

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Ústav biochemie

Disertační práce

Brno 2016

Eva Pakostová



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Ústav biochemie



Obsah ATP v bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* při oxidaci železa (II) a síry a exprese vybraných genů za anaerobních podmínek

Disertační práce

Eva Pakostová

Bibliografický záznam

- Autor:** Mgr. Eva Pakostová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie
- Název disertační práce:** Obsah ATP v bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* při oxidaci železa (II) a síry a exprese vybraných genů za anaerobních podmínek
- Studijní program:** Biochemie
- Studijní obor:** Biochemie
- Školitel:** doc. Ing. Martin Mandl, CSc.
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav biochemie
- Rok obhajoby:** 2016
- Počet stran:** 129
- Klíčová slova:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ATP, oxidace síry, oxidace Fe²⁺, aerace, anaerobní respirace, redukce Fe³⁺, reverzně transkripční kvantitativní real-time PCR

Bibliographic entry

Author: MSc. Eva Pakostová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Title of dissertation: Cellular ATP levels in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures oxidizing ferrous iron and elemental sulfur, and expression of selected genes under anaerobic conditions

Degree programme: Biochemistry

Field of study: Biochemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Ing. Martin Mandl, CSc.
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Biochemistry

Year of defence: 2016

Number of pages: 129

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ATP, sulfur oxidation, ferrous iron oxidation, aeration, anaerobic respiration, ferric iron reduction, reverse transcription real-time quantitative PCR

Abstrakt

Pomocí bioluminiscenčního kitu jsme stanovili buněčný obsah ATP v jednorázových kulturách *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidujících dvojmocné železo, elementární síru a další redukované sírné látky. Kromě monitorování množství biomasy analýza buněčného ATP dále odhalila specifické metabolické procesy v biooxidaci síry. Metoda byla nejdříve optimalizována na kyselé podmínky a přítomnost inhibitorů. Maximální hodnota buněčného ATP byla 1,16 amol/buňka pro buňky oxidující železo a 0,33 amol/buňka buňky oxidující síru. Významně nižší obsah ATP ($P < 0.01$) v sírné kultuře byl vysvětlen kontinuální limitací sírným substrátem v důsledku jeho nízké rozpustnosti ve vodě. Po zvýšení pH ve stacionární fázi překvapivě klesl obsah ATP v sírné kultuře. Ačkoliv rychlosti růstu a oxidace se obnovily na původní hodnoty, obsah ATP v kultuře zůstal konstantní v důsledku postupného poklesu buněčného obsahu ATP. Dále byl stanoven buněčný obsah ATP buněk *A. ferrooxidans* vázaných na povrchu elementární síry na 1,01 amol/buňka. Významně nižší hodnota ($P < 0.01$) pro planktonickou buněčnou frakci (0,34 amol/buňka) potvrdila hypotézu limitace sírou v planktonických buňkách. Získané výsledky naznačují, že i procentuálně malá část bakteriální populace může zprostředkovávat interakci nezbytnou pro kooperativní mechanismus, kdy oxidace síry nepočtenými vázanými buňkami poskytuje biodostupné substráty pro planktonické buňky. Naše výsledky definují podmínky, za kterých lze bioluminiscenční kit použít k monitorování růstu biomasy při studiu biogeochemické činnosti acidofilních bakterií oxidujících železo a síru.

Aby byla vyloučena potenciální limitace kyslíkem během oxidace Fe^{2+} a elementární síry, byly definovány podmínky minimální aerace pomocí kritických hodnot koeficientu přestupu kyslíku $(k_{LA})_{\text{crit}}$ a kritických koncentrací kyslíku C_{crit} . Michaelisova konstanta pro kyslík byla 1,07 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ pro oxidaci Fe^{2+} a 0,61 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ pro oxidaci S^0 . Z respirometrických pokusů byla stanovena nejnižší koncentrace kyslíku, která nelimituje rychlost bakteriální respirace, C_{crit} . Pro oxidaci Fe^{2+} byla stanovena na 6,250 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ a pro oxidaci S^0 na 3,125 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$. Byly také určeny rychlosti oxidace železa a síry při C_{crit} sledováním tvorby Fe^{3+} a H^+ v buněčných suspenzích obsahujících příslušný substrát. Ani oxidace Fe^{2+} ani S^0 nebyla při C_{crit} limitovaná kyslíkem. Hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$ potřebná pro udržení kyslíkem nelimitované oxidace substrátu byla 7,70 h^{-1} pro Fe^{2+} a 4,88 h^{-1} pro S^0 .

Pro lepší porozumění mechanismu anaerobní oxidace elementární síry spojené s disimilační redukcí Fe^{3+} u *A. ferrooxidans* byly sledovány profily exprese genů energetického metabolismu. *Cyc2*, *cyc1*, *petA1*, *petC1*, *sdrA1*, *hyp*, *resB*, *petB2*, *petC2*, a *hip* byly indukovány během anaerobního růstu buněk rostlých na Fe^{2+} . Většina genů sírného metabolismu byla exprimovaná na basální hladině nebo byla reprimovaná. Nicméně, hladiny transkripce *hdrA*, *hdrB*, *p14.3*, *p21* a *tth* byly zvýšené na začátku růstu. Na druhou stranu exprese genu *sat* a operonu *sre* byla významně snižena. Potlačení exprese *cyc2*, *cyc1* a *petA1*, *cycA1* a *cycA2* bylo pozorováno v sírných buňkách, které ztratily schopnost anaerobní redukce Fe^{3+} . Navržený mechanismus zahrnuje: protein *Cyc2* na vnější membráně (s předpokládanou funkcí jako terminální Fe^{3+} reduktasa); periplasmatický přenašeč elektronů rusticyanin; cytochrom *c4* *CycA1*; cytochrom *bc1* komplex I na vnitřní membráně; a chinonový pool zajišťující spojení se

sirným metabolismem, který zahrnuje heterodisulfidreduktasu, thiosíran:chinonoxidoreduktasu a tetrathionanhydrolasové komplexy. Nicméně alternativní mechanismus, zdá se zahrnuje vysokopotenciálový železo-sirný protein Hip, cytochrom c_4 C_{yc}A2 a cytochrom bc_1 komplex II na vnitřní membráně. Naše výsledky představují alternativu k mechanismu anaerobního procesu dříve publikované práce a indikují metabolickou variabilitu dráhy v rámci kmenů nebo fenotypů.

Abstract

Cellular ATP content of *Acidithiobacillus ferrooxidans* batch cultures oxidizing ferrous iron, elemental sulfur and other reduced inorganic sulfur compounds, was determined with a bioluminescence assay whose application was optimised for the use in acidophilic conditions. Apart from usage in biomass monitoring, cellular ATP content analysis revealed specific metabolic processes during elemental sulfur biooxidation. The maximum ATP levels in *A. ferrooxidans* grown with Fe^{2+} and S^0 were 1.16 and 0.33 amol per cell, respectively. The significantly ($P < 0.01$) lower ATP content was attributed to a continuous sulfur limitation due to its poor water solubility. The ATP content of sulfur-grown cells decreased anomalously due to a culture pH increase at the stationary phase. Although the rates of growth and sulfur oxidation reached the original levels, the ATP content of the culture remained constant because of gradual decrease in the cellular ATP. Cellular ATP content of *A. ferrooxidans* attached to elemental sulfur surface was determined to be 1.01 amol per attached cell. The significantly ($P < 0.01$) lower ATP content in planktonic cells (0.34 amol per cell) confirmed the hypothesis of sulfur limitation. These results suggest that a negligibly small subpopulation may be a link in cooperative interaction whereby sulfur oxidation by attached cells under boundary conditions provides bioavailable substrates to planktonic cells in the population. The obtained results defined conditions under which biomass growth could be monitored by the ATP assay to study biogeochemical activities of acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacteria.

The critical values of volumetric oxygen transfer coefficient, $(k_{LA})_{\text{crit}}$, and oxygen concentration, C_{crit} , were used to define the conditions necessary for minimum aeration and to eliminate potential oxygen limitation during iron and sulfur oxidation. The Michaelis constants for oxygen were 1.07 and 0.61 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ for the oxidation of ferrous iron and elemental sulfur, respectively. The C_{crit} values, below which oxygen limitation may occur, were 6.250 and 3.125 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$, determined in respirometric experiments for the oxidation of ferrous iron and elemental sulfur, respectively. The rates of iron and sulfur oxidation were also determined at the C_{crit} values by measuring the formation of ferric iron and protons in the corresponding cell suspensions. Neither iron nor sulfur oxidation was limited by oxygen at C_{crit} . The $(k_{LA})_{\text{crit}}$ values required to maintain oxygen-unlimited oxidation of ferrous iron and elemental sulfur were 7.70 and 4.88 h^{-1} , respectively.

To clarify an anaerobic pathway of S^0 oxidation coupled with dissimilatory Fe^{3+} reduction in *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells we monitored their energy metabolism gene expression profiles. *Cyc2*, *cyc1*, *petA1*, *petC1*, *sdrA1*, *hyp*, *resB*, *petB2*, *petC2*, and *hip* were induced during anaerobic growth of Fe^{2+} -grown cells. Most sulfur metabolism genes were either expressed at basal level or their expression declined. However, transcript levels of *hdrA*, *hdrB*, *p14.3*, *p21* and *tth* were elevated at the beginning of the growth period. In contrast, expression of the *sat* gene and *sre* operon was significantly downregulated. Repression of *cyc2*, *cyc1* and *petA1*, *cycA1* and *cycA2* was detected in S^0 -grown cells that had lost anaerobic Fe^{3+} -reducing ability. The main proposed mechanism involves: the outer-membrane protein *Cyc2* (assumed to function as a terminal Fe^{3+} reductase); periplasmic electron shuttle

rusticyanin; *c*₄-type cytochrome CycA1; inner-membrane cytochrome *b*_{C1} complex I; and the quinone pool providing connection to the sulfur metabolism machinery, consisting of heterodisulfide reductase, thiosulfate:quinone oxidoreductase and tetrathionate hydrolase complexes. However, an alternative mechanism seems to involve a high potential iron-sulfur protein Hip, *c*₄-type cytochrome CycA2 and the inner-membrane cytochrome *b*_{C1} complex II. Our results represent an alternative to earlier published findings on an anaerobic process mechanism, indicating strain- or phenotype-dependent pathway variation.

Obsah

Předmluva

1. Teoretický úvod	1
1.1. Acidofilní mikroorganismy	1
1.1.1. Původ a charakteristika extrémně kyselých prostředí	2
1.1.2. Adaptace na kyselé pH	3
1.1.3. Mikrobiální diversita v kyselých prostředích	4
1.2. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	7
1.2.1. Metabolismus uhlíku	7
1.2.2. Metabolismus dusíku a fosforu	8
1.2.3. Metabolismus železa	10
1.2.4. Metabolismus sírných látek	17
1.2.5. Tvorba ATP u bakterie <i>A. ferrooxidans</i>	32
2. Cíle disertační práce	35
3. Materiál a metody	36
4. Souhrn výsledků	38
4.1. Studium změn obsahu ATP v bakterii <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> oxidující Fe^{2+} a S^0	38
4.1.1. Extrakce ATP a inhibiční vlivy	38
4.1.2. Mez stanovitelnosti	40
4.1.3. Oxidace Fe^{2+}	40
4.1.4. Oxidace elementární síry	44
4.2. Kritické hodnoty objemového koeficientu přestupu kyslíku a koncentrace kyslíku pro bakterii <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> oxidující Fe^{2+} a S^0	55
4.2.1. Limitace kyslíkem a kritické hodnoty C_{crit} a $(k_{LA})_{crit}$	57
4.2.2. Kritická koncentrace kyslíku a substrátová oxidace	60
4.3. Transkriptomická analýza vybraných genů během anaerobní oxidace síry u bakterie <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	61
4.3.1. Kinetické parametry anaerobní kultury <i>A. ferrooxidans</i>	62
4.3.2. Analýza hladiny transkripce vybraných genů u bakterie <i>A. ferrooxidans</i> za anaerobních podmínek	63
5. Závěr	72
6. Seznam použité literatury	74
7. Seznam publikovaných prací	94
8. Konferenční příspěvky	95
9. Seznam zkratk	97

Přílohy

Předmluva

Disertační práce se věnuje metabolické aktivitě bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, jež je průmyslově využívána v biohydrometalurgii (biotěžba kovů) a zapojuje se do biogeochemických procesů v prostředí sulfidových minerálů. Studoval se energetický metabolismus bakterií oxidujících Fe^{2+} a síru za aerobních podmínek, jež jsou nejběžnějším prostředím pro činnost bakterií ve spontánních procesech v přírodě i v biotechnologických aplikacích. Limitace kyslíkem může vést k anaerobním podmínkám, kde se uplatňuje biooxidace síry ionty Fe^{3+} za acidifikace prostředí. Studium exprese genů v tomto procesu za využití transkriptomiky přispělo k řešení mechanismu anaerobní oxidace elementární síry ionty Fe^{3+} . Cílem všech částí předkládané práce bylo studium metabolismu acidofilní bakterie ovlivňující biotechnologii těžby kovů i environmentální procesy v prostředí sulfidových minerálů.

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Martinu Mandlovi, CSc. za odborné vedení práce, za cenné informace, rady a připomínky. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Jiřímu Kučerovi, Ph.D. za přínosnou spolupráci a celému kolektivu Ústavu biochemie PřF MU, především pak paní Hedvice Říčánkové. Mé poděkování patří v neposlední řadě mé rodině za podporu v průběhu celého studia.

Autorský podíl na publikacích

Příloha 1

Mgr. E. Pakostová opakovaně ověřila dříve získané závěry se všemi substráty, provedla experimenty na ověření účinnosti extrakce ATP, inhibičních účinků, stanovení buněčného obsahu ATP v kulturách oxidujících železo a síru, a jejich vyhodnocení. Doc. M. Mandl naplánoval experimenty, vedl výzkum, interpretoval výsledky a sepsal rukopis. Dr. Blanka Omesová Pokorná optimalizovala luminiscenční metodu na podmínky acidofilní kultury a dodala prvotní výsledky týkající se kultury oxidující síru. Mgr. E. Divíšková se podílela na úvodní aplikaci komerčního kitu na stanovení ATP v kulturách oxidujících elementární síru. Doc. A. Lojek poskytl dlouhodobé zkušenosti svého kolektivu a podílel se metodicky na našich úvodních aplikacích.

Příloha 2

Mgr. E. Pakostová provedla praktické analýzy, podílela se na plánování, vyhodnocování a interpretaci výsledků. Doc. M. Mandl studii vedl, hodnotil a interpretoval výsledky a sepsal rukopis. Prof. Olli H. Tuovinen spolupracoval na interpretaci výsledků a jazykové úpravě rukopisu.

Příloha 3

Doc. M. Mandl naplánoval výzkum a ve spolupráci s Mgr. E. Pakostovou a Bc. L. Poskerovou provedl experimenty, vyhodnotil výsledky a sepsal rukopis. Mgr. E. Pakostová se podílela zejména přípravou vhodných kultur a ověřením kritických hodnot v bioreaktoru.

Příloha 4

Mgr. E. Pakostová optimalizovala podmínky kultivace anaerobní růstové kultury, připravila vzorky bakteriálních kultur pro transkriptomickou analýzu a na této analýze se u některých sad vzorků podílela. Dr. J. Kučera provedl analýzu profilů transkripce, vyhodnotil a interpretoval výsledky a sepsal rukopis. Dr. J. Lochman naplánoval metodický přístup a podílel se na zpracování výsledků. Doc. O. Janiczek a doc. M. Mandl se podíleli na plánování experimentu, interpretaci výsledků a úpravě rukopisu.

Všichni spoluautoři s uvedenou specifikací podílu na příslušných publikacích souhlasí.

Prohlašuji, že všechny prameny použité k sepsání práce jsou citovány.

28.3.2016

Eva Pakostová

1. Teoretický úvod

1.1. Acidofilní mikroorganismy

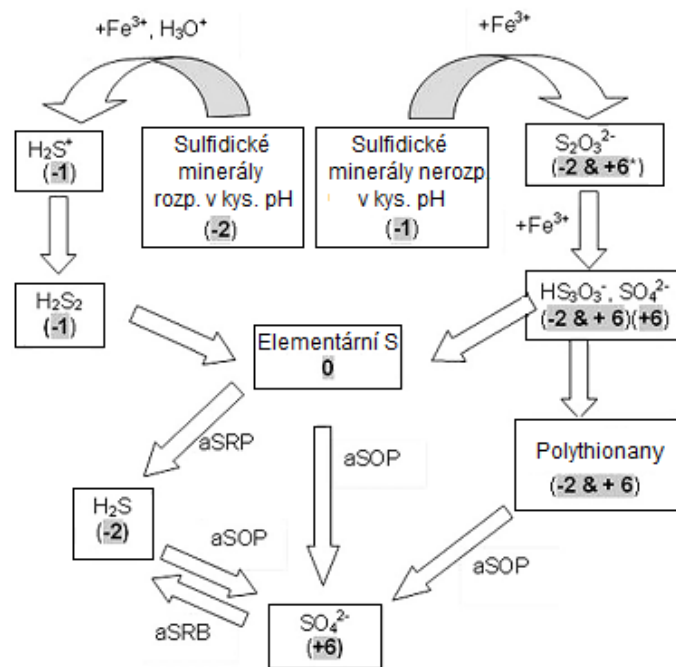
Extrémní prostředí jsou na Zemi velmi rozšířená a pravděpodobně také hrála významnou roli během časných stádií vzniku a vývoje života. Mikroorganismy obývající tato prostředí mají široké využití v průmyslových a biotechnologických aplikacích. Jednou z kategorií extrémních prostředí jsou kyselá prostředí. Přesná definice těchto prostředí je stále otevřená, nicméně obecně jsou extrémní acidofilové definováni jako mikroorganismy s pH optimumem ≤ 3 . Tato definice zahrnuje mnoho autotrofních a heterotrofních organismů spadajících do tří hlavních biologických domén, na druhou stranu vyřazuje mnohé organismy, především houby a kvasinky, které přestože jsou schopny tolerance ke kyselému prostředí, mají pH optimum posunuto blíže k neutrálním hodnotám. Nezahrnutý tak zůstávají například i některé střevní bakterie a lidské patogeny, dále i některé bakterie oxidující síru, jako například *Thiomonas intermedius* (dříve *Thiobacillus intermedius*), který dokáže snížit pH prostředí pod hodnotu 3, ale nedokáže růst, pokud je inokulován do media s pH 3 [Rawlings a Johnson 1998]. pH optimum organismů v kategorii mírných acidofilů leží mezi hodnotami 3 a 5; acidotolerantní mikroorganismy na druhou stranu mají optimum pH nad 5, nicméně jsou stále aktivní i v prostředích s nižším pH [Johnson 2008].

Extrémní acidofilové vykazují širokou škálu metabolických aktivit. Jako skupina zahrnují mikroorganismy využívající sluneční i chemickou energii, anorganické i organické zdroje uhlíku, a aerobní i anaerobní prokaryota. I jejich teplotní optima jsou velmi variabilní, od psychrotolerantních (především bakterií) po termofilní (převážně archea) [Johnson 2012]. Jelikož acidofilní mikroorganismy udržují cytoplasmatické pH blízko neutrálním hodnotám, průmyslově využívané jsou především extracelulární enzymy. Například amylolytické enzymy (amylasy, pululanasy, glukoamylasy a glukosidasy) hydrolyzující škrob a příbuzné polysacharidy našly využití v pekárenství, textilním průmyslu a výrobě sirupů [Bertoldo a Antranikian 2002; Serour a Antranikian 2002]. Dalšími průmyslově široce využívanými skupinami acidofilních enzymů jsou proteasy, celulasy, xylanolytické enzymy a DNA ligasy [Sharma a kol. 2012]. Enzymy termoacidofilů mají využití v produkci biopaliv, textilním průmyslu či výrobě ovocných šťáv.

Přestože jsou v kyselých prostředích hojné i eukaryotické mikroorganismy, genomové informace jsou zatím dostupné pouze pro bakterie a archea. První extremofilní acidofil, jehož genom byl osekvenován, je γ -proteobakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 [Selkov a kol. 2000]. Genomová sekvence *A. ferrooxidans* je dostupná na stránkách TIGRu (<http://www.tigr.org>), a nedávno byla zpřístupněna anotace všech genů (J. Craig Ventner Institute 2007, <http://cmr.tigr.org/>).

1.1.1. Původ a charakteristika extrémně kyselých prostředí

Extrémně kyselá prostředí mohou vznikat přírodními procesy, především pak vulkanickou činností, přičemž jsou anorganické sírné látky vyneseny na povrch, kde jsou autotrofními nebo heterotrofními mikroorganismy oxidovány na kyselinu sírovou ($S^0 + H_2O + 1,5 O_2 \rightarrow H_2SO_4$) [Johnson 1998]. Elementární síra se může vyskytovat také v geotermálních oblastech (např. na okraji fumarol). Kyselá místa v rámci geotermálních a vulkanických oblastí se nejčastěji vyskytují v tzv. solfatárech, což jsou na síru a sulfidy bohatá místa, kde elementární síra může být tvořena kondenzací vulkanických plynů ($SO_2 + 2H_2S \rightarrow 2H_2O + 3S^0$) [Johnson 1998]. Biologická oxidace síry je v horkých oblastech solfatár zprostředkována acidofilními archei, zatímco v chladnějších místech bakteriemi. Extrémní acidita a vysoké teploty vedou k částečné nebo úplné destrukci minerálů v okolí solfatár. S rostoucí teplotou klesá rozpustnost kyslíku, povrchová oxidovaná vrstva často leží na anaerobní vrstvě s vyšším pH, což vede ke koloběhu síry a železa (zahrnující změny oxidačních stavů) mezi těmito dvěma vrstvami.



Obr. 1. Přeměny síry v extrémně kyselých prostředích. aSOP = acidofilní prokaryota oxidující síru, aSRP = acidofilní prokaryota redukující síru, aSRB = acidofilní bakterie redukující síru (nejsoú známa archea, která by zprostředkovávala disimilační redukcí síranu při nízkém pH). Modifikováno dle [Dopson a Johnson 2012].

Extrémně kyselá prostředí bez spojitosti s geotermální aktivitou mohou vznikat v oblastech na sulfidy bohatých podzemních vod. Jestliže se tyto vody dostanou do kontaktu s kyslíkem, jsou mikrobiálně oxidovány na kyselinu sírovou, která rozpouští uhličitánové vrstvy. Pokud nedochází k neutralizaci zásaditými minerály, mohou vznikat rozsáhlé jeskynní komplexy (např. jeskyně Lechugilla v Novém Mexiku, nebo jeskynní komplex Frasassi v Itálii) [Dopson a Johnson 2012].

Analogická situace může vznikat i v městských odpadních systémech vedoucích odpady bohaté na organický materiál obsahující síru. Disimilační redukcí síranu a desulfurylací vzniká sulfan, který kondenzuje na stěnách potrubí a je bakteriemi oxidujícími sulfidy oxidován na H_2SO_4 . V případě betonových odpadních systémů dochází k jejich korozi [Sand 1987]. Přeměny síry v extrémně kyselých prostředích jsou schematicky vyobrazeny na obr. 1.

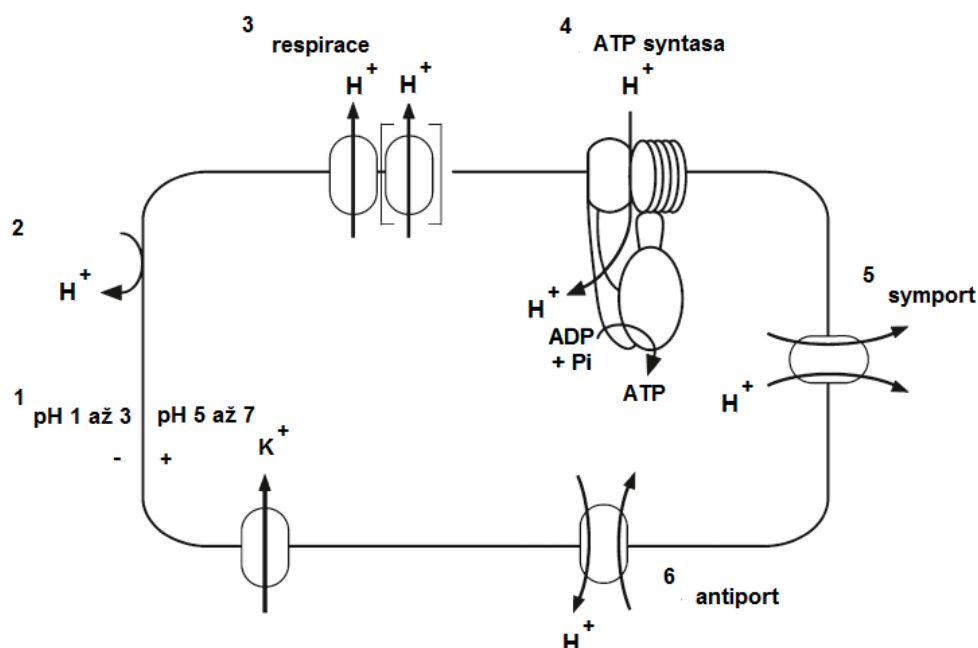
Z antropogenních faktorů podporujících vznik extrémně kyselých prostředí má největší vliv těžba kovů a uhlí. Mnoho kovů, jako měď, zinek a olovo, se v přírodě vyskytuje ve formě sulfidů, ke kterým jsou často přidruženy sulfidy železa (nejčastěji pyrit). Ty během procesu těžby kovů končí coby odpadní materiál. V důsledku těžby jsou tedy sirmé látky exponovány na povrch a během jejich oxidace vzniká znečištění kovy a kyselinou známé jako kyselé důlní vody (acid mine drainage). Biologická oxidace redukovaných anorganických sirmých sloučenin (RISCs) je mnohem rychlejší než chemická. Většina extrémně kyselých prostředí tedy vzniká v důsledku biologické aktivity. K tvorbě extrémně kyselých prostředí přispívá nejen disimilační oxidace elementární síry a RISCs, ale i dvojmocného železa. Železo je hojně zastoupený prvek na povrchu Země, a ačkoliv je rychle oxidováno a v neutrálním pH tvoří nerozpustné sloučeniny, je dobře rozpustné v nízkém pH a hraje tedy důležitou roli v ekologii kyselých prostředí.

