de la cepa silvestre. Estos resultados constituyen la primera evidencia de funcionalidad catalítica de la fosfodiesterasa codificada por el gen *urf2*, por lo que se denominó fosfodiesterasa Mrp (metal regulated phosphodiesterase). De forma coherente con la respuesta inhibitoria de formación de biopelículas mediada por la disminución de los niveles de c-di-GMP en *C. metallidurans*, niveles elevados de este segundo mensajero generados por una diguanilato ciclasa activa expresada en forma heteróloga, incrementaron la formación de biopelículas y la susceptibilidad a cadmio.

ABSTRACT

Cadmium is a highly toxic heavy metal for biologic systems. *Ex situ* heavy metal bioremediation is commonly carried out in fixed bed bioreactors in which heavy metals in solution are removed by adhered microbial communities in biofilms. *Cupriavidus metallidurans* CH34 is a model strain for heavy metal resistance and bioremediation. However, the effect of heavy metals on *C. metallidurans* CH34 biofilm formation has not been described. The signaling pathway mediated by the cyclic dinucleotide c-di-GMP is central in bacterial lifestyle regulation. c-di-GMP promotes biofilm lifestyle through the interaction with different receptors. Despite of the central role of biofilms on the bioremediation process, the effect of heavy metals over this signaling pathway has been poorly studied. Thus, the objective of this study was to assess the effect of cadmium on the c-di-GMP pathway and biofilm formation in *C. metallidurans* CH34.

Cadmium exerted an inhibitory effect on *C. metallidurans* CH34 biofilm formation concomitant with a decrease of c-di-GMP levels. After cadmium exposure an increase in the transcription of the gene *urf2* that codes for a phosphodiesterase and is located in the mercury resistance operons Tn4378 (*urf2.1*) and Tn4380 (*urf2.2*) was observed. Complementation assays with the *urf2.2* gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ mutant null strain that is defective in RocR phosphodiesterase, restored biofilm formation and c-di-GMP intracellular concentration at wild type levels. This is the first evidence of catalytic functionality of the *urf2* gene encoded phosphodiesterase, which was named Mrp por metal regulated phosphodiesterase. In agreement with the biofilm formation inhibition mediated by a c-di-GMP drop in *C. metallidurans*, high levels of this second messenger generated by an active diguanylate cyclase that was heterologously expressed, increased the biofilm formation and cadmium susceptibility of this bacterium.