Typickou fyzikálně-chemickou vlastností extrémně kyselých prostředí je vysoká koncentrace rozpustných kationických kovů (jako například hliníku či těžkých kovů). Z ekotoxikologického hlediska je významná přítomnost arsenu pocházejícího z arsenopyritu ($FeAsS$) a realgaru (AsS) [Johnson 1998].

1.1.2. Adaptace na kyselé pH

Jelikož nejsou makromolekuly v kyselém prostředí stabilní, jsou acidofilní bakterie a archea nuceny udržovat pH cytoplasmy blízko neutrálním hodnotám (pH 6,0 až 7,2) [Adair 1966; Cox a kol. 1979; Rao a Berger 1971], a to v širokém rozsahu environmentálních a metabolických podmínek [Cobley a Cox 1983].

Ve srovnání s neutrofilny jsou acidofilové schopni tolerovat řádově větší transmembránový pH gradient ($\Delta pH = pH_{in} - pH_{out}$), který u nich tvoří hlavní složkou protonmotivní síly (PMF) [Cobley a Cox 1983; Baker-Austin a Dopson 2007]. Transport protonů skrze ATPasu pro tvorba ATP zvyšuje intracelulární koncentraci protonů a bez kontrolních mechanismů by byl snižován ΔpH a docházelo by ke zvýšené protonaci cytoplasmy [Baker-Austin a Dopson 2007]. Udržování pH homeostázy ještě není plně prozkoumáno, nicméně bylo popsáno několik mechanismů (obr. 2), mezi které patří obrácený membránový potenciál ($\Delta \psi$) na cytoplasmatické membráně acidofilů důsledkem vysoké vnější koncentrace H^+ [Cox a kol. 1979; Hsung a Haug 1977; Matin a kol. 1982], neprostupnost membrán, pufrování cytoplasmy a aktivní vypuzování protonů [Booth a kol. 1985; Matin 1990]. Pokusy s inhibitory respiračního řetězce a rozpojovači ukazují [Cox a kol. 1979; Hsung a Haug 1977; Matin a kol. 1982], že udržování ΔpH není výhradně energií vyžadující proces [Cobley a Cox 1983].



Obr. 2. Obecné schéma mechanismů k udržení pH homeostázy v kyselém vnějším prostředí. 1: Vnitřní pozitivní membránový potenciál (potenciálně generovaný příjmem draslíku) tvořící chemiosmotický gradient, proti kterému jsou protony transportovány do cytoplasmy. 2: Cytoplasmatická membrána je extrémně rezistentní vůči vtoku protonů. 3: Primární protonové pumpy závislé na respiraci odstraňují protony z cytoplasmy. 4: Protony znovu vstupují skrze ATPasu. 5 a 6: K odstranění nadbytku protonů z cytoplasmy slouží sekundární transport. Modifikováno dle [Slonczewski a kol. 2009].

Genomy téměř všech obligátních extrémních acidofilů jsou relativně malé, především ve srovnání s jejich neutrofilními protějšky. Důvodem může být vysoké riziko protonace, které klesá se zmenšující se velikostí genomu [Baker-Austin a Dopson 2007].

Pro rychlé a efektivní opravy biomolekul poškozených nízkým pH obsahují genomy acidofilů množství genů kódujících reparační proteiny [Crossman a kol. 2004]. Zvýšená exprese chaperonů byla detegována u bakterie *Leptospirillum ferriphilum* [Ram a kol. 2005] a Jerez a kol. [1988] zaznamenal upregulaci proteinů reagujících na snížení pH u *A. ferrooxidans*. Amaro a kol. [1991] popsal expresi proteinů podobných heat-shock proteinům indukovanou kyselým pH. Nouailler a kol. [2006] provedl u *A. ferrooxidans* strukturní analýzu vysokopotenciálového železo-sírného proteinu (HiPIP), který zprostředkovává elektrontransportní reakce při nízkém pH. Strukturu rusticyaninu bakterie *A. ferrooxidans*, který je vystavený pH extracelulárního prostředí, popsal Pakchung a kol. [2006].

1.1.3. Mikrobiální diversita v kyselých prostředích

Acidofilové jsou, podobně jako jiní extremofilové, specializované formy života, a mnozí z nich nejsou schopni růstu v neutrálním pH. Většinu tvoří prokaryota zahrnující fylogeneticky odlišné druhy bakterií a archeí (tab. 1), nicméně existuje i významné množství jedno- a mnohobuněčných eukaryotických acidofilů, například řasy, houby, kvasinky, protozoa a vířníci.

Nejtermofilnější z acidofilních mikroorganismů jsou archea (*Crenarchaeota*). V mírně termofilních podmínkách (40 - 60°C) koexistují archea (*Euryarchaeota*) a bakterie (především Gram-pozitivní), zatímco v mesofilních prostředích dominují Gram-negativní bakterie [Johnson 1998].

Schopnost mikroorganismů katalyzovat disimilační redoxní přeměny sirtých látek a železa měla významný dopad na vývoj planety a evoluci [Weber a kol. 2006; Wang a kol. 2011].

Tab. 1. Acidofilní prokaryota. Modifikováno dle [Johnson 1998].

Organismus	Fylogenetická příslušnost (kmen)	Komentář
Prokaryota oxidující železo		
(a) Mesofilní		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Proteobacteria</i>	fakultativně anaerobní
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	<i>Nitrospira</i>	Fe ²⁺ jediný donor e ⁻
<i>Ferromicrobium acidophilus</i>	<i>Actinobacteria</i>	heterotrofní
(b) Mírně termofilní		
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	<i>Firmicutes</i>	autotrofní, mixotrofní, heterotrofní
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	<i>Firmicutes</i>	autotrofní, mixotrofní, heterotrofní
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	<i>Actinobacteria</i>	autotrofní, mixotrofní, heterotrofní
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	<i>Nitrospira</i>	autotrofní
(c) Extrémně termofilní		
<i>Acidianus brierleyi</i>	<i>Crenarchaeota</i>	fakultativně anaerobní
<i>Acidianus infernus</i>	<i>Crenarchaeota</i>	fakultativně anaerobní
<i>Metallosphaera sedula</i>	<i>Crenarchaeota</i>	obligátně aerobní
<i>Sulfurococcus yellowstonii</i>	<i>Crenarchaeota</i>	obligátně aerobní
Prokaryota oxidující síru (neoxidující železo)		
(a) Mesofilní		
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	<i>Proteobacteria</i>	autotrofní
<i>Thiobacillus albertis</i>	<i>Proteobacteria</i>	autotrofní
<i>Thiobacillus acidophilus</i>	<i>Proteobacteria</i>	mixotrofní
<i>Thiomonas cuprinus</i>	<i>Proteobacteria</i>	mixotrofní
<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	<i>Firmicutes</i>	mixotrofní
(b) Mírně termofilní		
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	<i>Proteobacteria</i>	růst při 20-55°C
(c) Extrémně termofilní		
<i>Sulfolobus shibitae</i>	<i>Crenarchaeota</i>	mixotrofní
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>Crenarchaeota</i>	mixotrofní
<i>Sulfolobus hakonensis</i>	<i>Crenarchaeota</i>	mixotrofní
<i>Sulfolobus metallicus</i>	<i>Crenarchaeota</i>	autotrofní
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	<i>Crenarchaeota</i>	
<i>Metallosphaera prunae</i>	<i>Crenarchaeota</i>	mixotrofní
<i>Sulfurococcus mirabilis</i>	<i>Crenarchaeota</i>	mixotrofní
Heterotrofní prokaryota		
(a) Mesofilní		
<i>Acidiphilium</i> spp.	<i>Proteobacteria</i>	některé druhy redukují Fe ³⁺
<i>Acidocella</i> spp.	<i>Proteobacteria</i>	
<i>Acidomonas methanolica</i>	<i>Proteobacteria</i>	methylotrófní
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	<i>Acidobacteria</i>	bohatá exopolymerní vrstva

(b) Mírně termofilní		
<i>Alicyclobacillus</i> spp.	Firmicutes	některé druhy redukují Fe ³⁺
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Euryarchaeota	fakultativně anaerobní
<i>Thermoplasma volcanium</i>	Euryarchaeota	fakultativně anaerobní
<i>Picrophilus oshimae</i>	Euryarchaeota	striktně aerobní
<i>Picrophilus torridus</i>	Euryarchaeota	striktně aerobní
(c) Extrémně termofilní		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Crenarchaeota	
Ostatní		
<i>Stygiolobus azoricus</i>	Crenarchaeota	obligátně aerobní a chemolithotrofní

Mikroorganismy žijící v extrémně kyselých prostředích spolu interagují [Johnson 1998], příkladem je mutualismus autotrofních a heterotrofních acidofilů [Johnson a kol. 2004], nebo synergické rozpouštění pyritu směsnou kulturou bakterií *Leptospirillum ferriphilum* oxidující železo a *Acidithiobacillus caldus* oxidující síru [Johnson 2008]. Konsorcia acidofilních autotrofních prokaryot oxidujících železo a síru tolerantních k iontům kovů jsou komerčně využívána v bioloužení - získávání kovů z rud nebo koncentrátů [Rawlings 2002; Rawlings a Johnson 2007; Rawlings 2005], kdy dochází ke konverzi nerozpustné sloučeniny kovu, obvykle sulfidu (např. CuS, NiS, ZnS), na rozpustnou formu, obvykle síran (např. CuSO₄, NiSO₄, ZnSO₄), za uvolnění kovu do roztoku [Rawlings 2002]. Tyto solubilizační procesy probíhají chemicky, ale mikroorganismy poskytují chemické agens a prostor, kde k rozpouštění dochází (exopolysacharidová vrstva) [Rawlings 2005]. Bioloužení je ve srovnání s tradičními fyzikálně-chemickými metodami ekologičtější způsob zpracování rud, neboť nevyžaduje velké množství energie, nevzniká při něm oxid siřičitý a jiné plynné emise a vznikající odpady jsou méně chemicky aktivní. Je také výhodnější pro extrakci kovů z na kov chudých rud. Tam kde typ horniny a geologické rysy umožňují *in situ* bioloužení, dochází k viditelným finančním úsporám a minimálnímu narušení okolního prostředí [Rawlings 2002; Johnson 2015]. Nicméně používané acidofilní bakterie oxidující síru se podílejí na zvětrávání minerálních sulfidů kovů, které může mít hluboké environmentální dopady [Lovell 1983; Gray 1996].

Bakterie používané v bioloužení mají společné rysy; jsou chemolithotrofní, jako donory elektronů využívají dvojmocné železo anebo RISCs. Jak lze očekávat, jsou tyto bakterie rezistentní ke zvýšeným koncentracím iontů kovů. Přestože mohou využít i jiný akceptor elektronů než kyslík (např. trojmocné železo), obecně rostou lépe ve vysoce aerovaném prostředí [Rawlings 2002]. Acidofilové oxidující železo a síru jsou především autotrofní organismy, vyskytuje se ale i mixotrofní a obligátně heterotrofní růst. Příkladem komerčně používaných mikroorganismů jsou rody *Acidithiobacillus* a *Leptospirillum*.

Studium fyziologie a biochemie chemolithotrofních acidofilů se zaměřuje především na bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidující železo a síru, která spolu s *A. thiooxidans* a *A. caldus* fylogeneticky přísluší do rodu *Acidithiobacillus* blízkého bodu větvení β - a γ -*Proteobacteria* [Lane a kol. 1992; Rawlings 2001].

1.2. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

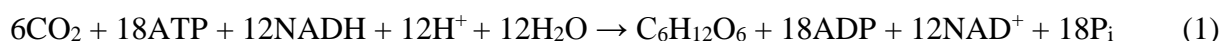
Chemolithotrofní Gram-negativní, acidofilní bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*, dříve *Thiobacillus ferrooxidans*) je γ -proteobakterie, která získává energii oxidací dvojmocného železa, elementární síry, jejích redukovaných sloučenin a sulfidových minerálů [Rawlings 2002]. U některých kmenů byl popsán aerobní růst na H_2 . V genomu *A. ferrooxidans* jsou kódovány 4 typy hydrogenas [Valdes a kol. 2008a]. Ne všechny kmeny nicméně dokážou využívat kyslík jako akceptor elektronů při oxidaci H_2 [Drobner a kol. 1990; Ohmura a kol. 2002]. *A. ferrooxidans* je fakultativní aerob, ale je schopen využít i jiné akceptory než kyslík. Za anaerobních podmínek může získávat energii z chemolithotrofního růstu na H_2/Fe^{3+} , H_2/S^0 [Ohmura a kol. 2002] nebo S^0/Fe^{3+} [Brock a Gustafson 1976; Ohmura a kol. 2002]. *A. ferrooxidans* obecně preferuje teploty v intervalu 20 – 35°C a pH 1,8 – 2,0 [Rawlings 2002]. Jednotlivé kmeny *A. ferrooxidans* vykazují vysoký stupeň genomické a fyziologické diverzity [Harrison 1982; Ageeva a kol. 2001; Karavaiko a kol. 2003; Chen a kol. 2009].

Bakterie je využívána v bioloužení, především k získávání mědi, zlata a uranu [Brierley 1978]. Na rozdíl od většiny heterotrofních bakterií je schopna odolávat vysokým koncentracím těžkých kovů [Dopson a kol. 2003], podrobně byl zkoumán genetický základ resistance ke rtuti a arsenu [Shiratori 1989; Butcher a kol. 2000] a Holmes a kol. [2001] předpověděli u této bakterie přítomnost genů resistance ke kovům. Organismus je dále využíván pro biologickou desulfurizaci uhlí [Acharya a kol. 2004].

1.2.1. Metabolismus uhlíku

Autotrofní fixace CO_2 představuje nejdůležitější biosyntetický proces v přírodě [Berg 2011]. Existuje velké množství taxonomicky rozmanitých bakterií a archeí fixujících CO_2 do organických sloučenin uhlíku. Je známo celkem šest drah fixace CO_2 – Calvin-Benson-Basshamův cyklus (CBB), reduktivní cyklus trikarboxylových kyselin (TCA), reduktivní dráha acetyl-CoA, 3-hydroxypropionát / malyl-CoA dráha, 3-hydroxypropionát / 4-hydroxybutyrátový cyklus a dikarboxylát / 4-hydroxybutyrátový cyklus [Berg 2011; Saini a kol. 2011].

Autotrofní bakterie jako *Acidithiobacilli* získávají uhlík pro syntézu buněčné biomasy fixací vzdušného CO_2 Calvin-Benson-Basshamovým cyklem (rovnice (1)) [Kelly 1999].



Ačkoliv to vypadá, že dominantní dráhou fixace CO_2 u mikroorganismů je CBB cyklus, v bioloužících procesech uskutečňovaných při vysokých teplotách ve skutečnosti dominují reverzní TCA cyklus a modifikovaný 3-hydroxypropionanový cyklus [Valdes a kol. 2010]. CBB cyklus je využíván pouze organismy s vysokými energetickými výtěžky z chemotrofního nebo fototrofního metabolismu. Mikroorganismy v extrémních prostředích

často využívají jiné dráhy fixace CO₂ [Hügler a kol. 2005], ale CBB cyklus se jeví, na základě množství fixovaného CO₂ vztaženého na jednotku oxidovaného substrátu (Fe²⁺), jako účinnější než reverzní trikarboxylový cyklus [Bryan a kol. 2012].

U rodu *Leptospirillum* absence genů kódujících enzymy CBB cyklu naznačuje existenci reduktivního TCA cyklu, což je v podstatě Krebsův cyklus běžící reverzním směrem [Levican a kol. 2008].

V kyselých prostředích dosahují koncentrace rozpuštěného anorganického uhlíku hodnot nižších, než jsou průměrné hodnoty v atmosféře. Není překvapivé, že byly u acidofilních mikroorganismů identifikovány mechanismy, které umožňují zakoncentrování CO₂. Mnoho chemolithotrofních bakterií využívá transportéry HCO₃⁻ [Badger a Price 2003] nebo CO₂ pasti zvyšující jeho intracelulární koncentraci. *A. ferrooxidans* reaguje na limitaci uhlíkem zvýšením počtu karboxysomů a buněčné koncentrace klíčového enzymu Rubisca [Codd a Kuenen 1987]. Kromě nedávno objevených forem III a IV existují dvě strukturálně odlišné formy Rubisca (I a II) s rozdílnými katalytickými vlastnostmi. Převažující typ I se vyskytuje u rostlin, řas, cyanobakterií a většiny chemoautotrofů [Atomi 2002]. Skládá se z 8 velkých (katalytických) a 8 malých podjednotek tvořících hexadekamer L₈S₈ a *A. ferrooxidans* obsahuje dvě kopie genů formy I [Heinhorst a kol. 2002; Esparza 2009]. Typ II byl na druhou stranu nalezen u pouze relativně malého množství bakterií [Atomi 2002] a skládá se z různého počtu velkých podjednotek (L_n) [Appia-Ayme a kol. 2006]. *A. ferrooxidans* obsahuje jednu kopii genů pro Rubisco typu II [Esparza 2009]. Autotrofové většinou obsahují oba typy Rubisca (I a II), což jim umožňuje vysokou flexibilitu fixace CO₂ v širokém rozmezí koncentrací CO₂ [Bryan a kol. 2012].

V literatuře je uvedeno mnoho příkladů násobných sad genů pro Rubisco, jejichž exprese je závislá na koncentraci CO₂. Na genomu *A. ferrooxidans* bylo nalezeno 5 *cbp* genových klastrů s násobnými kopiemi formy I a kopií formy II [Esparza 2009; Esparza a kol. 2010]. Násobné formy a kopie genů pro Rubisco umožňují bakterii rychle reagovat na změny v koncentracích CO₂ a O₂ [Levican a kol. 2008; Bryan a kol. 2012] a přítomnost formy II zvyšuje schopnost bakterie fixovat CO₂ v různých koncentracích CO₂ [Esparza a kol. 2010]. Appia-Ayme a kol. [2006] popsali zvýšenou expresi genů zapojených ve fixaci CO₂ u *A. ferrooxidans* kultivovaného na sírném médiu ve srovnání s buňkami rostoucími na Fe²⁺, což naznačuje regulaci hospodaření s uhlíkem v odpovědi na změny prostředí.

A. ferrooxidans je považován za obligátního autotrofa, ale je schopen využívat kyselinu mravenčí jako zdroj uhlíku, pokud je v dostatečně nízké koncentraci [Pronk 1991b]. Mravenčan může být po zlyzování asimilován stejnou cestou jako CO₂.

1.2.2. Metabolismus dusíku a fosforu

Dusík je po uhlíku druhý nejdůležitější prvek pro syntézu buněčné biomasy. Jako hlavní zdroje dusíku pro mikroorganismy v jejich přirozených prostředích slouží amoniak, dusičnan, dusitan a glutamin. V případě nízké koncentrace dusíku mohou diazotrofní bakterie fixovat

atmosférický dusík za anaerobních nebo mikroaerobních podmínek činností nitrogenasového komplexu [Levicán a kol. 2008].

U *A. ferrooxidans* byly identifikovány geny pro nitrogenasu (*nif*HDK) [Mackintosh 1978; Pretorius a kol. 1987; Rawlings 1988], pro amoniakpermeasu (*amt*) a geny kódující regulační proteiny NtrC a NifA (specifické aktivátory *nif* genů). Byly identifikovány i geny (*GlnK-I*) kódující regulační PII protein, který hraje kontrolní roli v metabolismu dusíku a jeho napojení na metabolismus uhlíku [Ninfa a Jiang 2005; Forchhammer 2004]. Schopnost redukovat atmosférický dusík na amoniak je pravděpodobně obecnou vlastností mnoha kmenů *A. ferrooxidans*. *A. thiooxidans* asimiluje amoniak, dusičnan (geny pro dusičnanreduktasu *narB*) a dusitan (geny pro dusitanreduktasu *nirBD*), ale pouze *A. ferrooxidans* je schopen fixovat dusík přímo ze vzduchu [Levicán a kol. 2008; Mackintosh 1978]. Příjem dusíku je energeticky náročný, je proto přísně regulován systémem NifLA [Leigh a Dodsworth 2007; Sperotto a kol. 2004]. U *A. ferrooxidans* nebyl zatím nalezen analog *nifL*, regulace může být tedy odlišná od ostatních γ -proteobakterií [Levicán a kol. 2008].



Obr. 3. Schematický diagram genů dusíkatého metabolismu *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Geny fixace dusíku *nif*HDK, nitrogenasového proteinu *fdxD-fdx-nifN-nifE* a regulace asimilace dusíku *nifA* a *draGT* [Levicán a kol. 2008].

Anorganický fosfor je nepostradatelný prvek pro všechny živé buňky, neboť je nezbytnou součástí buněčných struktur a metabolismu. Bakterie asimilují P_i a akumulují různé sloučeniny obsahující fosfor, například polyfosforečnany (polyP) [Vera a kol. 2008]. *A. ferrooxidans* má schopnost kumulovat polyfosforečnanová granula ve velkém množství [Orell a kol. 2012]. Polyfosforečnanům byly přiřazeny četné fyziologické funkce; nejenže slouží jako rezervoár fosforečnanu a rezerva energie, donor fosforýlu v kinasových reakcích, chelátor kovů, mají osmotickou funkci, podílí se na motilitě, tvorbě biofilmu, quorum sensing a virulenci [Kornberg a kol. 1999; Rao a Berger 2009; Varela a kol. 2010], ale uskutečňují také adaptaci buňky na stres a environmentální změny [Crooke a kol. 1994; Tsutsumi a kol. 2000; Kim a kol. 2002]. U *A. ferrooxidans* byly identifikovány geny pro polyfosforečnankinasu (katalyzující syntézu polyP) i exopolyfosfatasu (katalyzující hydrolýzu polyP) [Vera a kol. 2003]. U některých bakterií a řas byla navržena hypotéza, že se hydrolýza anorganických polyP a transport metalofosforečnanových komplexů mohou podílet na toleranci k těžkým kovům [Aiking a kol. 1984; Keasling a kol. 1997]. Alvarez a Jerez [2004] pozorovali při zvýšené koncentraci mědi, kadmia a zinku u *A. ferrooxidans* rychlý pokles hladiny polyP doprovázený vzrůstem exopolyfosfátové aktivity a stimulací efluxu fosforečnanů [Alvarez a Jerez 2004].

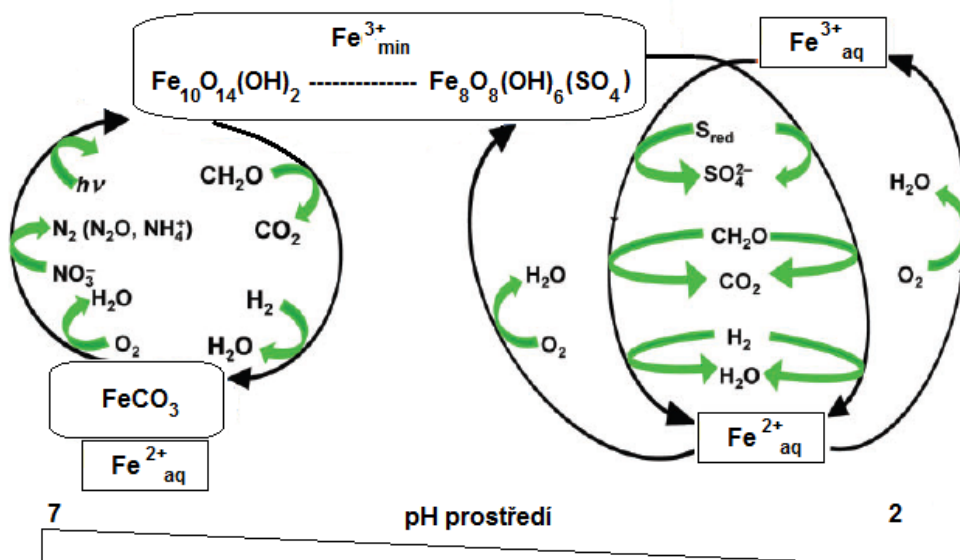
Ačkoliv primárním zdrojem fosforu pro mikroorganismy je P_i , některé bakterie metabolizují i P_i estery (vazba C-O-P) a fosfonáty (inertní vazba C-P) [Vera a kol. 2008]. *A. ferrooxidans* má, jako součástí regulonu Pho indukovaného při P_i hladovění kompletní genový klast (phn geny) kódující i C-P lyasu, která je u ostatních mikroorganismů hlavní enzym degradace fosfonátů [Vera a kol. 2003].

1.2.3. Metabolismus železa

1.2.3.1. Biogeochemický cyklus železa

Železo je (hmotnostně) nejhojnější prvek na Zemi a druhý nejčastěji se vyskytující kov v litosféře, kde se jeho průměrná koncentrace pohybuje kolem 5 %. Vyskytuje se v mnoha minerálech, včetně oxidů, uhličitanů, křemičitanů a sulfidů [Hedrich a kol. 2011]. Kromě toho, že je železo důležitou nutriční složkou téměř všech forem života, některé bakterie a archea mohou železo využívat jako zdroj energie, což je pro ostatní formy života nedostupné. Některé fotosyntetizující bakterie oxidují Fe^{2+} při anoxygenní fotosyntéze, jiné bakterie přenášejí elektrony z organických látek na Fe^{3+} při heterotrofní respiraci nebo fermentaci. Mikrobiální metabolismus železa dal před miliardami let vznik depositům železa [Bird a kol. 2011], a vzhledem k tomu, že je železo čtvrtý nejhojnější prvek v zemské kůře, jeho redoxní reakce mají potenciál podporovat významný podíl mikrobiální biomasy a hrají významnou úlohu v mnoha prostředích [Weber a kol. 2006].

Biogeochemický cyklus železa sestává z redukčních a oxidačních, abiotických a biotických procesů. Výrazně ovlivňuje geochemii hydromorfních půd a sedimentů, způsobuje mineralizaci organických látek, má vliv na vznik, rozpouštění a zvětrávání minerálů, mobilizaci a imobilizaci aniontů a kationtů, včetně kontaminant [Stumm a Sulzberger 1992; Chaudhuri a kol. 2001; Lack a kol. 2002]. Na obr. 4 je zobrazen mikrobiálně zprostředkovaný redoxní cyklus železa.



Obr. 4. Mikrobiálně zprostředkovaný redoxní cyklus železa v neutrálních a kyselých prostředích. Modifikováno dle [Hedrich a kol. 2011].

Fe^{3+} je v aerovaných vodách termodynamicky stabilní, nicméně má silný sklon hydrolyzovat. Ve vodných prostředích tedy bývají jeho koncentrace velmi nízké, avšak mohou vzrůstat

v přítomnosti komplexujících látek. Protože je rozpustnost Fe^{3+} ovlivňována pH, v kyselých vodách může být jeho koncentrace výrazně zvýšená [Hedrich a kol. 2011]. Redukce železitých minerálních oxidů probíhá i abioticky, ale primárně se na ní podílí mikrobiální katalýza [Lovley 1993, Lovley a kol. 2004]. Tam kde dochází k mikrobiální redukci síranů, může být abiotickým reductantem biogenní H_2S . Redukcí je generováno Fe^{2+} , vyskytující se jak v roztoku, tak jako součást minerálů (např. siderit nebo vivianit), včetně sloučenin se směsnou valencí (magnetit) [Lovley 1991; Ona-Nguema a kol. 2002; Kukkadapu a kol. 2001].

Oxygenní abiotická oxidace Fe^{2+} probíhá reakcí s molekulárním kyslíkem, anoxygenní může být zprostředkována např. reakcí s Mn^{4+} [Weber a kol. 2006]. Ve většině prostředí je při $\text{pH} < 4$ rychlost spontánní chemické oxidace Fe^{2+} velmi nízká, avšak při vyšším pH se výrazně zvyšuje [Hedrich a kol. 2011]. Jednotlivými skupinami bakterií a archeí, které oxidují Fe^{2+} , se zabývají ve svých review například Hedrich a kol. [2011] a Ilbert a Bonnefoy [2013]. Přírodním substrátem acidofilních bakterií bývají minerály, např. pyrit (FeS_2) nebo chalkopyrit (CuFeS_2), které jsou výrazně rozpustnější než železité oxyhydroxidy. Výhodou tohoto typu oxidace je fakt, že standardní elektrochemický potenciál páru $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ roste v nízkém pH a tím roste dostupná potenciální energie [Bird a kol. 2011].

1.2.3.2. Oxidace železa

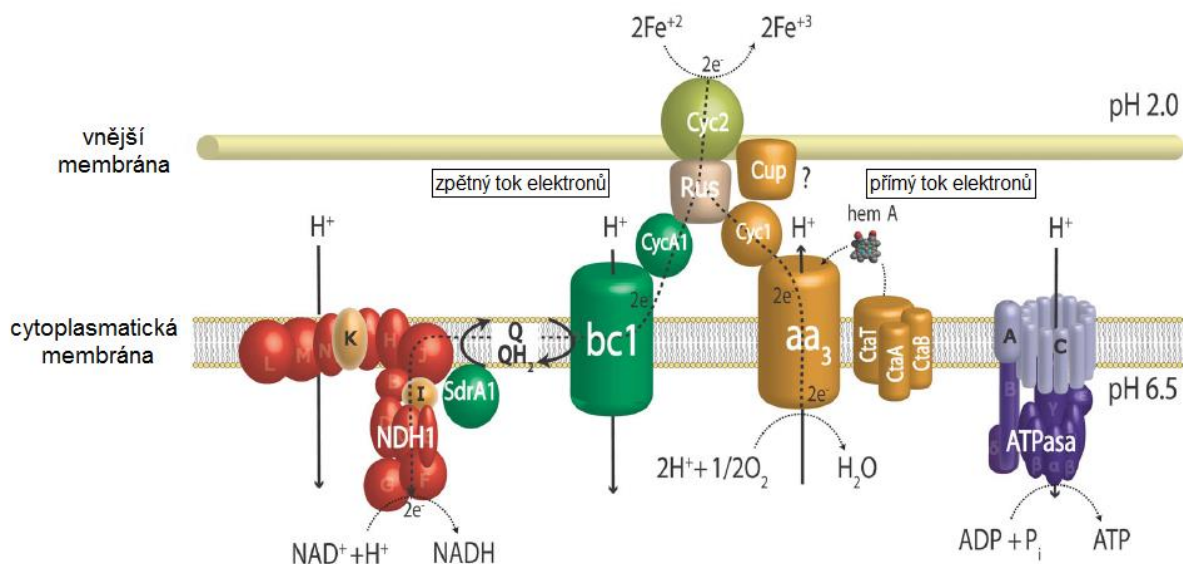
Ačkoliv jsou dráhy oxidace Fe^{2+} studovány u více acidofilních bakterií, nejlépe prostudovaná je u *A. ferrooxidans* [Bonnefoy a Holmes 2012]. Při oxidaci dvojmocného železa *A. ferrooxidans* je dvojmocné železo oxidováno na trojmocné (rovnice (2)):



Železo není kvůli rychlé autooxidovatelnosti a nerozpustnosti produktu [Ingledeew a kol. 1977] transportováno přes buněčnou stěnu, ale zůstává vně buňky a každý Fe^{2+} doručí svůj elektron přenašeči umístěnému na buněčném povrchu [Rawlings 2005]. Standardní elektrochemický potenciál páru $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ je vysoce pozitivní (+0,77 V při pH 2), pouze kyslík ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ +1,12V při pH 2) tak může fungovat jako akceptor elektronů. V přítomnosti protonů je produktem voda. Rozdíl mezi redoxními potenciály párů $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ a $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ je malý, proto také energie dostupná z oxidace Fe^{2+} je nízká [Ingledeew 1982; Bird a kol. 2011].

Geny kódující oxidaci železa jsou organizovány ve dvou transkripčních jednotkách - operonech *petI* a *rus* [Valdes 2008b]. Operon *petI* (*petC1*, *petB1*, *petA1*, *sdrA1* a *cycA1*) kóduje tři podjednotky cytochrom *bc*₁ komplexu (PetA1B1C1), predikovanou dehydrogenasu neznámé funkce s krátkým řetězcem (SdrA1) a cytochrom *c*₄, který přijímá elektrony z rusticyaninu. *Rus* operon (*cyc2*, *cyc1*, *acoP*, *coxB*, *coxA*, *coxC*, *coxD* a *rus*) kóduje dva nízkomolekulární mědné periplasmatické proteiny rusticyanin a cupredoxin AcoP, dva cytochromy *c* (Cyc1 a Cyc2) a cytochrom *aa*₃ oxidasu (*coxBACD*) [Appia-Ayme a kol. 1998, 1999]. Exprese genů *rus* operonu byla zjištěna 5 až 25 × vyšší během růstu na železe

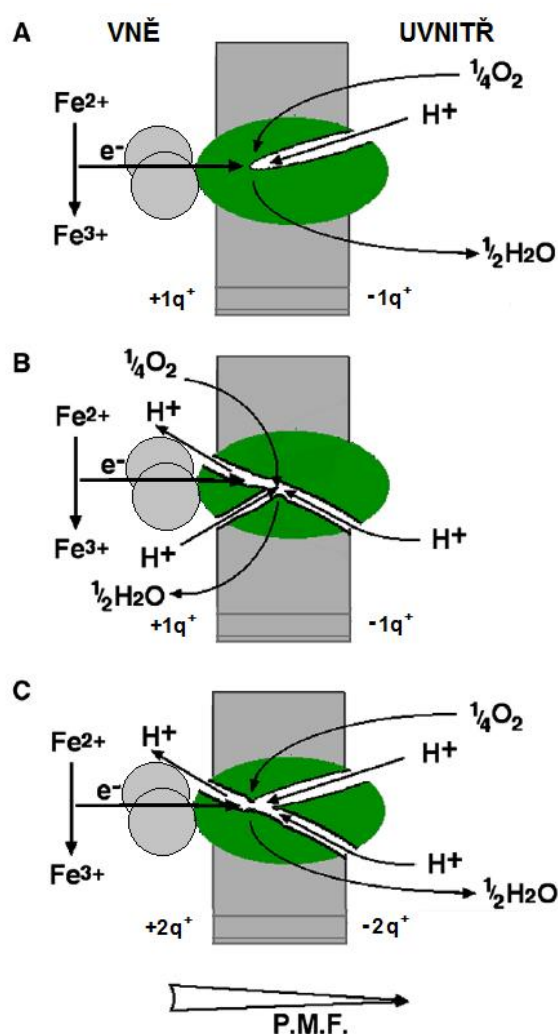
než při růstu na síře [Yarzabal a kol. 2004]. Obr. 5 ukazuje jeden z navržených modelů mechanismu oxidace železa u *A. ferrooxidans*. Přímý transport elektronů z Fe^{2+} na O_2 zahrnuje rusticyanin, který je redukován cytochromem *c* (Cyc2) lokalizovaným na vnější membráně [Yarzabal a kol. 2002; Elbehti a kol. 1999]. Rusticyanin tedy funguje jako rezervoár elektronů tím způsobem, že soustředí elektrony dostupné na buněčné stěně do respirační dráhy [Rohwerder a kol. 2003]. Většina elektronů jde dále přímým tokem přes cytochrom *c*₄ (Cyc1) [Quatrini 2006; Bruscella a kol. 2007; Brasseur a kol. 2004], který redukuje terminální cytochrom *aa*₃ oxidasu [Cavazza a kol. 1995; Fukumori a kol. 1988] a ta následně kyslík [Appia-Ayme a kol. 1998, 1999; Quatrini a kol. 2009; Yarzabal a kol. 2002, 2004]. Translokace protonů terminální oxidasou, spolu se spotřebou protonů na redukcii O_2 v cytoplasmě, pomáhá buňce neutralizovat protony, které vstupují do buňky skrze ATPasu, a tedy udržovat velký rozdíl mezi koncentrací protonů v cytoplasmě (pH 6,5) a periplasmě (pH 2) [Bird a kol. 2011; Bonnefoy a Holmes 2012].



Obr. 5. Model oxidace Fe^{2+} u *A. ferrooxidans*. Cyc2, Cyc1 a CycA1 = cytochromy *c*; Rus = rusticyanin; Cup/AcoP = cupredoxin; *aa*₃ = cytochrom *aa*₃ oxidasa; CtaABT = integrální membránový protein podílející se na regulaci a syntéze cytochrom *aa*₃ oxidasy; *bc*₁ = cytochrom *bc*₁ komplex I; Q/QH₂ = chinonový pool; SdrA1 = dehydrogenasa neznámé funkce s krátkým řetězcem; NDH1 = NADH dehydrogenasa. Modifikováno dle [Quatrini a kol. 2009].

Autotrofové oxidující železo získávají oxidací železa nejen energii ale i redukční ekvivalenty v podobě redukováného NAD(P)^+ potřebného pro fixaci CO_2 , a v případě potřeby N_2 [Bird a kol. 2011]. Hodnota redoxního potenciálu páru $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ (-0,32 V při pH cytoplasmy 6,5) je podstatně negativnější než páru $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ a redukce NAD(P)^+ je tedy zprostředkována zpětným tokem elektronů vyžadujícím energii [Brasseur a kol. 2002, 2004; Bruscella a kol. 2007; Elbehti a kol. 2000; Levican a kol. 2002], kdy jsou elektrony z rusticyaninu přenášeny přes cytochrom *c*₄ (kódovaný genem *cycA1*) [Giudici-Ortoni a kol. 2000; Quatrini 2006; Bruscella a kol. 2007], cytochrom *bc*₁ komplex I [Corbett a Ingledew 1987; Elbehti a kol. 1999, 2000], membránový chinonový pool [Brasseur a kol. 2004], na NADH dehydrogenasu. U *A. ferrooxidans* byly identifikovány dva cytochrom *bc*₁

komplexy kódované dvěma různými operony (*petI* a *petII* operon). Experimentálně bylo prokázáno, že *petI* je transkribován výhradně v buňkách rostoucích na železe, zatímco *petII* v buňkách oxidujících síru nebo železo [Bruscella a kol. 2007]. Za zmínku stojí, že při oxidaci Fe^{2+} cytochrom bc_1 komplex I, kódovaný *petI* operonem, slouží výhradně zpětnému toku elektronů [Brasseur a kol. 2002; Elbehti a kol. 2000], zatímco při oxidaci elementární síry jsou elektrony vedeny v přímém směru přes cytochrom bc_1 komplex II kódovaný *petII* operonem [Brasseur a kol. 2004]. Lefimil a kol. [2009] navrhl, že exprese *petI* operonu je regulována hlavními transkripčními faktory řídícími příjem a homeostázu železa (Fur) a anaerobní metabolismus (Fnr). *A. ferrooxidans* je první organismus, u kterého byly popsány dva cytochrom bc_1 komplexy [Bruscella a kol. 2007].



Obr. 6. Schéma generace protonmotivní síly (PMF) u bakterie *A. ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} . Zeleně je označena cytochrom *c* oxidasa. (A) Oxidasa bez aktivity protonové pumpy; k přenosu nábojů $1q^+/e^-$ dochází pohybem elektronů. (B) Oxidasa se zachovanou aktivitou protonové pumpy; dochází k přenosu nábojů $1q^+/e^-$. (C) Oxidasa se dvěma protonovými kanály; dochází k přenosu nábojů $2q^+/e^-$. Modifikováno dle [Ferguson a Ingledew 2008].

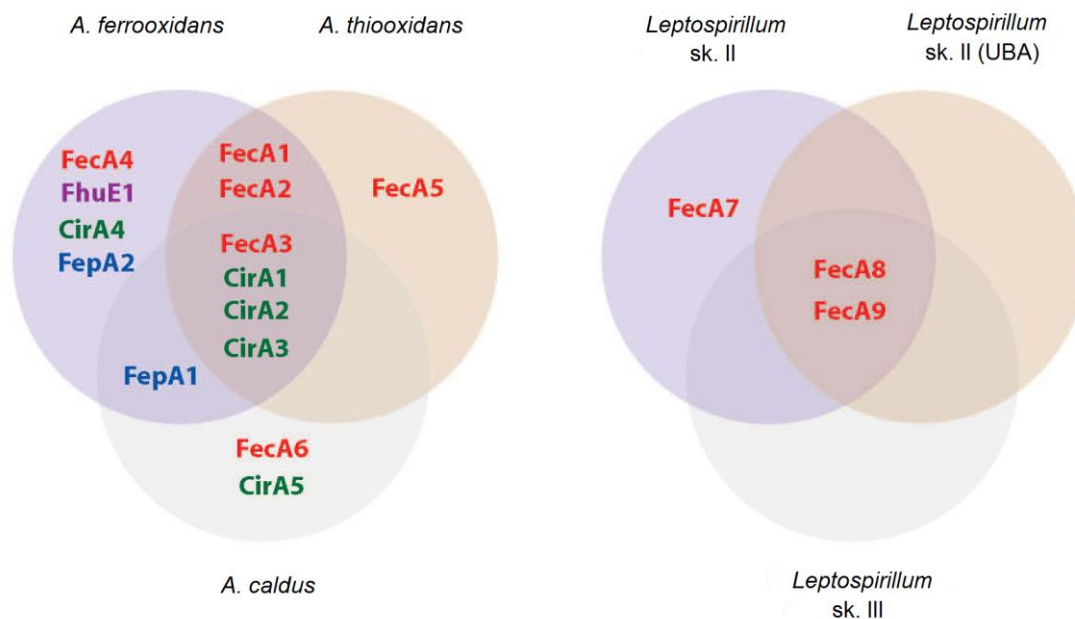
Obr. 6 zobrazuje modely konzervace energie, pro zjednodušení pro přenos 1 elektronu na $\frac{1}{4} \text{O}_2$. Zobrazená je protonmotivní síla (PMF) generována činností cytochrom *c* oxidasy během oxidace Fe^{2+} . Na obr. 6A je model navržený Ingledewem a kol. [1977]. PMF je zajištěna transmembránovou separací dvou polovičních reakcí (oxidace Fe^{2+} a redukce O_2), které se účastní cytochrom *c* oxidasa (zde cytochrom *aa₃*) bez dalšího pumpování protonů. Alternativní model se stejnou bioenergetikou, kdy je stejného výsledku dosaženo ne rozdělením na dvě poloviční reakce, ale pumpováním protonů přes membránu, je zobrazen na obr. 6B. Modely A a B, kde na jeden elektron přenesený z Fe^{2+} je přenesen jeden proton, kontrastují s modelem C (obr. 6C) zobrazujícím typickou cytochrom *c* oxidasu, která má separované reakce i pumpuje protony a má tedy k dispozici větší redoxní potenciál. Při přenosu jednoho elektronu na O_2 jsou přeneseny vně buňky dva protony. Na obrázku jsou zobrazeny oba kanály pro průchod protonů (K a D kanály). Experimentálně naměřené hodnoty PMF (kolem 200 mV) naznačují stechiometrii translokace nábojů jeden proton na jeden elektron (modely A a B). Není však vyloučeno, že PMF je nižší anebo dostupná redoxní energie je větší, než bylo odhadnuto, a je tedy možné, že terminální oxidasa má přece jen dost energie na pumpování elektronů dle modelu C (obr. 6C) [Ferguson a Ingledew 2008].

1.2.3.3. Homeostáza železa

Nadbytek železa v kyselých prostředích zvyšuje oxidativní stres skrze Haber-Weiss-Fentonovu reakci, kterou vznikají reaktivní formy kyslíku. Mnoho enzymů a kofaktorů zprostředkovává detoxifikaci organismu; proteiny z proteinové rodiny Dps jsou zapojeny do ochrany DNA před poškozením volnými radikály železa [Andrews a kol. 2003]. Pro *A. ferrooxidans* byly navrženy orthology proteinů FieF a MamB zajišťujících eflux nadbytečného železa u *E. coli* [Grass a kol. 2005] a *Magnetospirillum gryphiswaldense* [Grunberg a kol. 2001]. Pro *A. ferrooxidans* byly označeny CdfA-C proteiny [Osorio 2008]. Klíčovým způsobem jak snižovat produkci radikálů, je však snížení dostupnosti intracelulárního železa. Homeostázy železa je dosahováno sledováním hladiny železa, regulací jeho příjmu a ukládání nadbytku do zásobních proteinů [Quatrini a kol. 2005a]. Organismy oxidující Fe^{2+} musí do rovnováhy zahrnout příjem a skladování železa nejen jako mikroživinu hrající centrální roli v redoxních reakcích, ale i pro energetické potřeby [Bonney a Holmes 2012].

U rodu *Leptospirillum*, bakterie obligátně oxidující Fe^{2+} , byl popsán nízký počet přenašečů železa, pravděpodobně proto, že se vyskytuje v prostředích s vysokou koncentrací rozpustného Fe^{2+} [Andrews a kol. 2003]. Na druhou stranu u rodu *Acidithiobacillus* byla zjištěna přítomnost vícečetných systémů příjmu železa (obr. 7) [Osorio a kol. 2008a; Valdes a kol. 2008a]. Na rozdíl od rodu *Leptospirillum*, uspořádání *A. ferrooxidans* by mohlo být adaptací na různé koncentrace železa, včetně méně kyselých prostředí (pH 4-5), kde je nedostatek rozpustného železa. Přítomnost vícečetných systémů pro příjem Fe^{3+} by mohla na druhou stranu vysvětlovat, proč v dlouhotrvajících bioloužících procesech, kde je poměr

Fe³⁺ ku Fe²⁺ velmi vysoký, dominuje *Leptospirillum* nad *Acidithiobacillus* [Quatrini a kol. 2005a].



Obr. 7. Sideroforové přenašeče pro Fe³⁺ u rodů *Acidithiobacillus* a *Leptospirillum*. Specificita sideroforů: červeně – dicitrát, zeleně – lineární katecholáty, modře – cyklické katecholáty, fialově - hydroxamáty [Osorio 2008].

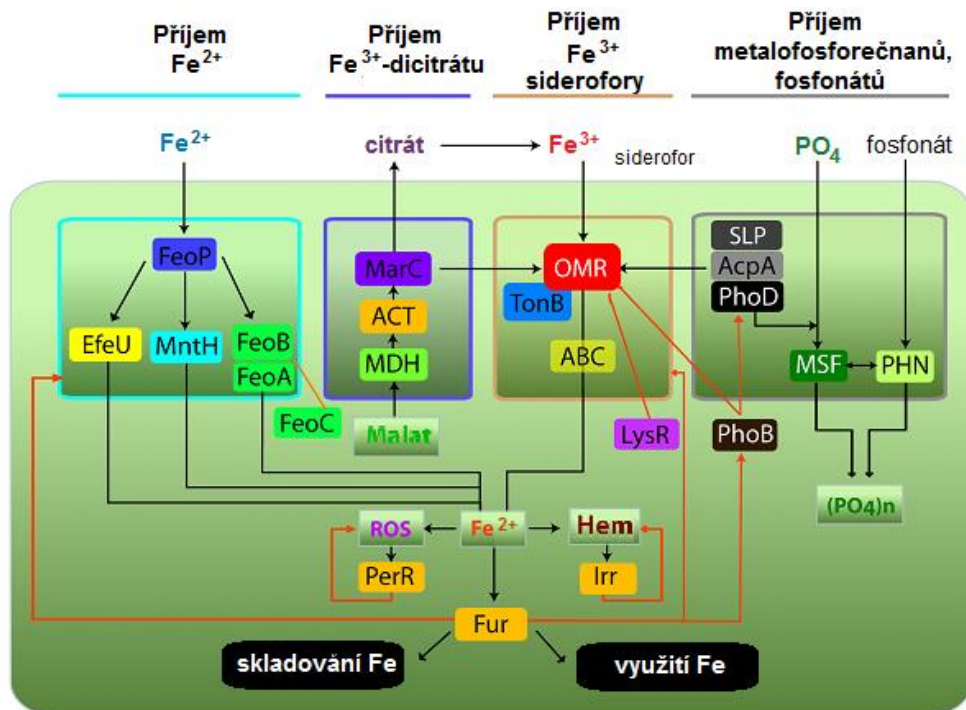
Transport železa přes membránu je poháněn PMF na vnitřní membráně a energií transdukčního komplexu TonB s integrálními proteiny ve vnitřní membráně ExbB a ExbD [Braun 1995]. V genomu *A. ferrooxidans* bylo předpovězeno šest domnělých kandidátních proteinů v třídě TonB, a ve srovnání s neutrofilny vykazuje ExbD výrazně vyšší pI [Quatrini a kol. 2005a].

Jakmile se Fe³⁺ dostane do cytoplasmy, je zredukováno na Fe²⁺ a následně inkorporováno do proteinů a hemů, případně uskladněno pro pozdější použití do bakterioferritinu. *A. ferrooxidans*, ale i *A. thiooxidans* a *A. caldus*, mají pro tento protein kandidátní geny. Další běžný protein sloužící bakteriím pro uskladňování železa, hem neobsahující protein ferritin, nebyl detegován [Quatrini a kol. 2005a].

1.2.3.4. Regulace oxidace a homeostázy železa

Pro udržení homeostázy železa je zásadní citlivá regulace jeho příjmu, skladování a využití [Crosa 1997; Hantke 2001]. O genetické regulaci oxidace a udržování homeostázy Fe²⁺ je známo poměrně málo. Je pravděpodobné, že ani redoxní ani Fe²⁺ sensory nepůsobí izolovaně. Předpokládány jsou komplexní regulační sítě, které zohledňují mnoho různých signálů

z prostředí [Bonneyfoy a Holmes 2012]. Předpokládá se koregulace příjmu železa s geny pro biosyntézu citrátu a metabolismus fosforečnanů (obr. 8).



Obr. 8. Různorodost způsobů příjmu železa a jejich regulace u acidofilů. Modře – příjem Fe^{2+} , fialově – příjem Fe^{3+} -dicitrátu, červeně – příjem Fe^{3+} siderofory, zeleně a černě – příjem metalofosforečnanů /fosfonátů. Oranžové šipky – regulační souvislosti. Modifikováno dle [Osorio a kol. 2008a].

Elbethi a kol. [2000] navrhl, že oxidace Fe^{2+} je regulována poměrem ATP/ADP, který na jednu stranu aktivuje cytochrom aa_3 oxidasu a podporuje tak přímý tok elektronů, nebo ji na druhou stranu deaktivuje a podporuje zpětný tok elektronů. *A. ferrooxidans* navíc reguluje enzymy a elektronové přenašeče v závislosti na tom, zda je substrátem Fe^{2+} nebo RISC [Yarzabal a kol. 2004; Bruscella a kol. 2007; Quatrini a kol. 2009].

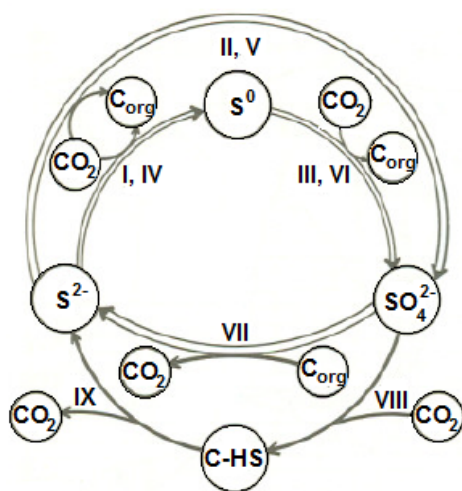
Mezi kandidátními geny zahrnutými v regulaci oxidace Fe^{2+} (obr. 8) jsou regulátor anaerobiózy Fnr [Osorio a kol. 2009] a hlavní regulátor homeostázy (příjmu a skladování) železa, genová rodina Fur (ferric iron regulator) [Quatrini a kol. 2005b; Lefimil a kol. 2009]. Dále se mezi ně řadí také RegBA a CtaR [Amouric a kol. 2009; Quatrini a kol. 2009; Ponce a kol. 2012]. Znalosti regulace genů zapojených v příjmu a oxidaci železa jsou zatím omezené, nicméně jsou neustále doplňovány o nové transkripční regulátory [Osorio a kol. 2008a].

1.2.4. Metabolismus sirných látek

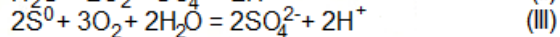
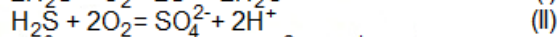
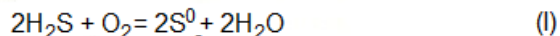
1.2.4.1. Biogeochemický cyklus síry

Hlavním zdrojem sirných látek v ovzduší, vodě a půdě je antropogenní činnost, především pak spalování fosilních paliv, chemická výroba a průmyslová hnojiva. Do atmosférického cyklu síry přispívají také vulkanické plyny. Velké množství síry je zapojeno do procesů probíhajících mezi oceány a oceánskou atmosférou, dochází tak k masivní výměně. Z oceánů je síra v různých formách (organická síra, sírany a pyrit) zabudována do sedimentů.

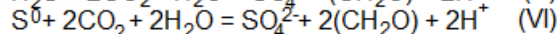
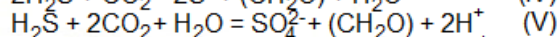
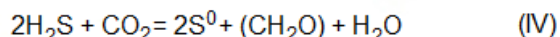
Jak je patrné z obr. 9, všechny hlavní reakce biogeochemického cyklu síry jsou úzce spojeny s koloběhem uhlíku [Ivanov 1981].



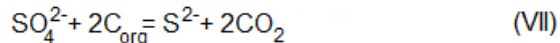
Chemoautotrofní bakterie



Fotoautotrofní bakterie



Bakterie redukující sírany



Fotosyntéza

Rozklad

Obr. 9. Vztahy mezi hlavními biologickými procesy koloběhu síry a některé související reakce koloběhu uhlíku. Modifikováno dle [Ivanov 1981].

V přirozených i antropogenních kyselých prostředích interagují prokaryota metabolizující sirné látky s ostatními acidofily. Zodpovědnost za velmi nízké pH prostředí, ve kterých se acidofilní bakterie nacházejí, má nejčastěji oxidace elementární síry a RISCs (sulfidů a polythionanů).

Oxidace redukované síry může poskytnout až osm elektronů (v případě oxidace H_2S na SO_4^{2-}), zatímco oxidace Fe^{2+} , dalšího dostupného donoru hrajícího významnou roli v extrémně acidofilních prostředích, jeden elektron. Elektrony pocházející z oxidace RISCs vstupují do elektrontransportní dráhy při nižším redoxním potenciálu, dochází proto k vyšší produkci ATP na mol elektronů v porovnání s oxidací Fe^{2+} [Kelly 1999].

Mezi nejlépe prostudované chemolithotrofy, kteří oxidují RISCs, patří *Acidithiobacilli*, některé druhy rodů *Paracoccus* a *Xanthobacter*, *Sulfolobus*, *Acidianus* a *Desulfurolobus*. Je zřejmé, že oxidační dráhy a mechanismy konzervace energie se mezi jednotlivými

organismy liší. Byla prokázána i odlišnost enzymových systémů archeí zapojených do oxidace siřných látek od enzymů *Acidithiobacillů* [Rohwerder a Sand 2007]. Přesto, že mají některé bakterie (především *Acidithiobacilli*) stejné substráty, meziproducty a koncové producty, geny kódující jednotlivé procesy nejsou pro všechny organismy stejné [Dopson a Johnson 2012].

1.2.4.2. Aerobní oxidace elementární síry u bakterie *A. ferrooxidans*

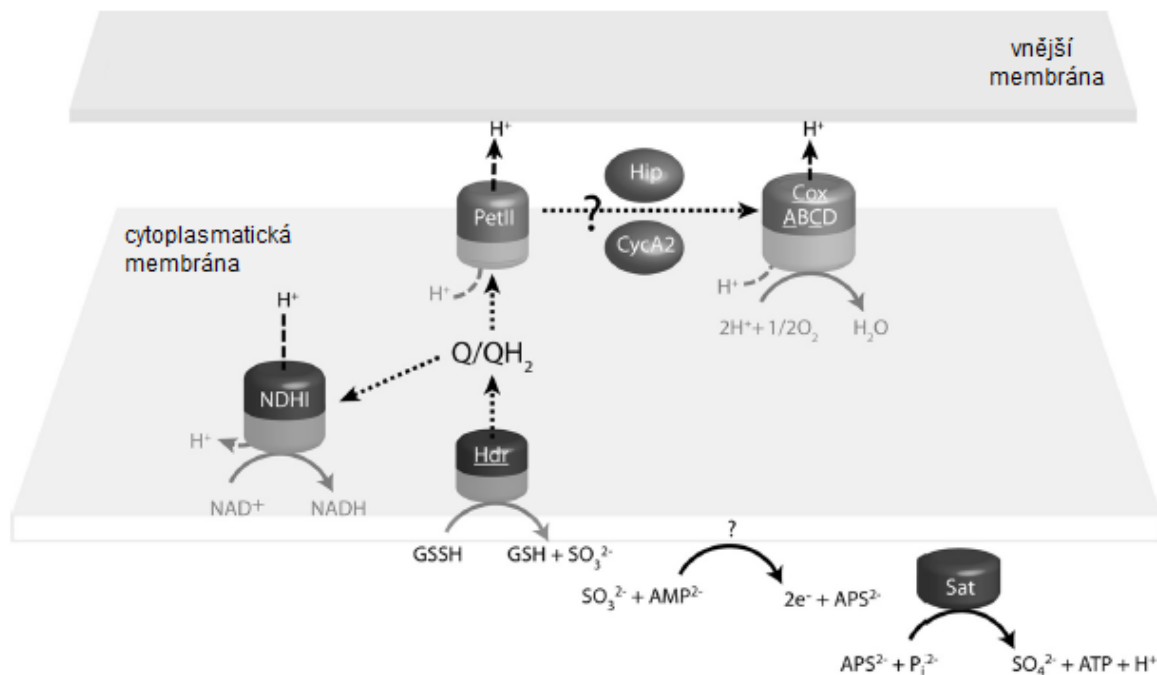
Oxidace elementární síry u *A. ferrooxidans* probíhá dle rovnice (3). Redoxní potenciál pro pár S^0/HS^- je -270 mV při $pH = 7$, pro pár $S_2O_3^{2-}/HS^-$ je -400 mV a pro pár SO_4^{2-}/HSO_3^- je -520 mV [Brasseur a kol. 2004].



Elementární síra se vyskytuje převážně ve formě stabilních oktasulfanových kruhů S_8 , a protože její rozpustnost ve vodě je velmi nízká ($5 \mu g/l$) [Pronk a kol. 1990], vlastní oxidaci předchází aktivační krok [Pronk a kol. 1990]. Suzuki [1965a, b] popsal aktivaci elementární síry neenzymatickými procesy, kdy nukleofilním atakem glutathionu (GSH) na oktasulfanový kruh síry vznikají GS_nH ($n > 1$) spécie, které reakcí mezi sebou nebo s dalším GSH tvoří disulfid glutathionu (GSSG) a jeho vyšší homology GS_nG ($n > 2$) a H_2S . Takto aktivovaná síra je přenesena do cytoplasmy, přičemž roli hrají thiolové skupiny proteinů vnější membrány a periplasmatického prostoru [Rohwerder a Sand 2007].

Aerobní oxidace elementární síry bakterií *A. ferrooxidans* (obr. 10) je zprostředkována heterodisulfidreduktasou (Hdr), proteinem ukotveným ve vnitřní membráně, s aktivním místem v cytoplasmě [Quatrini a kol. 2009, Mangold a kol. 2011]. Po transportu do cytoplasmy je disulfidická vazba polysulfidového glutathionu (GSSH) hydrolyzována Hdr za vzniku glutathionu (GSH) a siřičitanu [Osorio a kol. 2013], který vzniká působením sulfurdioxygenasy (Sdo). Siřičitan je siřičitanoxidoreduktasou (Sor) oxidován na síran, jeho elektrony jsou pravděpodobně přeneseny na cytochromy [Rawlings 2005; Rohwerder a Sand 2007]. Na genomu *A. ferrooxidans* nebyly nalezeny geny kódující Sdo či Sor, nicméně byly zde nalezeny tři kopie genu pro katalytickou podjednotku HdrB [Quatrini a kol. 2009]. Dva z nich jsou součástí *hdr* operonu, který dále kóduje podjednotky HdrA, HdrC, rhodanasu a další proteiny zapojené v transportu siřných skupin. Producty těchto genů byly detegovány jak za aerobních tak i anaerobních podmínek, což naznačuje účast Hdr při aerobní i anaerobní oxidaci S^0 . Hladiny proteinů však byly vyšší v aerobních podmínkách [Osorio a kol. 2013].

Výsledky experimentů naznačují, že může být využita také alternativní cesta. Větvení nastává u chinonového poolu, kde některé elektrony jdou přes cytochrom *bc₁* komplex, cytochrom *c₄* (CycA2) a železo-siřný protein Hip na terminální cytochrom *ba₃* oxidasu, zatímco zbývající elektrony jdou na terminální cytochrom *bd* oxidasu.



Obr. 10. Model aerobní oxidace elementární síry u *A. ferrooxidans*. Geny nebo proteiny, jejichž zvýšená regulace byla pozorována za aerobních podmínek v citované práci, jsou podtrženy. Transfer elektronů je značen přerušovanou šipkou, transport protonů nepřerušovanou. Q/QH₂ označuje chinonový pool. Modifikováno dle [Osorio a kol. 2013].

Během oxidace elementární síry jsou u *A. ferrooxidans* aktivní ještě další enzymy. Volný sulfid (HS⁻), který vzniká vedlejší reakcí při reakci volných thiolových skupin transportních proteinů s atomy sulfanové síry, je v periplasmě oxidován sulfid:chinonoxidoreduktasou (Sqr) na elementární síru, která je buď oxidována Sdo nebo reaguje abioticky se siřičitanem za vzniku thiosíranu. Thiosíran může být thiosíran:chinonoxidoreduktasou (Tqo) oxidován na tetrathionan, pro jehož degradaci byla navržena cyklická dráha zahrnující hydrolyzační a oxidační kroky, kde konečnými produkty jsou thiosíran, elementární síra a síran [Pronk a kol. 1990; Beard a kol. 2011]. Dalšími enzymy zapojenými v oxidaci thiosíranu je rhodanasa, která štěpí thiosíran na síru a siřičitan [Valenzuela a kol. 2006] a thiosírandehydrogenasa, jejímž konečným produktem je tetrathionan [Janiczek a kol. 2007; Kikumoto a kol. 2013]. Při růstu *A. ferrooxidans* na elementární síře a thiosíranu byla popsána intracelulární akumulace lineární síry a S₈ a výskyt extracelulárních sírných globulí složených především z S₈ [He a kol. 2010].

Sqr a Tqo jsou asi 20x více exprimovány v buňkách rostoucích na síře než v buňkách rostoucích na železe, což naznačuje, že jejich exprese je závislá na růstovém substrátu. Pokusy s inhibitory ukázaly, že asi polovina elektronů z oxidace thiosíranu využívá cestu přes terminální cytochrom *ba3* oxidasu, zbývající část elektronů jde přes terminální cytochrom *bo3* nebo *bd* oxidasu [Brasseur a kol. 2004].

Výzkum je komplikován vysokou reaktivitou sírných meziproductů a tak stále není jasné, zda Sdo dráha je univerzálně platná pro všechny Gram-negativní acidofily. Je velmi

pravděpodobné, že existují i jiné mechanismy [Rohwerder a Sand 2007]. I pro S₀ a S₂ u *A. ferrooxidans* navrhl Sugio a kol. [1989, 1992] alternativu – sulfid Fe³⁺ oxidoreduktasu a siřičitan Fe³⁺ oxidoreduktasu. Siřná oxidace by tak byla striktně spojena s oxidací železa.

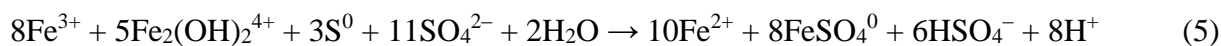
1.2.4.3. Anaerobní oxidace elementární síry u bakterie *A. ferrooxidans*

Fakt, že mnoho heterotrofních acidofilů je schopno anaerobní respirace Fe³⁺ [Johnson a McGinness 1991; Eisele a Gabby 2014], naznačuje, že trojmocné železo je v kyselých podmínkách důležitým akceptorem elektronů [Pronk 1992]. Disimilační redukce Fe³⁺, která je mezi mírnými a extrémními acidofily velmi rozšířená [Johnson 2012], zprostředkovává destrukci i tvorbu minerálů a má tak velký vliv v biogeochemickém cyklu železa [Liermann a kol. 2007]. Redoxní potenciál páru Fe²⁺/Fe³⁺ je ovlivněn pH a asociovanými organickými a anorganickými ligandy. V roztocích o pH 2 obsahujících sírany se jeho hodnota pohybuje kolem +700 mV, zatímco v neutrálním pH je mnohem elektronegativnější (+300 mV). V kyselém prostředí tedy oxidace Fe²⁺ poskytuje méně energie než v neutrálním, ale na druhou stranu je Fe³⁺ při nízkém pH energeticky výhodnější akceptor [Hedrich a kol. 2011].

Bakterie *A. ferrooxidans* je nejstudovanější z acidofilů a jako akceptor elektronů jí může kromě molekulárního kyslíku sloužit i S⁰ nebo Fe³⁺ [Pronk 1991a, 1992; Ohmura a kol. 2002]. Bakterie je schopná anaerobního růstu na H₂ spojeného s redukcí S⁰ a Fe³⁺ [Ohmura a kol. 2002; Valdes 2008a], nicméně nejvýznamnější roli v biogeochemických cyklech železa a síry hraje anaerobní, na Fe³⁺ závislý růst *A. ferrooxidans* na siřných sloučeninách. Schopnost anaerobního růstu je důležitá i v biohydrometalurgických procesech. Oxidace elementární síry pozorovaná v kulturách *A. ferrooxidans*, při níž Fe³⁺ slouží jako akceptor elektronů, je biologický proces, jehož dnes již konvenčně používanou rovnici reakce (4) popsal poprvé Brock a Gustafson [Brock a Gustafson 1976; Pronk a kol. 1992]:

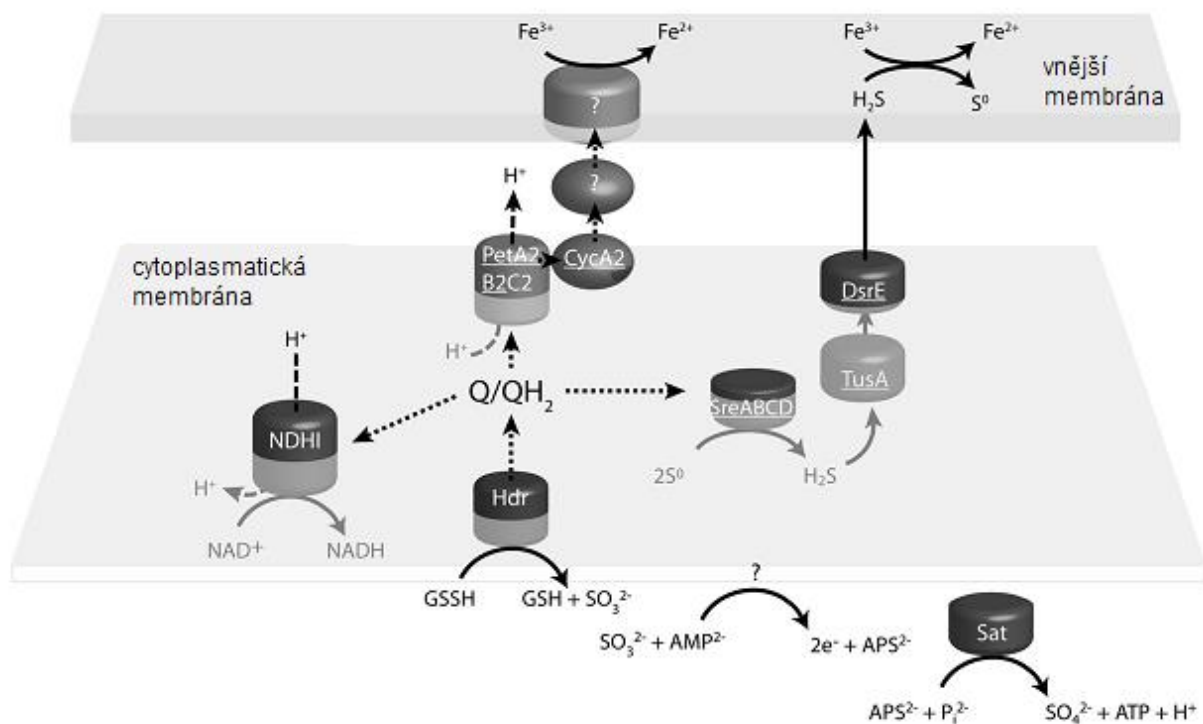


Kucera a kol. [2012b] zahrnul změny v okyselování během reálného procesu a popsal stechiometrii reakcí (5):



O mechanismu redukce Fe³⁺ je známo relativně málo, přesto bylo na základě molekulárně-biologických a biochemických analýz navrženo několik modelů. Corbett a Ingledew [1987] navrhli anaerobní dráhu, kdy elektrony pocházející z oxidace S⁰ vstupují do respiračního řetězce přes cytochrom *bc*₁ komplex a pokračují přes periplasmatické přenašeče systému oxidace železa na finální akceptor Fe³⁺. Dále byly pro finální přenos elektronů na Fe³⁺ navrženy tetrathionanhydrolasa [Sugio a kol. 2009] a arsenreduktasa [Mo a kol. 2011], jejichž přítomnost však nebyla při analýze transkriptomu a proteomu anaerobních kultur prokázána [Osorio a kol. 2013]. Kucera a kol. [2012a] popsal výrazný nárůst v expresi elektronových přenašečů rusticyaninu a cytochromu *c*₅₅₂ (Cyc1), u kterých je známo, že jsou zapojeny

v respiračním řetězci oxidace Fe^{2+} . Bylo tak navrženo zapojení konkrétních přenašečů systému oxidace železa kódovaných *rus* operonem i v redukci Fe^{3+} . Osorio a kol. [2013] detegoval zvýšenou expresi genů kódujících cytochrom *bc₁* komplex (*petA2* a *petB2*) a cytochromu *c* (*cycA2*) za anaerobních podmínek. Byla navržena anaerobní respirační dráha, kde elektrony získané oxidací S^0 přecházejí na chinon, a dále přímým tokem na cytochrom *bc₁* komplex a *CycA2* (obr. 11). Osorio a kol. [2013] navrhl jako další, či současně využívané, možné funkční propojení oxidace S^0 a redukce Fe^{3+} přes disproportionaci síry na sirovodík pomocí sulfurreduktasy a síran pomocí heterodisulfidreduktasy a ATP sulfurylasy. U všech podjednotek komplexu sulfurreduktasy (*SreABCD*), jejíž funkce je pravděpodobně tvorba H_2S , bylo pozorováno zvýšení na úrovni mRNA, zatímco na úrovni proteinu bylo pozorováno zvýšení pouze u podjednotky *SreB*. Dále byla také pozorována zvýšená exprese genů kódujících proteiny *DsrE* a *TusA*, u kterých se předpokládá role v transportu siřných látek, resp. -SH skupin, a jsou součástí *hdr* operonu. Proto byla u těchto proteinů předpokládána funkce v transportu toxického H_2S vně buňku za anaerobních podmínek. Neboť H_2S redukuje Fe^{3+} v kyselém prostředí, jeho tvorba naznačovala alespoň částečné zapojení nepřímého mechanismu v anaerobní redukci železa.



Obr. 11. Model anaerobní oxidace elementární síry u *A. ferrooxidans*. Geny nebo proteiny, jejichž zvýšená regulace byla pozorována za anaerobních podmínek v citované práci, jsou podtrženy. Transfer elektronů je značen přerušovanou šipkou, transport protonů nepřerušovanou. Q/QH₂ označuje chinonový pool. Modifikováno dle [Osorio a kol. 2013].

Část generovaných elektronů může být transportována reverzním tokem na NADH dehydrogenasu. Energie potřebná pro tento proces by mohla pocházet z reverzní protonmotivní síly [Corbett a Ingledew 1987; Kelly 1999]. Je možné, že aerobní i anaerobní

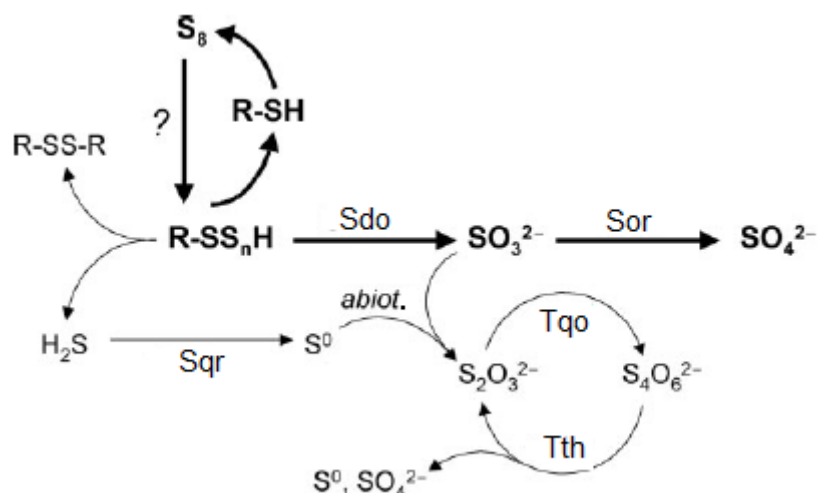
typ autotrofního růstu bakterie sdílí jednu univerzální dráhu pro regeneraci NADH, nicméně důkazy jednotného mechanismu zpětného toku zatím chybí [Ohmura a kol. 2002].

Vznik energie anaerobní respirací Fe^{3+} popsal poprvé Pronk et al. [1991a]. Zvýšená regulace 3 z 5 F_1 podjednotek F_1F_0 ATPasy za aerobních podmínek, potvrzuje vyšší syntézu ATP a vyšší rychlost růstu na rozdíl od anaerobních podmínek. Dále byly abundantní i proteiny podílející se na tvorbě protonmotivní síly MotA/TolQ/ExbB. Za anaerobních podmínek byla naopak pozorována zvýšená regulace F_0 podjednotky ATPasy nevyžadující katalytickou F_1 podjednotku, která translokuje elektrony a generuje tak ATP. Za anaerobních podmínek tedy může ATPasa sloužit ke generování protonmotivní síly spíše než tvorbě ATP [Osorio a kol. 2013].

ATP může dále vznikat za aerobních i anaerobních podmínek substrátovou fosforylací; konverzí SO_3^{2-} vzniká adenosin-5'-fosfosíran (APS), který je dále přeměněn za katalýzy ATP sulfurylasou na SO_4^{2-} a ATP [Quatrini a kol. 2009]. Menší část SO_3^{2-} může být siřičitanreduktasou (CysI) redukována na H_2S a asimilována, jak vyžaduje růst [Valdes a kol. 2003]. Osorio a kol. [2013] detegoval zvýšenou expresi genů *cysI* a *cysH* (APS reduktasa) za anaerobních podmínek, ačkoliv nebyly předpokládány vyšší růstové nároky ve srovnání s aerobními podmínkami.

1.2.4.4. Aerobní oxidace sirných látek

Oxidace RISCs u chemolithotrofních *Acidithiobacillů* nejsou ještě plně popsány, a to přesto, že zaujímají klíčovou roli v biogeochemickém cyklu síry a biohydrometalurgických procesech. Obecně byly popsány dva mechanismy oxidace RISCs, jeden zahrnující polythionany, který je platný především pro neutrofilů, a druhý zahrnující polythionanové meziprodukty, který se uplatňuje u neutrofilů a acidofilů (obr. 12) [Rohwerder a Sand 2007; Mohapatra 2008; Kikumoto a kol. 2013].

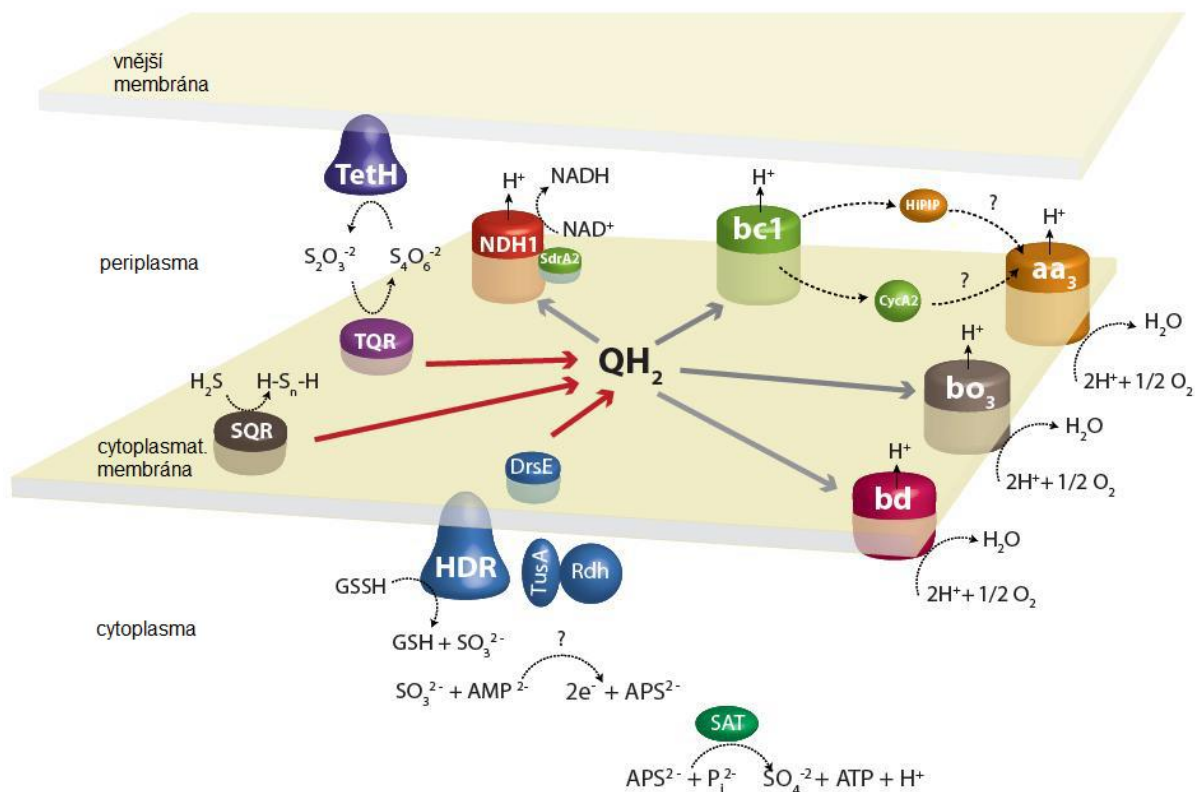


Obr. 12. Schématické znázornění metabolismu redukováných anorganických sloučenin síry (RISCs) u acidofilních proteobakterií. Sor = siřičitanoxidoreduktasa; Sdo = sulfurdioxygenasa; Sqr = sulfid:chinonoxidoreduktasa; Tqo = thiosíran:chinonoxidoreduktasa; Tth = tetrathionanhydrolasa. Modifikováno dle [Rohwerder a Sand 2007; Mohapatra 2008].

Mezi jednotlivými druhy rodu *Acidithiobacillus* neexistuje uniformita drah oxidace RISCs, což naznačují nesrovnalosti ve stechiometrii [Pronk a kol. 1990, Bernier a Warren 2007]. Bioenergetické studie potvrzují, že alespoň některé z reakcí se odehrávají v periplasmě, což naznačuje funkčnost zúčastněných enzymů v nízkém pH [Pronk a kol. 1990]. *A. ferrooxidans* je schopen oxidovat siřičitan, thiosíran, tetrathionan a sulfidy. Množství biomasy produkované na mol elektronů je mnohem větší během oxidace RISCs než Fe^{2+} . Také na pyritu je růstový výtěžek na mol elektronů vyšší než na Fe^{2+} [Pronk a kol. 1990].

Během oxidace tetrathionanu vznikají mezi buněčnou stěnou a cytoplasmatickou membránou sírné globule skládající se z polythionanů s dlouhým řetězcem (S_{13} a více) a elementární síry, převážně ve formě S_8^0 . Při jejich vzniku jsou klíčovými meziprodukty sulfan-monosulfonové kyseliny, které jsou vysoce reaktivní a mohou podstupovat spontánní elongační reakce za vzniku elementární síry a siřičitanu [Pronk a kol. 1990]. Samotnou hydrolýzu tetrathionanu na thiosíran, síru a síran katalyzuje tetrathionanhydrolasa [Kanao a kol. 2007].

Pro oxidaci siřičitanu byly navrženy dva mechanismy. V prvním APS reduktasa [Kelly 1982; Peck 1961] katalyzuje kondenzaci siřičitanu s adenosin 5'-monofosforečnanem (AMP) za vzniku APS (adenosin 5'-fosfosíran). Uvolnění síranu z APS je spojeno s tvorbou ADP. AMP může být následně regenerováno adenylátkinasou. Tento mechanismus substrátové fosforylace vynáší půl molekuly ATP na každou molekulu oxidovaného siřičitanu. Elektrony z této dráhy mohou přispívat k tvorbě protonmotivní síly [Pronk a kol. 1990]. Druhý mechanismus je nezávislý na AMP a oxidace siřičitanu je katalyzována siřičitanoxidasou [Vestal a Lundgren 1971; Sugio a kol. 2006].



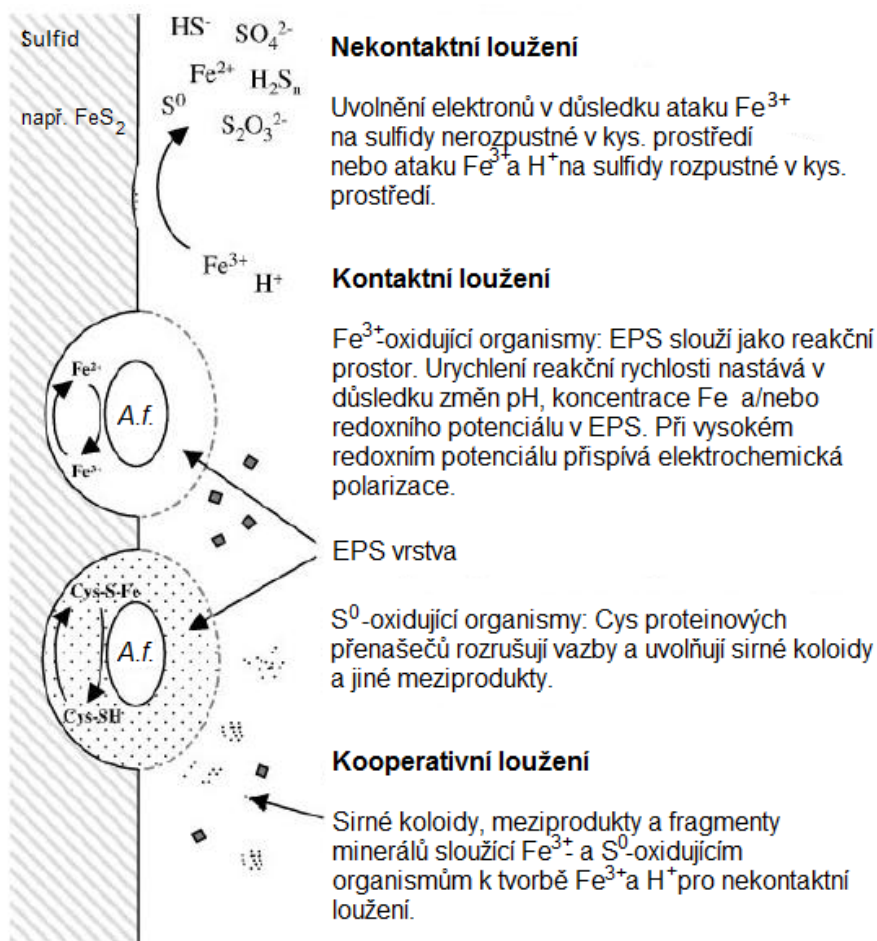
Obr. 13. Model oxidace redukováných anorganických sírných sloučenin (RISCs) u *A. ferrooxidans*. Dráhy oxidací RISCs zahrnují řadu enzymů, enzymových komplexů a elektronových přenašečů: na vnější membráně, orientovaná do periplasmu TetH = tetrathionanreduktasa, v periplasmě vysokopotenciálový železo-sírný protein HiPIP, připojen k cytoplasmatické membráně z periplasmatické strany cytochrom CycA2, v cytoplasmatické membráně Sqr = sulfid:chinonoxidoreduktasa, Tqr = thiosíran:chinonoxidoreduktasa, cytochrom *bc*₁ komplex II, NADH komplex I (NDHI), terminální *bd* a *bo*₃ oxidasy, v cytoplasmě Hdr = heterodisulfidreduktasa, Sat = ATP sulfurylasa. Nerozpustná síra je nejdříve konvertována na polysulfidový glutathion (GSSH), který je kaskádou transferas (DsrE, TusA a Rhd) přenesen na Hdr. Elektrony pocházející ze sulfidu (H₂S), thiosíranu (S₂O₃²⁻) nebo GSSH jsou přenášeny přes chinonový pool (QH₂) buď (i) přímo na terminální *bd* nebo *bo*₃ oxidasu nebo (ii) nepřímo přes cytochrom *bc*₁ komplex II a cytochrom CycA2 a vysokopotenciálový železo-sírný protein HiPIP na terminální cytochrom *aa*₃ oxidasu, kde dochází k redukcí O₂ nebo (iii) na NADH komplex I. Modifikováno dle [Quatrini a kol. 2009]. Terminální akceptory pumpují protony z buňky, vstupovat zpět do buněk mohou skrze F₁F₀ ATPasu za tvorby ATP [Dopson a Johnson 2012].

Oxidace RISCs (obr. 13) u *A. ferrooxidans* zahrnuje oxidaci sulfidu (HS⁻) sulfid:chinonoxidoreduktasou kódovanou *sqr*, zatímco geny kódující heterodisulfidreduktasu (*hdrABC*) jsou zvýšené během růstu na elementární síře. Další geny, jejichž exprese je zvýšená při oxidaci elementární síry, jsou *rdh* kódující rhodanase podobný protein, *tusA* kódující regulační protein tvorby disulfidické vazby a *dsrE* kódující protein z rodiny heterodisulfidreduktasového komplexu. Hydrolýza tetrathionanu je zprostředkována TetH (*tetH*) a produkovaný thiosíran je oxidován thiosíran:chinonoxidoreduktasou (Tqr) kódovanou *doxDA*. Vznikající siřičitan je potenciálně přeměňován ATP sulfurylasou (*sat*), spolu s dalšími enzymy [Quatrini a kol. 2009]. Přítomnost Fe²⁺ způsobuje sníženou expresi genů zapojených do oxidace RISCs [Amouric a kol. 2009]. Při růstu *A. ferrooxidans*

na thiosíranu byly identifikovány periplasmatické proteiny tetrathionanhydrolasa a cytochrom *c4* (CycA2) [Chi a kol. 2007].

Bakteriální loužení, neboli **biooxidace sulfidů** kovů na rozpustné sírany a kyselinu sírovou, je uskutečňováno specializovanými bakteriemi, především třemi acidofilními, chemolithotrofními druhy – *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans*. *A. ferrooxidans* oxiduje redukované sírné sloučeniny na síran a Fe^{2+} na Fe^{3+} . *A. thiooxidans* je schopen oxidovat pouze RISCs, zatímco *L. ferrooxidans* oxiduje pouze Fe^{2+} [Schippers a Sand 1999].

Odborníci vedou již dlouhou dobu debatu, zda probíhá oxidace sulfidů přímým nebo nepřímým mechanismem. **Nekontaktní (nepřímý) mechanismus** (obr. 14) probíhá prostřednictvím chemického ataku iontů trojmocného železa nebo protonů na minerál, což vede k rozpouštění sulfidu a vzniku Fe^{2+} a různých forem síry. Planktonické mikroorganismy oxidující železo využívají dvojmocné železo jako donor elektronů, tím ho reoxidují a regenerují tak reaktant. Pokud by bylo jedinou funkcí bakterií regenerace trojmocného železa, pak by neměla účinnost biooxidace záviset na tom, jestli jsou mikroby v kontaktu s minerálem nebo nikoliv. **Kontaktním (přímým) mechanismem** (obr. 14) je v širším slova smyslu myšleno zvýšení rychlosti rozpouštění minerálu zprostředkované adsorpcí buněk na povrch horniny. V užším slova smyslu je přímý mechanismus vnímán jako proces přímé interakce složek bakteriální membrány se sulfidem za použití enzymatického mechanismu, což vede k jeho oxidaci kyslíkem na síran a kationt kovu [Sand a kol. 1995].



Obr. 14. Schéma navržených mechanismů biooxidace pyritu. Modifikováno dle [Rawlings 2002].

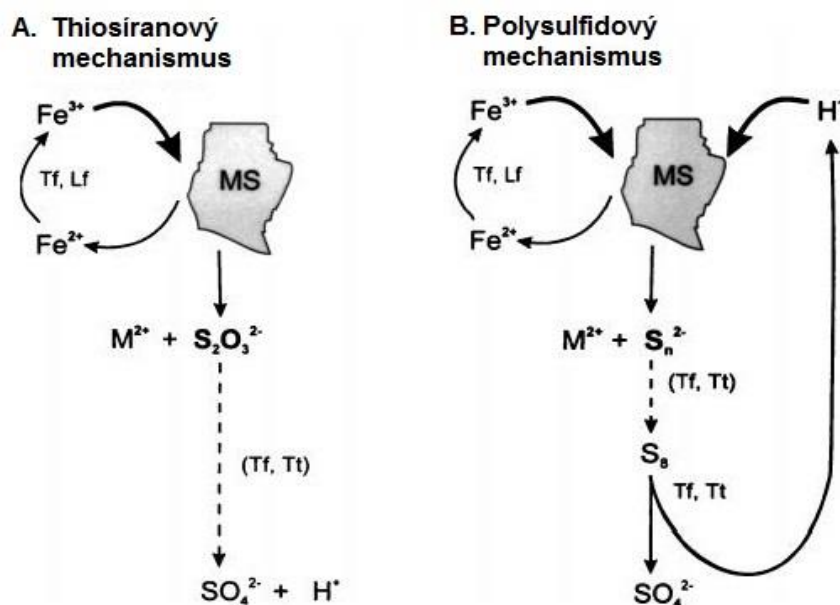
Rozpouštění pyritu probíhá s největší pravděpodobností **kooperativním mechanismem** (obr. 14), kdy dochází současně ke kontaktnímu i nekontaktnímu bioloužení [Rodriguez a kol. 2003a; Rawlings 2002]. Tributsch a kol. [Rojas a kol. 1995; Tributsch 2001] prokázal, že během oxidace pyritu se exopolysacharidová vrstva (EPS) *A. ferrooxidans* plní koloidní sírou, která se ve velkém množství uvolňuje do prostředí. Siřné částice a globule uvolňované tímto nevhodným procesem slouží jako substrát ostatním bakteriím oxidujícím síru při kooperativním loužení. Zatím neidentifikované siřné nosiče obsahující reaktivní thiolové skupiny výrazně napomáhají rozpouštění pyritu [Rojas-Chapana a Tributsch 2001].

Významnou roli v tomto procesu hraje EPS, která vytváří prostředí pro dělení buněk a následně tvorbu biofilmu. EPS obsahuje vysokou koncentraci iontů železa (~ 53 g/l), které je dosahováno tvorbou komplexů s glukuronovou kyselinou. EPS slouží jako reakční prostor, ve kterém ionty trojmocného železa atakují povrch minerálu [Schippers a Sand 1999], přičemž dochází k jejich redukci. Vznikající dvojmocné železo je následně mikrobiálně reoxidováno (reakce (6)).



Tato mikrobiální reoxidace dvojmocného železa může vést k lokálnímu zvýšení pH v EPS vrstvě blízko povrchu minerálu, což napomáhá rozpouštění minerálu [Fowler a kol. 1999, 2001; Holmes a kol. 1999].

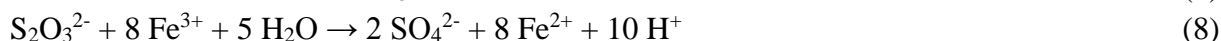
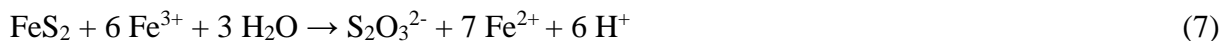
Sand se spolupracovníky [Schippers a kol. 1996, Schippers a Sand 1999] pozorovali, že oxidace různých sulfidů probíhá přes různé meziprodukty a ukázali tak, že rovnice rozpouštění není pro všechny sulfidy identická. Pro oxidaci sulfidů kovů nerozpustných v kyselém prostředí, jako je pyrit (FeS_2), molybdenit (MoS_2) a tungstenit (WS_2), navrhli thiosíranový mechanismus (obr. 15A). Protože se na valenčních pásech těchto sulfidů podílejí pouze orbitály kovu, valenční pásy nepřispívají k chemické vazbě mezi kovem a sírou částí. Tyto sulfidy kovů tak mohou být degradovány ionty Fe^{3+} , nikoliv atakem protonů. Pro sulfidy kovů rozpustné v kyselém prostředí, jako sfalerit (ZnS), chalkopyrit (CuFeS_2), galena (PbS) [Schippers a Sand 1999], hauerit (MnS_2), orpiment (As_2S_3) a realgar (As_4S_4) [Sand a kol. 2001], na jejichž valenčních pásech se podílí jak orbitály kovů, tak síry, byl navržen polysulfidový mechanismus (obr. 15B). Vazba mezi atomem síry a atomem kovu může být rozrušena odběrem elektronů z valenčního pásu protony.



Obr. 15. Schématické srovnání thiosíranového (A) a polysulfidového (B) mechanismu bioloužení kovových sulfidů. Typ mechanismu je určen vlastnostmi sulfidu kovu (MS). V případě především abiotických reakcí je příspěvek bakterií oxidujících sírné sloučeniny uveden v závorce. Orámovány jsou hlavní produkty reakcí, které se akumulují v nepřítomnosti bakterií oxidujících sírné sloučeniny. Reakce nejsou stechiometrické. Af = *Acidithiobacillus ferrooxidans*, At = *Acidithiobacillus thiooxidans*, Lf = *Leptospirillum ferriphilum* [Vera a kol. 2013].

U **thiosíranového mechanismu** (obr. 15A) dochází k ataku Fe^{3+} na nerozpustný sulfid kovu. Fe-S₂ vazba je rozštěpena a ionty Fe^{2+} jsou uvolněny do roztoku, což zanechává povrch pyritu bohatý na síru. Studie prokázaly na povrchu pyritu v kyselém pH přítomnost disulfidů, monosulfidů a polysulfidů [Sasaki a kol. 1994, 1995], jejichž oxidací vzniká nestabilní thiosíran, který je dále oxidován přes tetrathionan, disulfan-monosulfanovou kyselinu

a trithionan na hlavní konečný produkt síran (reakce (7) a (8)) [Schippers a kol. 1996, Schippers a Sand 1999]. Ačkoliv je kyslík potřeba pro uvolnění železa, které iniciuje reakci, většina studií uvádí, že primárním oxidantem v biotických i abiotických systémech je Fe^{3+} [Wiersma a Rimstidt 1984; Moses a kol. 1987; Brown a Jurinak 1989].



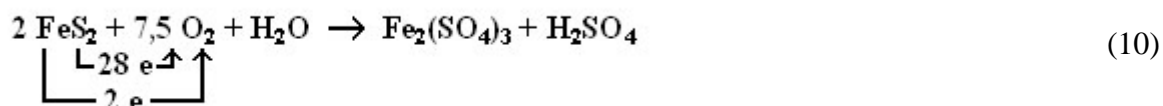
Pyrit může být oxidován také rozpuštěným molekulárním kyslíkem (reakce (9)) [Singer a Stumm 1970]:



Výsledky experimentů sledujících isotopové výměny [Balci a kol. 2007, Heidel a Tichomirowa 2011] však uvádí, že jak v biologickém, tak abiotickém procesu, kolem 90 % kyslíku inkorporovaného do síranu pochází z vody a pouze 10 % z rozpuštěného kyslíku.

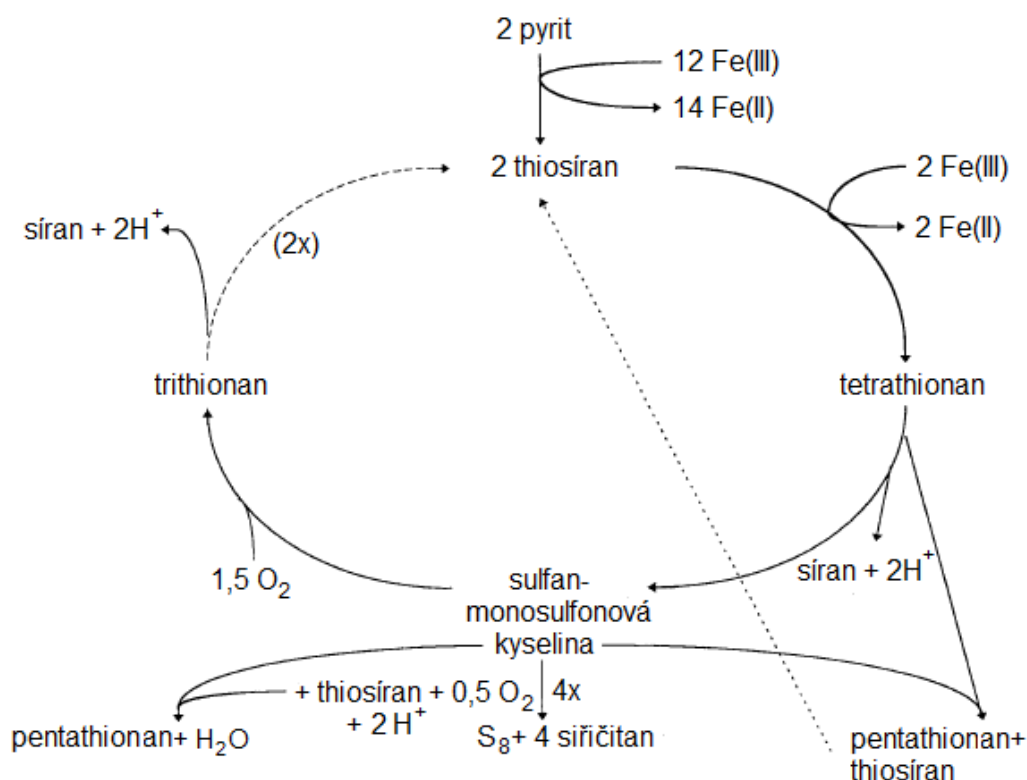
Úloha *A. ferrooxidans* a *L. ferrooxidans* spočívá v dodávání Fe^{3+} iontů. Oxidace pyritu je působením *A. ferrooxidans* urychlena 100× v porovnání s abiotickou oxidací, která v $\text{pH} < 3$ probíhá velmi pomalu [Balci a kol. 2007].

A. ferrooxidans oxiduje pyrit na síran železitý a kyselinu sírovou. Během této oxidace pochází pouze jeden elektron z Fe^{2+} , zatímco 14 elektronů je z jedné molekuly síry (rovnice (10)) [Pronk a kol. 1990].



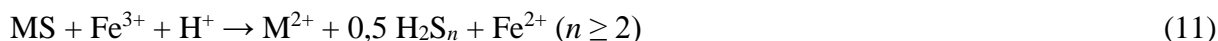
Schippers a kol. [1996] navrhli cyklickou oxidativní degradaci pyritu (obr. 16), kdy je trithionan hydrolyzován na thiosíran a může do cyklu vstoupit znovu. Je degradován na síran za vzniku elementární síry coby vedlejšího produktu. To vysvětluje, proč pouze bakterie oxidující železo jsou schopny oxidace sulfidů nerozpustných v kyselém prostředí [Sand a kol. 2001].

Cyklická degradace pyritu vysvětluje přítomnost sirných globulí v periplasmatickém prostoru *A. ferrooxidans* [Rojas a kol. 1995]. Tyto sirné globule vznikají při cyklické degradaci pyritu z elementární síry a polythionanů a slouží jako zásobárna sirných látek. Pisapia a kol. [2007] detegovala elementární síru na povrchu pyritu.



Obr. 16. Cyklická degradace pyritu při bakteriálním a/nebo chemickém loužení. Thiosíran může do cyklu vstupovat znovu (čárkovaně). Modifikováno dle [Schippers a kol. 1996].

U **polysulfidového mechanismu** (obr. 15B) probíhá rozpouštění sulfidu působením Fe^{3+} a protonů. Prvním meziproductem je nestabilní sulfidový kationt (H_2S^+), z něj vzniká dimer (H_2S_2) a následně jsou tvořeny polysulfidy (reakce (11)) [Steudel 1996]. Polysulfidové řetězce jsou sérií radikálových reakcí prodlužovány a jejich rozkladem vzniká elementární síra (reakce (12)). Takto vznikající elementární síra je relativně stabilní, ale může být bakteriemi oxidujícími síru oxidována na síran (reakce (13)).



Vedlejšími reakcemi může vznikat thiosíran (polythionan a síran) (reakce (14) a (15)) [Steudel 1996]:



Tento mechanismus oxidace nevyžaduje nutně přítomnost iontů Fe^{3+} , transfer elektronů je možný i přes molekulu kyslíku, ale v kyselých biotopech jsou obvykle ionty Fe^{3+} přítomny a účinněji odebírají elektrony ze sulfidů [Tributsch 1981].

Schippers a Sand [1999] vysvětlují pomocí rozdílných mechanismů oxidace, proč jsou bakterie oxidující výhradně síru, jako např. *A. thiooxidans*, schopny loužit pouze některé sulfidy kovů.

Vzniklé Fe^{2+} může být reoxidováno na Fe^{3+} působením *A. ferrooxidans* nebo bakteriemi z rodů *Leptospirillum* a *Sulfobacillus*. Role mikroorganismů v rozpuštění kovů tedy spočívá v produkci H_2SO_4 a udržování železa v oxidovaném stavu. V nepřítomnosti iontů železa *A. ferrooxidans* produkuje H_2SO_4 oxidací síry, stejně jako *A. thiooxidans*. Nicméně v přítomnosti iontů železa jsou rychlosti oxidace mnohem vyšší díky přídavnému ataku ionty Fe^{3+} [Garcia a kol. 1995].

Při **anaerobní oxidaci pyritu**, tedy oxidaci zprostředkované Fe^{3+} v nepřítomnosti kyslíku, jsou produkovány síranové ionty a elementární síra, dle reakcí (16 a 17) [Lowson 1982]:



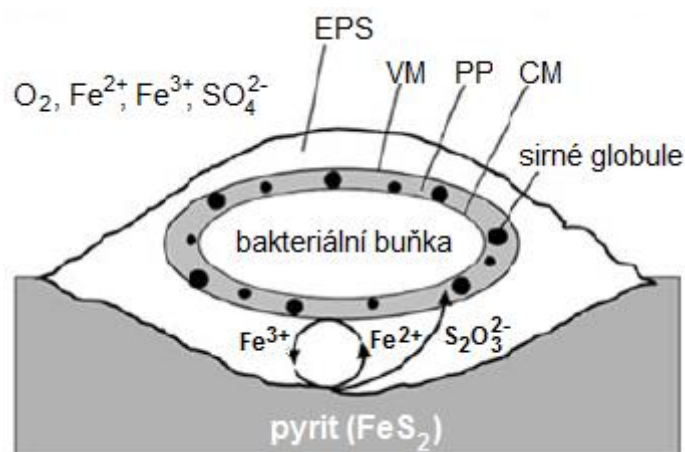
Anaerobní oxidace pyritu probíhá rychle abioticky i bakteriálně. Sledované rychlosti bakteriální a abiotické oxidace naznačují, že při oxidaci pyritu ionty Fe^{3+} v $\text{pH} < 3$ dominuje abiotická oxidace. Kyslík pro tvorbu síranu pochází z vody [Escobar a Vargas 2013; Balci a kol. 2007]. Bakteriální růst během anaerobní oxidace pyritu může být vysvětlen bakteriální oxidací vznikající síry. Přisedlé buňky mohou oxidovat pevnou síru, zatímco planktonické mohou využívat thiosíran a tetrathionan, které vznikají jak chemickou, tak biologickou oxidací pyritu [Schippers a Sand 1999].

1.2.4.5. Adheze *A. ferrooxidans* k pevným substrátům

A. ferrooxidans pokrývá povrch pevných substrátů po několika dnech biofilmem [Harneit a kol. 2006]. V literatuře byla popsána adheze *A. ferrooxidans* na povrch elementární síry [Espejo a Romero 1987] a minerálních sulfidů, jako je pyrit či chalkopyrit [Devasia a kol. 1993; Ohmura a kol. 1993]. Valdes a kol. [2003] identifikoval potenciální dráhy u *A. ferrooxidans*, které by mohly být zapojeny v procesu adheze na pyrit, síru a ostatní pevné substráty. Adheze na povrch minerálů je nezbytný předpoklad přímého mechanismu loužení navrženého Silvermanem a Ehrlichem [1964]. Jakým mechanismem bioloužení probíhá je dodnes diskutované téma [Schippers a Sand 1999; Tributsch a Rojas-Chapana 2000; Crundwell 2003], nicméně bylo prokázáno, že proces je adhezí bakteriálních buněk urychlován [Shrihari a kol. 1995]. Možným vysvětlením je, že přítomnost bakterií zvyšuje pH na povrchu minerálu (na $\sim 2,1$) spotřebou H^+ na oxidaci Fe^{2+} nebo pufrovací kapacitou EPS [Fowler a kol. 1999; Holmes a kol. 1999]. Buňky vázané na povrchu by také mohly urychlovat oxidaci minerálů odstraňováním vznikající vrstvy síry a akumulovaného železa [Rodriguez a kol. 2003b].

Byla pozorována jak vlastní adheze buněk k povrchu minerálů [DiSpirito a kol. 1983], tak prohlubně způsobené tímto procesem [Edwards a kol. 2001; Pisapia a kol. 2008]. Většina buněk se váže k nedokonalostem povrchu a oblastem s nízkým stupněm krystalizace [Dziurla 1998]. Kinetika adheze je rychlá; rovnováhy je, v závislosti na počáteční populaci, dosaženo během několika minut [DiSpirito a kol. 1983; Konishi a kol. 1994; Rodriguez 2003b; Harneit a kol. 2006]. Rychlost a stupeň adheze závisí na velikosti zrn minerálu, jeho koncentraci, míchání [Shrihari a kol. 1991, 1995] a fyzikálně-chemických vlastnostech, jako povrchovém náboji, hydrofobicitě a chemickém složení minerálu a mikroorganismů. Adhezi *A. ferrooxidans* k minerálním povrchům (obr. 17) zprostředkovávají především elektrostatické a hydrofobní interakce [Devasia a kol. 1993], k povrchu elementární síry pak pouze hydrofobní interakce [Gehrke a kol. 1998]. Ze studia biofilmů vyplývá, že k adhezi dochází skrze difúzi, proudění a/nebo chemotaxi. Zatímco první dva mechanismy jsou z většiny náhodné procesy, chemotaxe je proces aktivní orientace bakterie k chemickému gradientu Fe^{2+} a síranů [Sand a kol. 1995]. Vlastní adsorpce bakteriálních buněk je pravděpodobně převážně fyzikální proces odpovídající Langmuirově izotermě [Konishi a kol. 1995], což potvrzuje pokrytí povrchu jednou vrstvou buněk.

Interakce mikrobu s minerálem způsobuje změnu povrchové chemie organismu i daného minerálu [Devasia a kol. 1993; Sharma a kol. 2003; Zhang a kol. 2009; He a kol. 2009; Edwards a kol. 2001; Fowler a kol. 2001]. Devasia a Natarajan [2010] například pozorovali na povrchu bakterií *A. ferrooxidans* kultivovaných na elementární síře sekreci hydrofobních proteinů, které snižují mezifázové napětí mezi povrchem síry a bakteriemi a tím usnadňují adhezi. Některé studie popisují důležitost extracelulárních polysacharidů na povrchu bakterií [Sand a kol. 1995; Arredondo a kol. 1994]. Exopolysacharidová vrstva (EPS) se skládá z lipopolysacharidů tvořených neutrálními cukry a tuky [Gehrke a kol. 1998; Harneit a kol. 2006]. Buňky *A. ferrooxidans* rostlé na pyritu mají v EPS inkorporované uronové kyseliny a Fe^{3+} v poměru 2:1, což zajišťuje elektropozitivitu buněčného povrchu a tím zvyšuje adsorpci buněk [Arredondo a kol. 1994; Pogliani a Donati 1999]. Komplexované Fe^{3+} navíc hrají roli v elektrochemickém rozpouštění pyritu přímým mechanismem. Planktonické buňky rostoucí na rozpustném substrátu netvoří téměř žádné exopolysacharidy [Gehrke a kol. 1998].



Obr. 17. Model kontaktního loužení katalyzovaného buňkami *A. ferrooxidans*: adheze bakteriální buňky obklopené exopolysacharidovou (EPS) vrstvou na pyrit zprostředkovávají elektrostatické interakce. CM = cytoplasmatická membrána, PP = perioplasmatický prostor, VM = vnější membrána. Modifikováno dle [Vera a kol. 2013].

Z elektrochemického pohledu dochází k rozpouštění minerálu na lokálních anodách, což jsou místa, ke kterým jsou buňky chemotakticky přitahovány. Vznik katod a anod je pravděpodobně následkem nedokonalostí v krystalové mřížce, kde poměr železa k síře není přesně 1:2 [Vera a kol. 2013]. Elektrochemický mechanismus, kterým ionty Fe^{3+} komplexované v EPS uskutečňují atak na FeS_2 , není zatím objasněn. V současnosti nejpravděpodobnější vysvětlení je založeno na dvou předpokladech. První je elektronové tunelování, kdy elektrony přemostí vzdálenost až 2 nm z jedné elektronové díry do jiné [Medvedev a Stuchebrukhov 2001]. Aby mohly být redukovány tunelujícími elektrony, Fe^{3+} musí být exponovány do této vzdálenosti od povrchu pyritu. Druhým předpokladem je nižší stabilita komplexů glukuronové kyseliny s Fe^{2+} než je stabilita komplexů s Fe^{3+} [Vera a kol. 2013].

1.2.5. Tvorba ATP u bakterie *A. ferrooxidans*

ATP slouží živým buňkám jako univerzální donor energie. U bakterií probíhá syntéza ATP fosforylací na úrovni substrátu a oxidativní fosforylací, při které vzniká na cytoplasmatické membráně protonový gradient využívaný k tvorbě ATP chemiosmotickým mechanismem [Mitchell 1966, 1976]. Elektrony z oxidovaného donoru jsou přenášeny skrze respirační řetězec oxidoreduktas na elektronový akceptor, přičemž dochází k translokaci H^+ ven z buňky. Transmembránový pH gradient je také udržován spotřebou protonů k redukcí kyslíku na vodu. Energie oxidačně-redukčních pochodů je tak konzervována v protonovém elektrochemickém gradientu, který může pohánět např. transport látek přes membránu [Harold 1972] nebo zpětný tok elektronů [Ingledeew 1982]. Dále transport H^+ přes membránu zpět do bakterie zprostředkovaný ATPasou pevně vázanou na cytoplasmatické membráně poskytuje energii pro fosforylací ADP [Mitchell 1966, 1976; Harold 1972].

ATPasa *A. ferrooxidans* vykazuje typické podjednotkové složení F-ATPasy. Skládá se ze dvou hlavních částí: cytoplasmatické F₁ části ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) obsahující katalytické místo pro syntézu ATP a membránové F₀ části (ab_2c_{10-14}) tvořící protonový kanál. Tyto dvě složky jsou spojeny dvěma stopkami, kdy centrální stopka je tvořena γ a ϵ podjednotkou a vnější stopka δ a b_2 [Wakai a kol. 2005]. Brown a kol. [1994] úspěšně klonoval *Atp* genový klastř pro F₁ část a zjistil, že geny pro F₁ a F₀ jsou svázány. Zatímco většina genů, které kódují ATPsyntasový komplex, byla stejně exprimována v buňkách oxidujících síru i železo, v membráně zabudované F₀ podjednotky A a C (kódované geny *atpB* a *atpE*) byly upregulované při růstu na Fe²⁺. Tyto podjednotky jsou zapojené v translokaci protonů přes membránu a umožňují tak vyšší syntézu ATP [Quatrini a kol. 2009].



Obr. 18. Schematický diagram genů *atp* operonu *A. ferrooxidans*. Modifikováno dle [Wakai a kol. 2005].

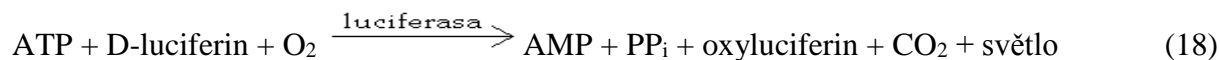
Wakai a kol. [2005] určili K_m pro ATP 1,8 mM, teplotní optimum enzymu 45°C a pH optimum 8,5. Hodnota pH optima naznačuje, že ATPasa slouží výhradně k syntéze ATP, kdy využívá protonový gradient tvořený během oxidace síry nebo Fe²⁺ [Ingledeew a kol. 1977; Apel 1980].

1.2.5.1. Metody stanovení ATP

ATPasovou aktivitu lze stanovit mnoha metodami, například elektrochemickými [Farias a kol. 2008; Gao a kol. 2011; Niu a kol. 2012; Sun a kol. 2012b], elektroforetickými [Suhai a kol. 2009] nebo spektrofotometrickými [Oshita a kol. 2011; Katano a kol. 2012]. Ve směsi adeninových nukleotidů, nukleosidů a dusíkatých bází lze ATP stanovit chromatograficky, především HPLC [Coolen a kol. 2008; von Papen a kol. 2013; Liu a kol. 2014], dnes také často kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) [Jiang a kol. 2012; Wang a Kang 2014; Zhang a kol. 2014]. Dalšími možnostmi jsou fluorescenční metody [Patil a kol. 2010; Alam a kol. 2012; Schaferling a kol. 2014; Yang a kol. 2013; Zeng a kol. 2012], mezi které patří například i metody aptamerové chemie založené na fluorescenčně značených jednořetězcových oligonukleotidech [Zhao a kol. 2012; Pu a kol. 2012; Ning a kol. 2014]. Výhody a nevýhody jednotlivých metod popisuje Khlyntseva a kol. ve svém review [2009].

Ke stanovení adeninových nukleotidů a tedy zjištění mikrobiální aktivity se často používají bioluminiscenční metody. Výhodou těchto metod je citlivost, selektivita a relativně snadná aplikace. Jedním z nástrojů k měření ATP bioluminiscence je systém luciferin-luciferasa, kdy měřené množství emitovaného světla je úměrné koncentraci přítomného ATP, jestliže je tato koncentrace $\ll K_m$ (tj. do 1 μM). Pro stanovení neznámé koncentrace ATP ve vzorku

bývá aplikována metoda standardního přídavku [Lundin 2000]. Luciferasa ze světlušky katalyzuje reakci znázorněnou rovnicí (18) [Squirrel a kol. 2002]. Maximum emisního spektra je při 562 nm [Khlyntseva a kol. 2009]. Kvantový výtěžek je 0,88 einstein/mol luciferinu, tedy téměř 1 foton na ATP.



Mez detekce je typicky 1000 amol (odpovídá 500 bakteriálních buněk v 1 ml), proto byly pro případ potřeby citlivé detekce navrženy systémy „slow decay reagents“ a „flash reagents“, které degradují přítomné ATP mnohem rychleji (10 a 100 %/min). Mez detekce je až 1 amol (0,5 bakteriální buňky/ml), nicméně práce s nimi vyžaduje vysokou rychlou analýzy [Lundin 2000].

Chemiluminiscenční metody jsou dnes rutinně využívány pro detekci bakteriálních buněk. Dříve používané imunologické metody vyvinuté ke sledování bakteriálních kontaminací v potravinářském průmyslu vyžadovaly dostatečné množství materiálu (10^5 buněk/ml) a proto byly nutné kultivace přítomných bakterií [Mansfield a Forsythe 2000]. Se zavedením citlivých chemiluminiscenčních metod se lze tomuto kroku vyhnout a analýzy tak výrazně urychlit. Většina bakteriálních druhů má buněčný obsah ATP kolem 2 amol, a proto s limitem detekce 1 amol a případným zakoncentrováním vzorku lze testovat jeho sterilitu [Lundin 2000]. Praktické aplikace sahají od klinické diagnostiky [Thore a kol. 1983], přes hodnocení cytotoxicity látek a účinnosti antibiotik [Hoffner a kol. 1999; Ivancic a kol. 2008], po sledování potravinářských produktů [Griffiths 1993; Guan a kol. 2010; Minikh a kol. 2010] a hygienický monitoring [Romanova a kol. 2007; Venkateswaran a kol. 2003; Lee a kol. 2010].

Dále je možné stanovit sloučeniny, které jsou spřaženy s některým z reaktantů chemiluminiscenční reakce. Byly vytvořeny tři systémy, které umožňují stanovení široké škály analytů: systém luciferin – luciferasa ze světlušky pro ATP, bakteriální luciferasa-oxidoreduktasa pro NAD(P)H a ftalazindiony pro H_2O_2 [Campbell 1986].

Inhibice ionty H^+ byla důvodem, proč bioluminiscenční metoda monitorování acidofilních kultur nebyla považována za schůdnou [Pronk a kol. 1991a]. Buněčný obsah ATP u bakterie *A. ferrooxidans* stanovil Efremenko a kol. [2005], ale bez spojitosti s kinetikou růstu a použitými substráty. Pronk a kol. [1991a] použil luciferasovou reakci k analýze ATP v anaerobní kultuře, nicméně stanovení bylo ovlivněno inhibicí Fe^{3+} přítomným ve vzorcích. Tsaplina a kol. [2007] stanovila buněčný obsah ATP v kultuře *A. ferrooxidans* oxidující železo a několika dalších chemolithotrofních acidofilích. V důsledku snahy o odstranění inhibičních vlivů centrifugací a skladování vzorku před vlastní analýzou však uvedené údaje neodpovídají fyziologickým podmínkám bakteriálních kultur a nepopisují vztah mezi obsahem ATP v kultuře a kinetikou růstu. Bioluminiscenční kit může být aplikován i na vzorky zakoncentrované membránovou filtrací [Viedma 2007], ale hodnoty buněčného obsahu ATP jsou citlivé na experimentální manipulace, které mohou ovlivnit fyziologii buňky.

2. Cíle disertační práce

1. Stanovení buněčného obsahu ATP bakterie *A. ferrooxidans* a studium změn obsahu ATP v kulturách *A. ferrooxidans* oxidujících různé substráty.
2. Transkriptomická analýza vybraných genů bakterie *A. ferrooxidans* zapojených v anaerobní oxidaci elementární síry.

3. Materiál a metody

Podmínky kultivace a inkubace bakteriální kultury *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Bakterie *A. ferrooxidans* CCM 4253 byly aerobně kultivovány na elementární síře (1-1,5 % (w/v), Sulfur Extra Pure; Riedel-deHaën, Německo) při 28°C dvěma způsoby: v 500-ml baňkách a v 5-l bioreaktoru (Biostat B-DCU; B. Braun Biotech International, Německo) s nádobou založenou na kombinaci skla a PEEK (FairMenTec, Německo) [Pokorna a kol. 2007].

Podmínky a monitorování anaerobní oxidace elementární síry v bioreaktoru spojené s redukcí Fe^{3+} byly popsány dříve [Kucera a kol. 2012a].

Kultury *A. ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} byly aerobně kultivovány v 9K mediu [Silverman a Lundgren 1959] se 159 mM Fe^{2+} [Bouchal a kol. 2006], kultury na thiosíranu (48 mM) v sírném živném mediu [Ceskova a kol. 2002].

Specifické podmínky jednotlivých kultur, analýzy substrátů, příp. produktů, ATP, monitorování metabolické aktivity bakterií a transkriptomických analýz jsou uvedeny v metodických částech publikací [Pakostova a kol. 2013a, b; Mandl a kol. 2014; Kucera a kol. 2016].

Sekvenováním genů 16S rRNA byla zjištěna 100% identita s bakteriálním kmenem ATCC 23270 [Pokorna a kol. 2007].

Kinetická měření

Hodnoty pH byly zjišťovány použitím kombinované skleněné pH elektrody a pH metru PHM 93 (Radiometer, Dánsko). Hustota bakteriálních kultur byla určena turbidimetricky (spektrofotometr Ultrospec 200, Pharmacia Biotech) při vlnové délce 570 nm pro kulturu oxidující síru [Ceskova a kol. 2002] a 450 nm pro kulturu oxidující železo [Pakostova a kol. 2013a]. Množství buněk vázaných na povrch elementární síry bylo stanoveno mikroskopicky po příslušném zpracování vzorků [Pakostova et al. 2013b; Southam a Beveridge 1992; Escobar a Godoy 2002]. Pro stanovení celkové biomasy a podílů planktonických a vázaných buněk bylo použito analyzátoru TOC (total organic carbon) [Pakostova a kol. 2013b]. Koncentrace Fe^{2+} byla stanovována o-fenantrolinovou metodou [Tamura a kol. 1974], koncentrace Fe^{3+} UV absorpční spektrofotometrií při 300 nm [Mandl a Novakova 1993], koncentrace SO_4^{2-} izotachoforeticky [Janiczek a kol. 1998], hladina kyslíku v bioreaktoru byla sledována kyslíkovou elektrodou (Mettler Toledo, Švýcarsko). Koncentrace sulfidů byla ve vzorcích určena modifikovanou metodou založenou na reakci s thiol-specifickým derivatizačním činidlem monobrombimanem, následovanou reverzně-fázovou fluorescenční HPLC (Agilent Technologies) [Fahey a Newton 1987]. Koncentrace kyslíku a respirační aktivita pro určení podmínek limitace kyslíkem byly měřeny při 26°C Clarkovou kyslíkovou elektrodou (Electrofact, Nizozemí) [Mandl a kol. 2014].

Stanovení ATP

Buněčný obsah ATP kultury *A. ferrooxidans* byl stanoven chemiluminiscenční metodou (ATP Biomass Kit HS, BioThema, Švédsko) na luminometru Junior LB 9509 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Německo) [Pakostova a kol. 2013a].

Transkriptomická analýza exprese genů

Expese vybraných genů během anaerobní oxidace síry u bakterie *A. ferrooxidans* byla analyzována reverzně transkripční kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) s využitím fluorescenčního interkalačního barviva SYBR Green (Promega) v zařízení Light Cyclers 480 (Roche), jak popsal Kucera a kol. [2016].

4. Souhrn výsledků

4.1. Studium změn obsahu ATP v bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} a S^0

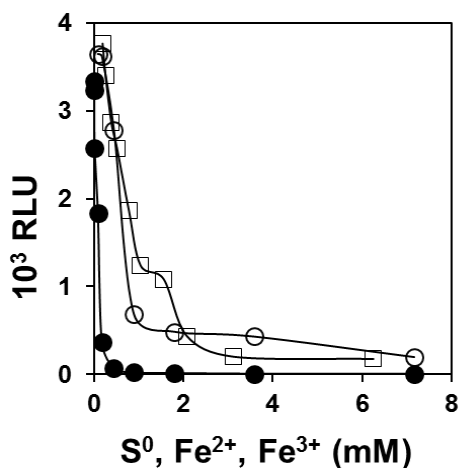
Sledování změn obsahu ATP může sloužit k rychlému monitorování růstu kultur, avšak obecným problémem těchto stanovení u acidofilních kultur oxidujících železo a síru je inhibice luciferasové aktivity ionty H^+ a dalšími inhibitory představujícími substráty nebo produkty bakteriálního metabolismu. Cílem našich studií bylo kromě monitorování biomasy i sledování metabolické souvislosti biooxidace substrátů a buněčného obsahu ATP [Pakostova a kol. 2013a, b].

V naší studii [Pakostova a kol. 2013a] byly inhibiční vlivy na stanovení ATP eliminovány definovaným ředěním, které způsobuje minimální prodloužení vlastní analýzy a zajišťuje tak výsledky odpovídající fyziologickým hodnotám ATP. Nejblíže našemu přístupu je práce Okibe a Johnson [2011], ve které bylo testováno několik mesofilních a termofilních bakterií. Data pro *A. ferrooxidans* se od našich liší, ale ve srovnání s naší studií autoři zkoumali energetiku dané bakterie pouze zevrubně, bez podrobného podchycení různých fází bioprosesu.

Žádná z uvedených studií nepřináší bioenergetické údaje o bakteriích oxidujících síru. Cílem naší práce bylo určit hladinu ATP v kulturách oxidujících železo a síru a získat informace o buněčném obsahu ATP a jeho souvislosti s metabolismem u bakterie *A. ferrooxidans*.

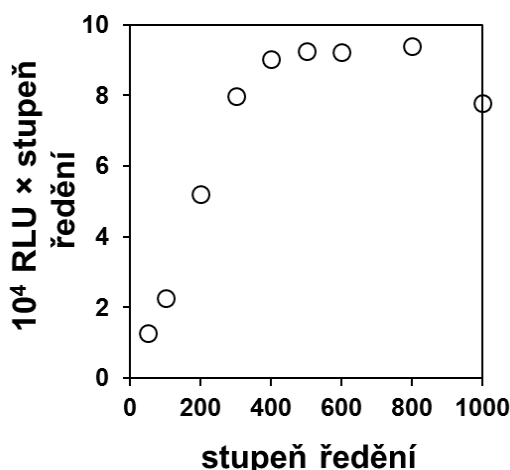
4.1.1. Extrakce ATP a inhibiční vlivy

Komerční kit Biomass Kit HS (BioThema, Švédsko) není výrobcem určen ke stanovování ATP v acidofilních chemolithotrofních kulturách, proto byla ověřena účinnost extrakce intracelulárního ATP. Srovnání průměrných hodnot ATP po extrakci za standardních podmínek dle výrobce, po extrakci při 100°C a po extrakci TCA v testované bakteriální kultuře uvádí Pakostová a kol [2013a]. Rozdíly mezi průměry byly nevýznamné ($P > 0,05$) a ani zvýšení doby extrakce na 5 h výtěžek ATP nezvýšilo. Buněčné ATP bylo za standardních podmínek dle výrobce uvolňováno s dostatečnou účinností a kit je tedy vhodný pro monitorování studovaných acidofilních kultur.



Obr. 19. Inhibice luciferasy bez přítomnosti bakterií (○) Fe²⁺, IC₅₀ = 0,62 mM. (●) Fe³⁺, IC₅₀ = 0,22 mM. (□) koloidní síra, IC₅₀ = 0,78 mM. RLU = relativní luminiscenční jednotka.

I přesto, že je reakční směs pro stanovení obsahu ATP pufrována a vzorek tvoří pouze 1/10 celkového objemu, luciferasová aktivita je inhibována ionty H⁺ a používanými substráty. Zatímco velmi nízké hodnoty pH kultivačního média stanovení inhibovaly, hodnoty od 1,8 do 6 aktivitu luciferasy výrazně neovlivnily. IC₅₀ pro Fe²⁺, Fe³⁺ a elementární síru uvádí legenda k obr. 19. Všechny inhibiční efekty (H⁺, S⁰, Fe²⁺, Fe³⁺) byly eliminovány ředěním kultury oxidující síru 50 krát a kultury oxidující železo 300 krát (obr. 20). Díky vysoké citlivosti metody tyto podmínky nadále postačily ke spolehlivé detekci ATP ve všech fázích růstu a oxidace substrátů.



Obr. 20. Intenzita luminiscence a ředění bakteriální kultury *A. ferrooxidans*. Rostoucí kultura oxidující železo byla ředěna růstovým médiem. RLU = relativní luminiscenční jednotka.

4.1.2. Mez stanovitelnosti

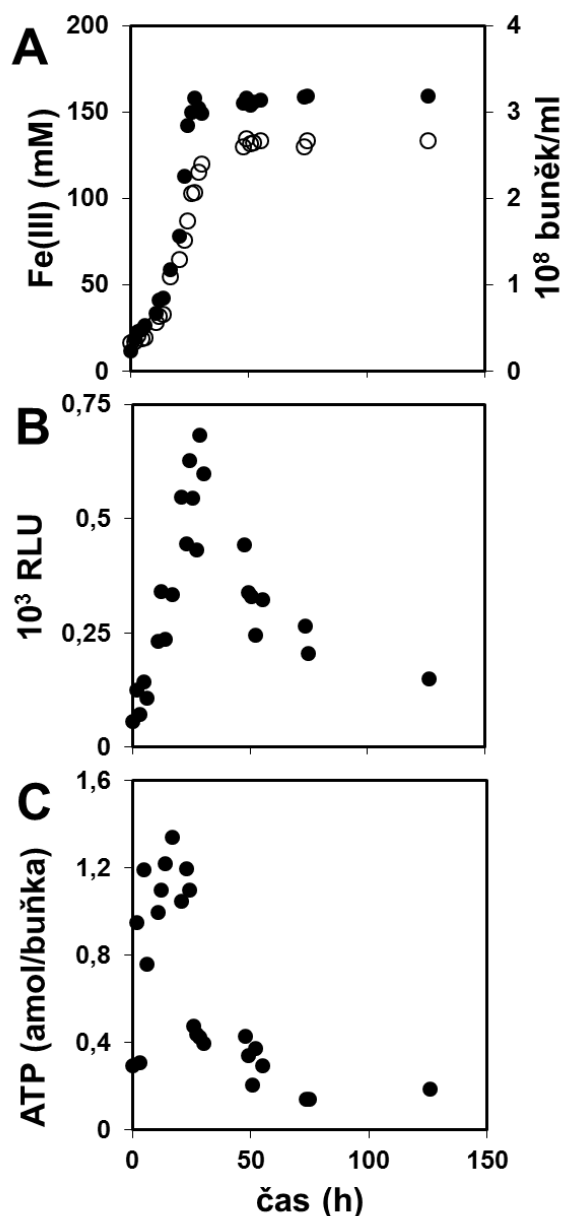
Instrukce výrobce doporučují používat 10 μl (tj. 1 pmol) vnitřního standardu ATP a uvádí, že hodnoty intenzity bioluminiscence (RLU) by měly po jeho přidavku vzrůst nejméně 10 krát pro zachování přesnosti. Avšak aby bylo dosaženo citlivé odpovědi ve vzorcích s nižším obsahem ATP v důsledku nižších bakteriálních počtů ve vzorcích, bylo třeba používat nižší přidavky vnitřního standardu. Pro kultury oxidující síru byl používán přidavek 1 μl (0,1 pmol) neředěného standardu, zatímco pro kultury oxidující železo 1 μl 10 krát ředěného standardu (0,01 pmol). Přesto, že autor konstruovaného kitu polemizoval s takovými poměry kvůli přesnosti získaných výsledků (Lundin, ústní sdělení), naše výsledky prokázaly spolehlivost postupu.

Meze stanovitelnosti byly 34 RLU v reakční směsi pro kulturu oxidující železo a 62 RLU pro kulturu oxidující síru, což za použití kalibrační přímky odpovídalo $3,5 \times 10^6$ buněk/ml pro kulturu oxidující železo a $2,4 \times 10^7$ buněk/ml pro kulturu oxidující síru (583 a 9600 buněk v reakční směsi) [Pakostová a kol. 2013a]. Tyto meze stanovitelnosti jsou významně vyšší ve srovnání s literaturou, což je důsledek vysokého ředění vzorků a kritéria zvoleného pro mez stanovitelnosti. Výrobce zejména neuvádí kritérium meze detekce, zato však její extrémně nízké hodnoty. Naše kritérium (Doerfell 1966) založené na kalibrační přímce patří k těm přísnějším volbám, ale zjevně více odráží reálné poměry použití. Každopádně bioluminiscenční stanovení je vhodné k monitorování kinetiky sledovaných bioprocusů, neboť výše uvedené meze stanovitelnosti jsou řádově nižší než inokulované bakteriální počty.

Fe^{2+} a elementární síra představují základní substráty pro *A. ferrooxidans*. Jejich oxidace je klíčovým aspektem ovlivňujícím biogeochemii v prostředí sulfidových minerálů a biohydrometalurgii.

4.1.3. Oxidace Fe^{2+}

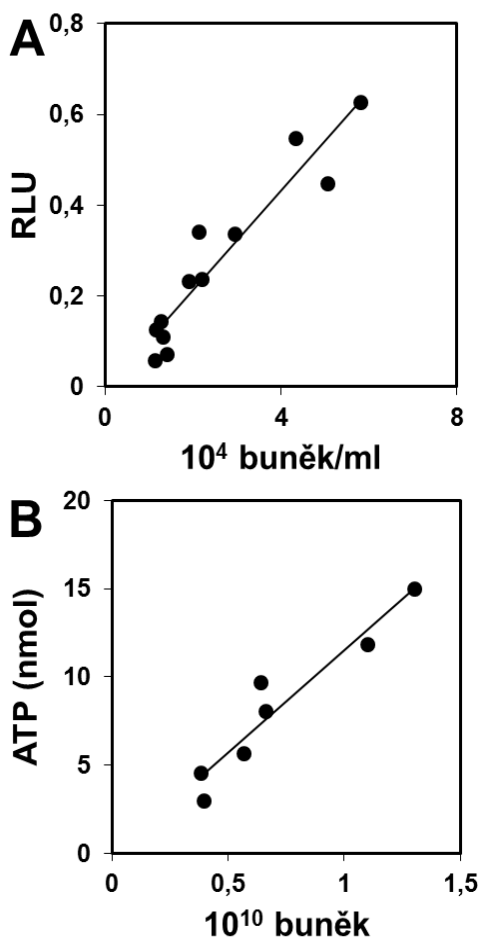
Obr. 21 ukazuje průběh kultury bakterií oxidujících Fe^{2+} . Lineární fázi růstu kultury a oxidace Fe^{2+} odpovídá lineární průběh intenzity bioluminiscence (vyjádřené v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU). Po úplné oxidaci Fe^{2+} dochází k zastavení růstu a během pár hodin k prudkému poklesu RLU (obr. 21B) a buněčného obsahu ATP (obr. 21C) v důsledku limitace substrátem.



Obr. 21. A: Průběh oxidace Fe^{2+} bakterií *A. ferrooxidans*. Koncentrace Fe^{3+} (●) a buněk (○) v kultuře. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP). C: Buněčný obsah ATP. RLU = relativní luminiscenční jednotka.

Železem nelimitovaná fáze růstu může být dokumentována lineárním vztahem mezi RLU a buněčným růstem (obr. 22A), což potvrzuje možnost použití RLU jako indikátoru buněčného růstu a oxidace substrátu. Vyčerpání Fe^{2+} tento vztah ruší a jasně tak odděluje tuto fázi od aktivního růstu. Průměrný maximální obsah ATP na buňku byl stanoven z fáze aktivního růstu. Směrnice na obr. 22B odpovídá $1,16 \pm 0,41$ amol ATP/buňka (95% interval spolehlivosti). Maximální buněčný obsah ATP bakterií oxidujících železo je srovnatelný s obecně uváděnou hodnotou 2 amol ATP/buňka [Lundin 2000]. Efremenko a kol. [2005] uvádí pro *A. ferrooxidans* hodnotu 270 amol ATP/buňka, která se zdá být silně nadhodnocená. Autoři neuvádí substrátové ani fyziologické podmínky experimentu. Okibe a Johnson [2011] publikovali hodnotu 0,08 amol ATP/buňka, která je výrazně nižší než námi

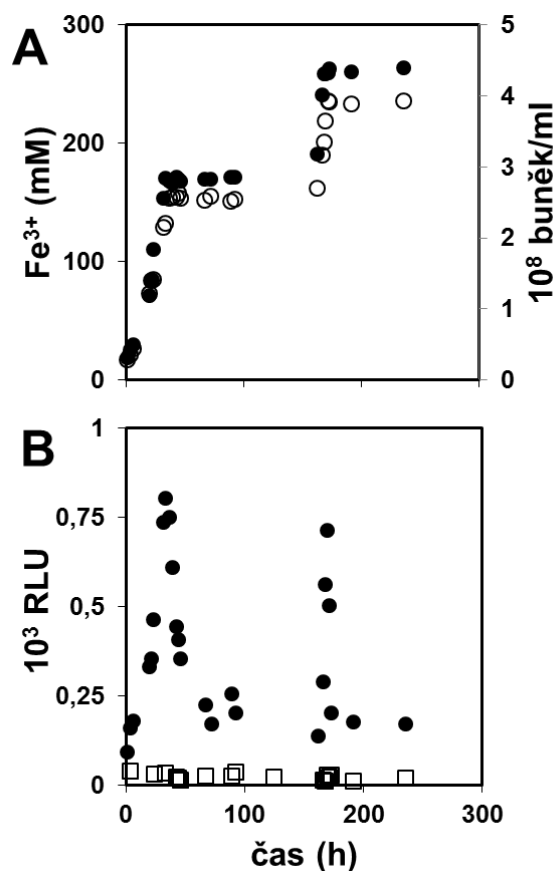
zjištěná hodnota. Velké rozdíly v hodnotách buněčného obsahu ATP by mohly být vysvětleny rozdílem v bakteriálních kmenech, jak dokumentovali Okibe a Johnson pro dva kmeny *Leptospirillum ferriphilum*. Pro rozdíly v hodnotách buněčného ATP však mohou být další důvody; naše hodnoty byly stanoveny z podrobného vzorkování kultury během substrátem nelimitované fáze, kdy je obsah ATP konstantní. Relativně nízká hodnota buněčného obsahu ATP popsaná Okibe a Johnsonem byla navíc získaná z buněčné suspenze, která byla oddělena od pyritu (kde je dominantním substrátem Fe^{2+}) centrifugací, což mohlo způsobit únik buněčného obsahu.



Obr. 22. A: Vztah mezi intenzitou bioluminiscence (vyjádřené v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU) a počtem buněk oxidujících železo v reakční směsi pro stanovení ATP, $r = 0,946$. B: Vztah mezi celkovým množstvím ATP a celkovými bakteriálními počty v kultuře, $r = 0,954$. Data odpovídají aktivní fázi růstu a oxidace Fe^{2+} (tj. mimo lag, limitaci substrátem a stacionární fázi).

Obr. 23A zobrazuje dvě fáze růstu a oxidace železa. Začátek prudkého poklesu RLU nastal 3 h po vyčerpání Fe^{2+} , zatímco bakteriální počty zůstaly relativně konstantní. Druhá fáze byla indukována přidávkou dodatečného množství Fe^{2+} ve stacionární fázi, která byla způsobena vyčerpáním Fe^{2+} . Po přidávku Fe^{2+} došlo k obnovení rychlosti růstu i oxidace na původní hodnoty. Průběh intenzity bioluminiscence (obr. 23B) s těmito změnami koreloval, a byl tak potvrzen blízký vztah mezi obsahem ATP v kultuře, jejím růstem a oxidací Fe^{2+} . Obr. 23B

také ukazuje extracelulární hladinu ATP, která byla pod mezí stanovitelnosti. Extracelulární ATP tedy může být považováno za zanedbatelné. Podobných hodnot bylo dosaženo, i jestliže byly buňky z kultury před stanovením ATP odstraněny membránovou filtrací.



Obr. 23. Průběh oxidace Fe^{2+} kulturou *A. ferrooxidans* ve dvou fázích. Druhá fáze byla iniciována přidavkem Fe^{2+} (90 mM) ve 161. h. A: Koncentrace Fe^{3+} (●) a buněk (○) v kultuře. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) v reakční směsi pro stanovení ATP (●), a bez bakterií (extracelulární ATP, □).

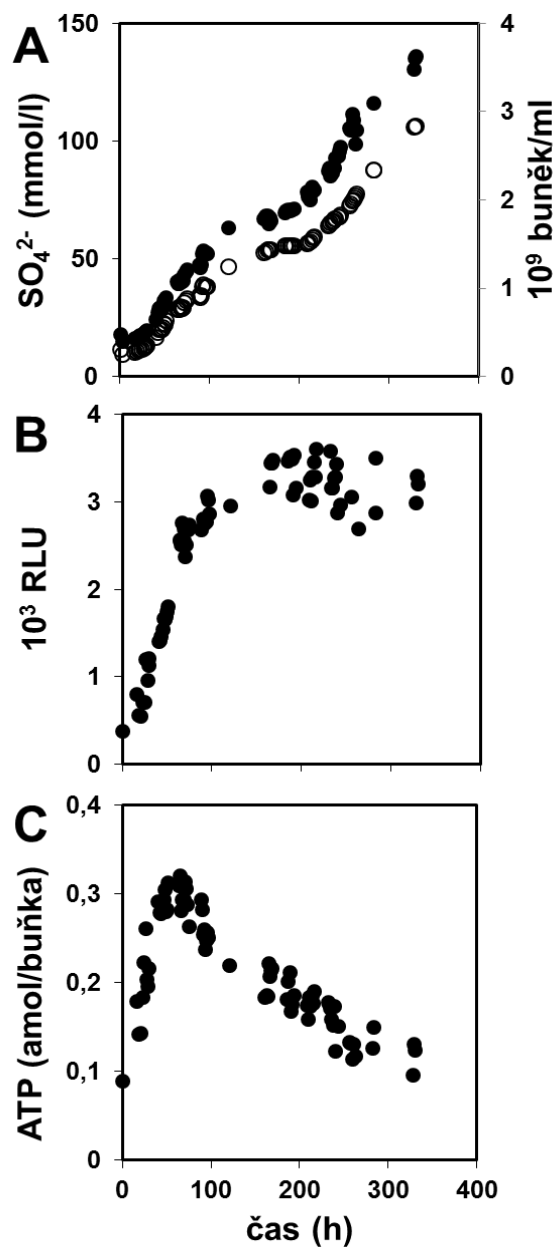
Okibe a Johnson [2011] popsali rychlý pokles v počtu životaschopných buněk *L. ferriphilum* po vyčerpání Fe^{2+} . Odpovídající buněčný obsah ATP 10^{-19} mol ATP/buňka v životaschopných buňkách byl relativně stabilní během oxidace Fe^{2+} i po jeho vyčerpání. Hodnoty RLU byly použity jako parametr pro detekci aktivní biomasy charakterizující fáze oxidace a vyčerpání substrátu, přestože závěry byly založeny na omezeném počtu experimentálních bodů. Je možné, že po vyčerpání Fe^{2+} byl relativně vysoký buněčný obsah ATP udržován endogenním metabolismem. Naše výsledky z konce aktivní fáze růstu a počátku limitace Fe^{2+} však ukazují výrazné změny RLU a buněčného obsahu ATP a nepodporují zapojení endogenního metabolismu. Počty kolonií na selektivním overlay médiu popsaném Johnsonem a Hallbergem [2007] neukázaly významný rozdíl mezi celkovými a životaschopnými buňkami na konci aktivní fáze růstu ve srovnání se začátkem limitace, což je ve shodě se studií Johnsona a kol. [2004]. Odlišné výsledky v počtu životaschopných buněk *L. ferriphilum* [Okibe a Johnson 2011] tak dokládají rozdíly v životaschopnosti mezi druhy.

V případě oxidace Fe^{2+} se rychlá bioluminiscenční metoda ukázala jako účinný nástroj k monitorování buněčného růstu oxidace substrátu. Intenzita bioluminiscence byla úměrná substrátem nelimitovanému procesu, takže její hodnota přímo odráží rychlost růstu a oxidace Fe^{2+} .

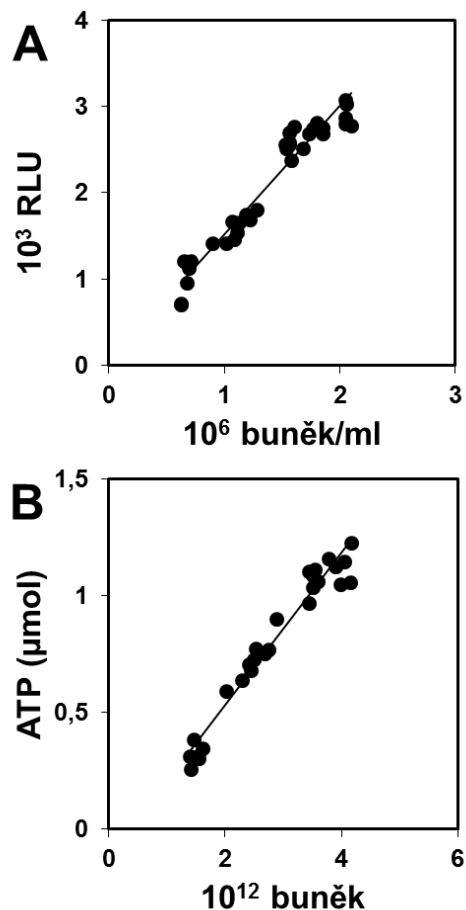
4.1.4. Oxidace elementární síry

Síra představuje, díky své velmi nízké rozpustnosti, specifický substrát ve srovnání s Fe^{2+} a rozpustnými sirnými látkami. Kromě toho, že je klíčovým substrátem ve fyziologii sirných bakterií, bývá častým meziproduktem (bio)oxidace sulfidů a její bakteriální oxidace je proto důležitá v biogeochemii i biohydrometalurgii.

Obr. 24 zobrazuje výsledky získané pro kulturu oxidující síru. Intenzita bioluminiscence a buněčný obsah ATP koreluje s lag, lineární i stacionární fází růstu. Jak se v dalších experimentech (obr. 26) ukázalo, na rozdíl od biooxidace Fe^{2+} zde primárně nešlo o limitaci sírou, ale inhibici H^+ . Sirný substrát, spolu s úpravou pH, byl přidán pouze z důvodu možnosti pozorovat dlouhodobě nový růstový a oxidační cyklus, bez potenciální limitace substrátem. Obr. 25A ukazuje lineární vztah mezi intenzitou bioluminiscence a růstem buněk v aktivní fázi růstu. V 210. h (obr. 24), kdy pH kultury kleslo na hodnotu 1,2, byl dodán přídatek 1,5 % (w/v) elementární síry a pH bylo upraveno na 3,5. Po úpravě došlo k obnovení rychlosti růstu a oxidace na původní hodnoty, ale intenzita bioluminiscence zůstala konstantní a buněčný obsah ATP dále klesal, až na zhruba 1/3 hodnot získaných během aktivní fáze růstu (obr. 24C). Tato anomálie, jejíž fyziologickou příčinu neznáme, omezuje univerzálnost použití bioluminiscenční metody k monitorování růstu a oxidace pouze na fázi aktivního růstu bez externích zásahů, jako je zvýšení pH.

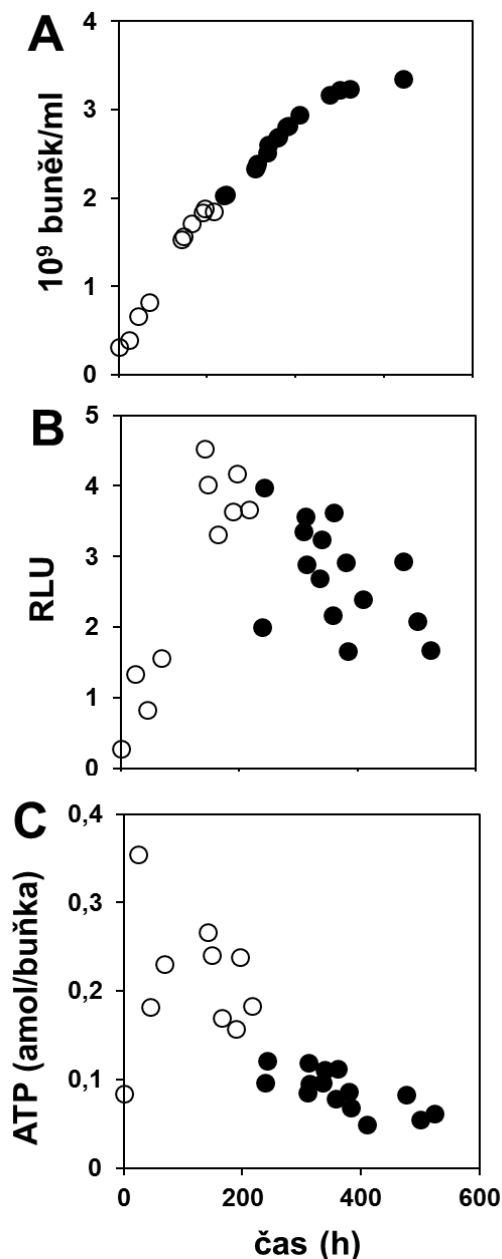


Obr. 24. Průběh oxidace elementární síry *A. ferrooxidans*. A: Koncentrace síranů (●) a buněk (○) v kultuře. B: Intenzita bioluminiscence (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP). C: Buněčný obsah ATP. V 210. h, po dosažení stacionární fáze, přidavek 1,5 % (w/v) elementární síry a úprava pH z 1,2 na 3,5.



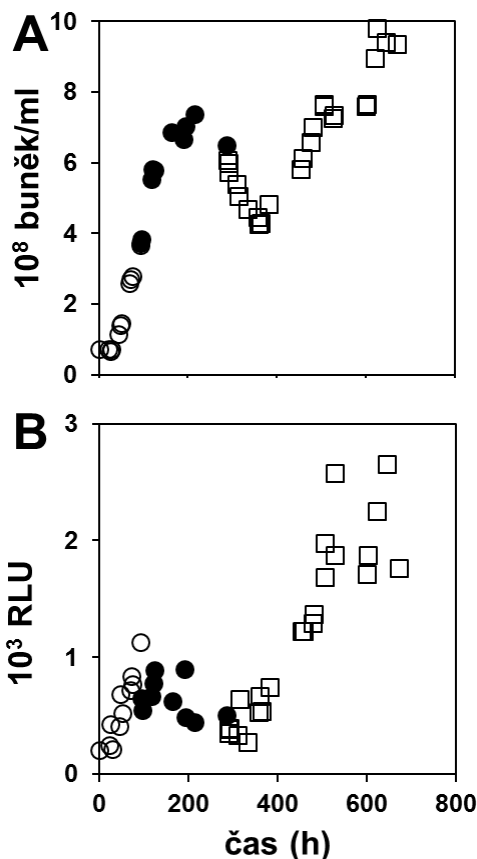
Obr. 25. A: Vztah mezi intenzitou bioluminiscence (vyjádřené v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU) a počtem buněk oxidujících síru v reakční směsi pro stanovení ATP, $r = 0,969$. B: Vztah mezi celkovým obsahem ATP a celkovým počtem buněk v kultuře, $r = 0,977$. Uvedená jsou data pro první část (26.-96. h) aktivní růstové fáze.

Další experimenty ukázaly, že stacionární fáze byla navozena inhibicí kyselinou sírovou, nikoliv limitací sírou. Jestliže bylo pH kultury ve stacionární fázi upraveno na původní hodnoty (obr. 26), ale bez přídavku síry, růst a oxidace (data pro oxidaci nevedena, průběh rychlosti oxidace sledoval průběh rychlosti růstu biomasy) byly obnoveny a průběh intenzity bioluminiscence byl ovlivněn ve shodě s obr. 24B.



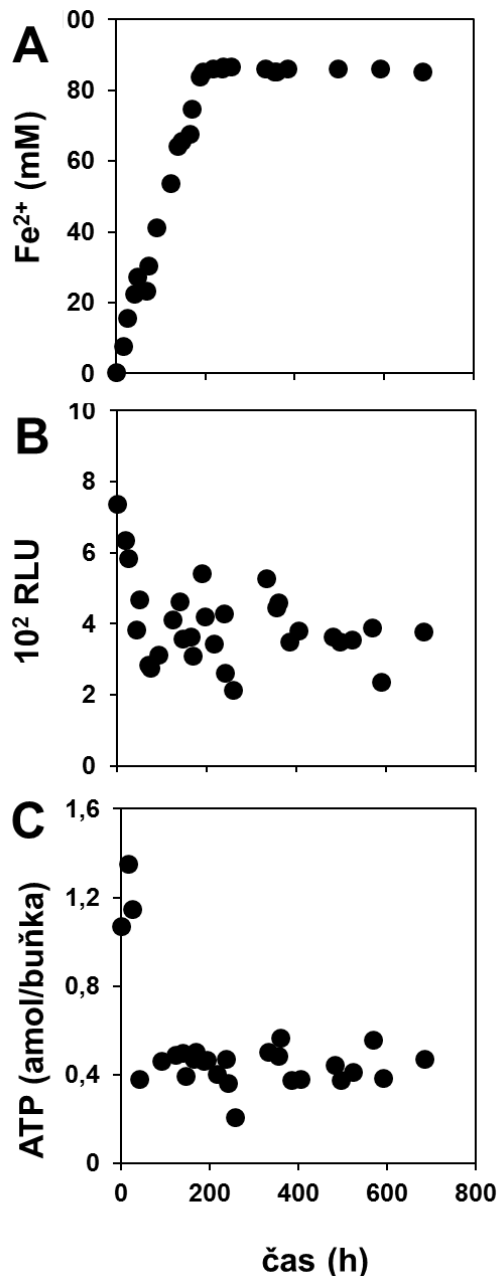
Obr. 26. Časový průběh oxidace elementární síry kulturou *A. ferrooxidans* ve dvou fázích. Druhá fáze byla iniciována zvýšením pH z 1,1 na 3,6 v 238. h. (○) před úpravou pH, (●) po úpravě pH. A: Koncentrace buněk. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP). C: Buněčný obsah ATP.

Přídavek síry po jejím vyčerpání, při pH udržovaném nad 2 (bez prudkých výkyvů pH) vedl k obnově rychlosti růstu, oxidace (data pro oxidaci neuvedena, průběh rychlosti oxidace sledoval průběh rychlosti růstu biomasy) i k nárůstu RLU (obr. 27), jak bylo popsáno u kultury oxidující železo. Tedy lze učinit závěr, že k poklesu buněčného obsahu ATP na obr. 24C došlo v důsledku zvýšení pH.



Obr. 27. Časový průběh oxidace elementární síry kulturou *A. ferrooxidans* ve třech fázích: První fáze (○) před úpravami. Druhá fáze (●) byla iniciována 1. zvýšením pH z 2,1 na 4,3 v 94. h, dále pH udržováno nad 2,0. Třetí fáze (□) byla iniciována přidavkem 1,5 % (w/v) elementární síry po jejím vyčerpání v 288. h. A: Koncentrace buněk. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP).

Průměrný maximální obsah ATP v buňce byl stanoven z fáze aktivního růstu a oxidace, před úpravou pH. Jeho hodnota byla určena ze směrnice přímky lineární regrese (obr. 25B) na $0,327 \pm 0,028$ amol ATP/buňka (95% interval spolehlivosti). Podobná hodnota, 0,4 amol/buňka, byla naměřena pro kulturu oxidující síru za anaerobních podmínek s Fe^{3+} coby akceptorem elektronů (obr. 28C). Extracelulární hladina ATP (data neuvedena) byla zanedbatelná v rámci experimentálních chyb a meze stanovitelnosti. Po dlouhodobé kultivaci (900 h) obsahující opakované přidavky substrátu a úpravy pH bylo extracelulární ATP stanovitelné, dosahovalo však maximálně 10 % hodnoty RLU aktivní kultury.



Obr. 28. Časový průběh anaerobní oxidace elementární síry *A. ferrooxidans* spojené s redukcí Fe³⁺. Koncentrace buněk byla 4×10⁸ buněk/ml. A: Koncentrace Fe²⁺ vznikajícího redukcí Fe³⁺. B: Intenzita bioluminiscence (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP. C: Buněčný obsah ATP.

Rozdíl mezi maximálním buněčným obsahem ATP v kultuře oxidující železo a síru byl významný ($P < 0,01$). Nízká hodnota pro bakterie oxidující síru by mohla být důsledkem kontinuální limitace sírným substrátem v důsledku jeho nízké rozpustnosti ve vodě [Cesková a kol. 2002]. Stejně tak nízké hodnoty naměřené během anaerobních podmínek by mohly být vysvětleny nízkou rozpustností způsobující limitaci substrátem. Limitace substrátem je tak pro biooxidaci síry určujícím kinetickým faktorem.

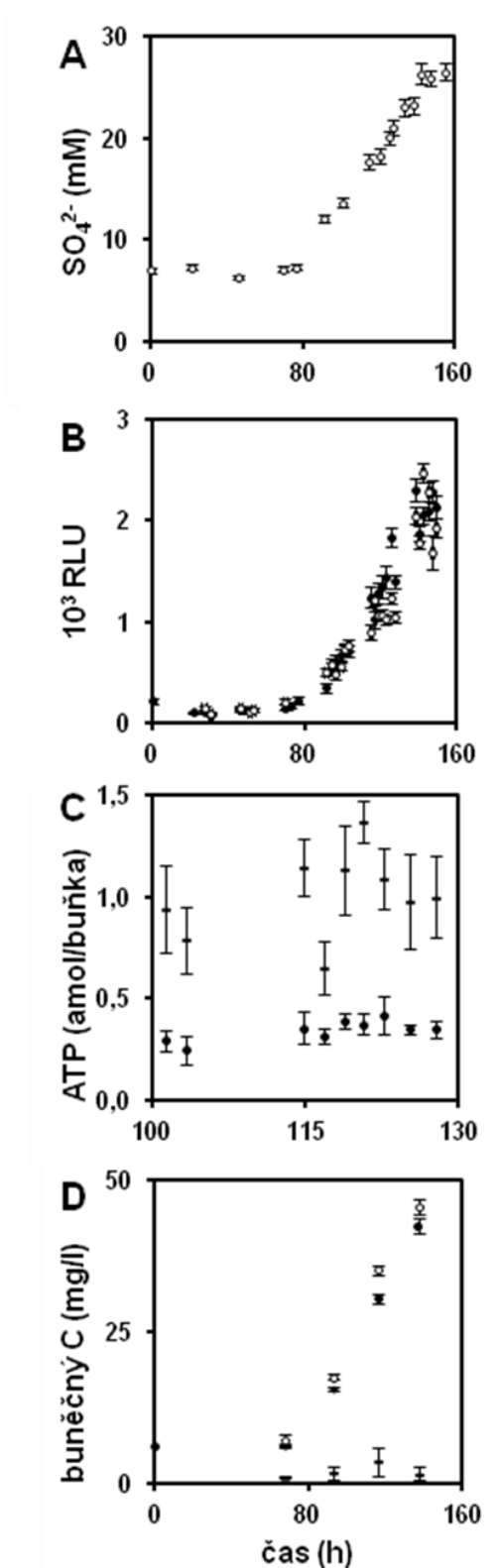
Ačkoliv jsou hodnoty maximálního buněčného obsahu ATP ovlivněny použitým substrátem, ve fázi aktivního růstu jsou konstantní a jsou ve shodě s průběhy intenzity bioluminiscence, buněčného růstu a substrátové oxidace. S výjimkou kultury oxidující síru v jiném metabolickém módu způsobeném úpravou pH kultury se bioluminiscenční metoda ukázala jako účinný nástroj k monitorování růstu a oxidace substrátů u bakterií oxidujících Fe^{2+} a síru v biogeochemických procesech a biohydrometalurgii.

4.1.4.1. Aktivity volných a na povrchu síry vázaných bakterií

Přestože je v kulturách oxidujících síru podíl buněk vázaných na povrchu síry ve srovnání s podílem planktonických relativně malý, jejich metabolismus hraje významnou roli při bakteriálním ataku na pevné substráty [Harneit a kol. 2006, Loser a kol. 2005]. Pravděpodobná role vázaných buněk při konverzi elementární síry na rozpustné formy, jako je koloidní síra a sulfooxyanionty, byla popsána dříve [Ceskova a kol. 2002]. Planktonické a vázané buňky jsou při růstu na pevných substrátech vystaveny různým kinetickým omezením. Vázaná frakce buněk nemusí podléhat substrátové limitaci, které jsou vystaveny planktonické buňky. V literatuře není o těchto kinetických rozdílech u *A. ferrooxidans* mnoho informací. Ačkoliv byl sledován bakteriální růst na elementární síře inkorporací ^{32}P [Espejo a Romero 1987] a mikroskopickými počty [Konishi a kol. 1994], údaje o buněčném obsahu ATP chybí. Konishi a kol. [1994, 1995] navrhl postupy pro uvolnění bakterií ze sirných částic pomocí CS_2 .

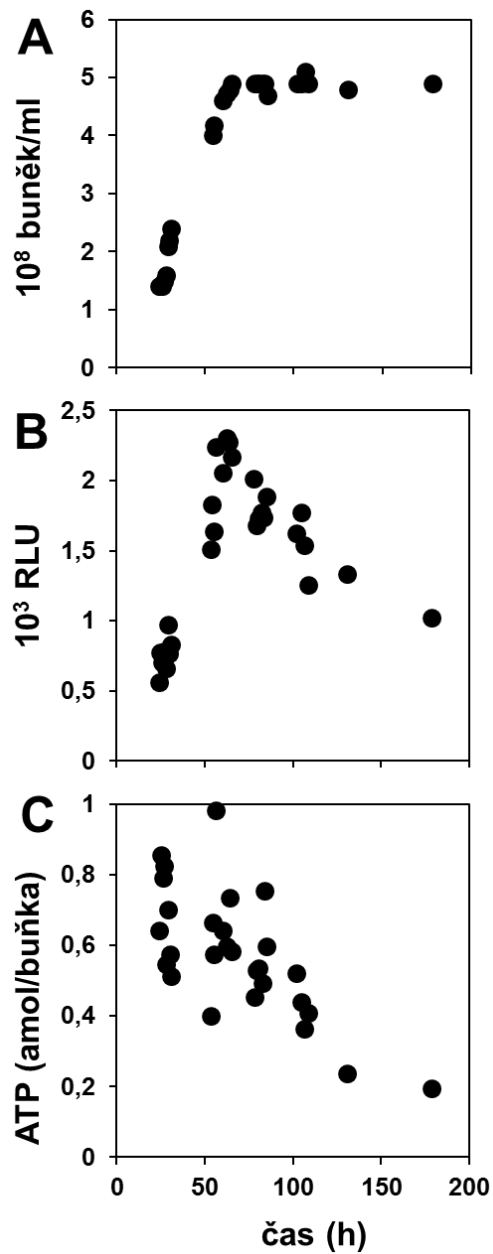
Provedli jsme studii srovnávající biomasu a buněčný obsah ATP planktonických buněk a buněk vázaných na povrchu elementární síry [Pakostova a kol. 2013b].

Obr. 29A a 29B zobrazuje vznik síranů a změny v intenzitě bioluminiscence během oxidace elementární síry *A. ferrooxidans*. Oba parametry byly úměrné buněčnému růstu v aktivní fázi, jak bylo popsáno dříve [Pakostova a kol. 2013a]. Intenzita bioluminiscence je na obr. 29B zobrazena zvlášť pro planktonickou frakci a pro celkovou frakci buněk. V rámci experimentálních chyb nebyl detegován rozdíl v intenzitě bioluminiscence stanovené v planktonické frakci a v celkové frakci buněk, a tedy příspěvek podílu vázaných buněk k měřenému celkovému obsahu ATP v kultuře se zdá zanedbatelný. Ani adheze ani uvolňování buněk tak nemá významný vliv na měřené hodnoty celkového ATP.

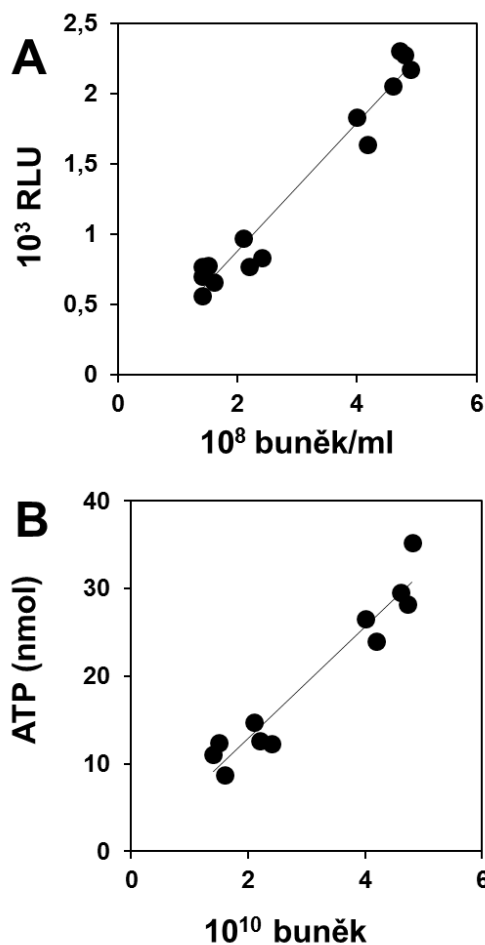


Obr. 29. Průběh oxidace elementární síry *A. ferrooxidans*. A: Koncentrace síranů. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře (vyjádřené v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi). Symboly: ○, celková frakce buněk; ●, planktonická frakce buněk. C: Buněčný obsah ATP ve vázaných (–) a planktonických (●) buňkách. D: Koncentrace buněčného uhlíku (TOC) celkové buněčné frakce (○), planktonických (●) a vázaných (–) buněk. 1 mg TOC = $1,25 \times 10^{10}$ buněk. Buněčné ATP je uvedeno pro hlavní část aktivní fáze růstu. Směrodatné odchylky jsou zobrazeny chybovými úsečkami, a pokud nejsou uvedeny, jsou menší než velikost symbolů.

Jestliže vztáhneme data na jednotlivé buněčné frakce, buněčný obsah ATP se pro každou frakci výrazně liší. Obr. 29C ukazuje buněčný obsah ATP planktonických a vázaných buněk. Buňky byly analyzovány z kultury v aktivní fázi, kdy je buněčný obsah ATP maximální [Pakostova a kol. 2013a]. Jeho hodnota pro planktonické buňky byla stanovena na $0,34 \pm 0,05$ a pro vázané na $1,01 \pm 0,21$ amol ATP/buňka (průměr \pm s). Rozdíl mezi těmito hodnotami je vysoce významný ($P < 0,01$). Průměrný obsah ATP planktonických buněk je ve shodě s výsledky získanými pro mnohé subkultury *A. ferrooxidans* oxidující síru. Buněčný obsah ATP vázaných buněk je srovnatelný s hodnotou 1,16 amol ATP/buňka, která byla stanovena pro *A. ferrooxidans* oxidující železo [Pakostova a kol. 2013a]. Oxidace thiosíranu (obr. 30, 31), která po vzniku elementární síry coby meziprojektu částečně zahrnuje adsorpci buněk, poskytla hodnotu $0,63 \pm 0,12$ amol ATP/buňka (obr. 31). Rozdíly mezi touto hodnotou a buněčným obsahem pro vázané a planktonické sírné buňky ($1,01$ a $0,34$ amol ATP/buňka) byly významné ($P < 0,05$). Hodnota pro thiosíranové buňky je také významně nižší než 1,16 amol ATP/buňka pro kultury oxidující železo [Pakostova a kol. 2013a]. Změna rozpustného thiosíranu na nerozpustný sírný substrát, který je pak především planktonickými buňkami oxidován, může snížit buněčný obsah ATP v celkové biochemické energetické bilanci. Proto, dle očekávání, je hodnota buněčného obsahu ATP thiosíranových buněk nižší než u buněk oxidujících železo a buněk vázaných na elementární síře, ale vyšší než u sírných planktonických buněk.



Obr. 30. Časový průběh aerobní oxidace thiosíranu kulturou *A. ferrooxidans*. A: Koncentrace buněk. B: Intenzita bioluminiscence v kultuře (vyjádřená v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU, v reakční směsi pro stanovení ATP). C: Buněčný obsah ATP.



Obr. 31. A: Vztah mezi intenzitou bioluminiscence (vyjádřené v relativních luminiscenčních jednotkách, RLU) a počtem buněk oxidujících thiosíran v reakční směsi pro stanovení ATP, $r = 0,979$. B: Vztah mezi celkovým obsahem ATP a celkovým počtem buněk v kultuře, $r = 0,964$. Uvedená data odpovídají aktivní fázi růstu a oxidace thiosíranu (tj. mimo lag, limitaci substrátem a stacionární fázi).

Třikrát vyšší buněčný obsah ATP vázaných buněk lze vysvětlit mikroprostředím na povrchu substrátu, kde buňky mohou oxidovat elementární síru. Z nízké rozpustnosti elementární síry ve vodě a lineární kinetiky její oxidace vyplývá, že v kultuře jsou dominantní planktonické buňky. Ty jsou však závislé na rozpustných nebo koloidních meziproductech pravděpodobně produkovaných vázanými buňkami během oxidace elementární síry, a jsou tedy limitované dostupností substrátu [Ceskova a kol. 2002]. Vázané buňky na druhou stranu nejsou této substrátové limitaci vystaveny, protože sírné sloučeniny jsou na rozhraní povrchu síry a kapaliny zjevně biodostupnější. Předpokládáme, že sírou nelimitovaný metabolismus zvýšil buněčný obsah ATP do té míry, že je srovnatelný s hodnotou pro buňky oxidující železo [Pakostova a kol. 2013a] a odpovídá stavu bez limitace substrátem. Pro velmi malý podíl adsorbované biomasy se její buněčný obsah ATP v celkové kultuře adsorbovaných a volných buněk měřitelně neprojeví. Dříve deklarovaná limitace sírou [Ceskova a kol. 2002] je v souladu s těmito závěry. Tedy dříve popsaná limitace sírou [Ceskova a kol. 2002] by mohla vysvětlovat několikanásobný rozdíl v buněčném obsahu ATP.

4.1.4.2. Množství biomasy adsorbované na povrchu síry

Planktonické a vázané buňky ve čtyřech reprezentativních vzorcích kultury byly separovány a analyzovány pomocí TOC (obr. 29D). Výsledky měly malou experimentální chybu a určily významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi množstvím planktonických a vázaných buněk. Tyto významné rozdíly nebyly pozorovány mezi bioluminiscencí celkových a planktonických buněk (obr. 29B). Navíc součet hodnot stanovených pomocí TOC pro planktonické buňky a vázané buňky souhlasil s hodnotami pro celkovou biomasu (obr. 29D). Vázané buňky tvořily 14,4; 10,4; 10,4 a 3,7 % celkového organického uhlíku ve čtyřech analyzovaných vzorcích kultury oxidující síru (obr. 29D). Průměrná hodnota 10 % vázaných buněk odpovídá údajům uvedeným dříve pro buňky *A. ferrooxidans* [Konishi a kol. 1994] a *A. thiooxidans* [Konishi a kol. 1995] rostoucích na síře. Odhad 5 % adsorpce buněk byl publikován Ceskovou a kol. [2002] pro kulturu *A. ferrooxidans* oxidující síru.

Chyby ve stanovení buněčných počtů jsou obecně vyšší než 10 %, ale tento problém zde byl odstraněn vysokou přesností TOC analýz, které umožnily rozlišit frakci planktonických buněk od celkové frakce buněk, i přesto, že hodnoty jsou v aktivní fázi růstu podobné. Vázané buňky představují v kulturách oxidujících síru malý podíl a jejich příspěvek k celkové biomase může být z praktického hlediska zanedbán.

Rozdíly počtů buněk vázaných na g síry při srovnání čtyř analyzovaných vzorků mezi sebou (obr. 29D) byly nevýznamné ($P > 0,05$). Průměrná hodnota byla $0,23 \pm 0,06$ mg buněčného C/g síry, což odpovídá $(2,85 \pm 0,68) \times 10^9$ (průměr \pm s) buněk vázaných na g síry při použití přepočtu $1 \text{ mg TOC} = 1,25 \times 10^{10}$ buněk. Harneit a kol. [2006] publikovali hodnotu $1,4 \times 10^9$ buněk vázaných na g síry, Konishi a kol. [1994] uvedli maximální sorpci $4,9 \times 10^{10}$ buněk/g síry.

Získané výsledky podporují hypotézu, že první oxidují sírný substrát vázané buňky a to bez limitace sírou, zatímco planktonické buňky jsou na jejich činnosti závislé. Dále zdůrazňují význam kontaktu malého podílu bakteriální populace s pevným substrátem a přispívají k charakterizaci bakterií oxidujících síru, které se účastní biogeochemických cyklů a environmentálních procesů.

4.2. Kritické hodnoty objemového koeficientu přestupu kyslíku a koncentrace kyslíku pro bakterii *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} a S^0

Fe^{2+} a S^0 jsou klíčové bakteriální substráty ve spontánních procesech v přírodě i bihydrometalurgii a jejich aerobní oxidace je nejběžnějším způsobem získávání ATP. Zásadní je pochopitelně dostatečná přítomnost kyslíku, což je zabezpečeno takovými podmínkami aerace, jež brání limitaci kyslíkem. Tyto podmínky musí zahrnovat dodávku kyslíku i jeho spotřebu respirací. I krátkodobá limitace kyslíkem nejen omezí rychlost oxidačních procesů, ale u některých organismů nevratně poškozuje respirační systém. Proto cílem této kapitoly je kvantifikovat podmínky minimální aerace pomocí vhodně měřitelných

parametrů (Mandl a kol. 2014). Kmen *A. ferrooxidans* CCM 4253 byl aplikován pro tato zjištění proto, že měl mezi izoláty z opuštěných českých dolů nejvyšší rychlost oxidace Fe^{2+} (rychlost oxidace S^0 byla srovnatelná s dalšími izoláty) a jeho vysoká respirační aktivita tak vyúsťuje v potřebu vyšší intenzity aerace. Regulace aerace je exaktně možná pouze v kulturách v bioreaktoru při přípravě biomasy pro vědecké nebo biohydrometalurgické účely. Vzhledem k tomu, že aerace představuje významnou část nákladů bioloužení [Sreekrishnan a Tyagi 1996], určení podmínek minimální aerace má kromě biochemických souvislostí i ekonomické dopady.

Podmínky minimální aerace během oxidace Fe^{2+} a elementární síry jsme definovali pomocí kritické hodnoty objemového koeficientu přestupu kyslíku $(k_{LA})_{\text{crit}}$ a kritické koncentrace rozpuštěného kyslíku C_{crit} zabezpečující kyslíkem nelimitovanou oxidaci substrátu.

Objemový koeficient přestupu kyslíku je robustní parametr, často využívaný k charakterizaci podmínek aerace v bioreaktorech [Doran 1995; Noorman 2006]. Je to také hojně analyzovaný a diskutovaný parametr v bioloužicích procesech [Boon a Heijnen 1998; Petersen 2010]. Jeho kritická hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$ je systémový parametr, který definuje minimální aeraci v bioreaktoru potřebnou k udržení oxidace substrátu bez limitace kyslíkem. Hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$ je konstantní pro konstantní podmínky aerace daného bioreaktoru a konstantní rychlost respirace. Kultura během růstu v bioreaktoru obvykle zvyšuje svou celkovou (volumetrickou) rychlost respirace a oxidace substrátu, a tím i potřebu vyšší dodávky kyslíku. Nejvyšší požadavek na dodávku kyslíku je spojen s fází nejvyšší metabolické aktivity a související maximální rychlostí respirace. Jestliže má být $(k_{LA})_{\text{crit}}$ použita jako parametr minimální aerace, musí pokrýt všechny fáze růstu kultury, aby byla zajištěna oxidace substrátu nelimitovaná kyslíkem v jakékoli fázi bioprocesu.

C_{crit} se rovněž využívá k charakterizaci požadavku na kyslík. Je definována jako nejnižší koncentrace kyslíku, která nelimituje rychlost bakteriální respirace. Ustaluje se při intenzitě aerace dané hodnotou $(k_{LA})_{\text{crit}}$. C_{crit} , na rozdíl od k_{LA} , odráží biochemické vlastnosti bakterií (souvisí s Michaelisovou konstantou pro kyslík). Navíc je závislá na substrátu, ne však na podmínkách kultivace a parametrech bioreaktoru.

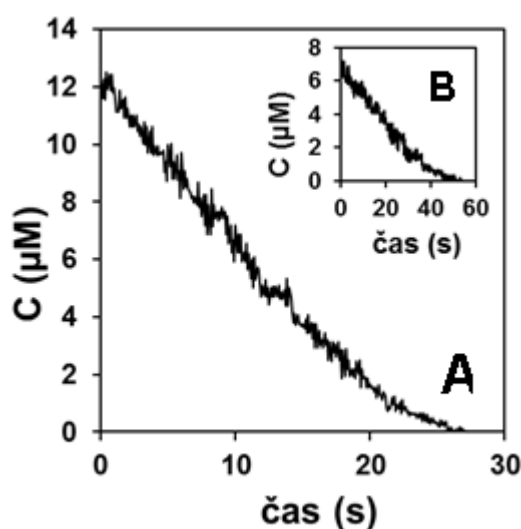
Bioloužení sulfidů kovů acidofilními chemolithoautotrofními bakteriemi oxidujícími železo a síru [Dopson a Johnson 2012; Johnson 2010; Vera a kol. 2013] je závislé na dodávce kyslíku, zjevně především pro biooxidaci Fe^{2+} a S^0 jako meziproductů chemických oxidací sulfidů, ačkoliv anaerobní oxidace elementární síry může rovněž probíhat [Kucera a kol. 2012a,b; Osorio a kol. 2013]. Vliv kyslíku je obvykle zjišťován v mediích obsahujících různá množství pomletých sulfidických minerálů [Bailey a Hansford 1993; Boon a Heijnen 1998; Boon a kol. 1992; Crundwell 2000; Deveci a kol. 2003; Seidel a kol. 2006]. Rozsuspendované pevné látky (s navázanými buňkami) představují bariéru ovlivňující transfer kyslíku. Zokaei-Kadijani a kol. [2013] například prokázali, že 5-15 % polymetalické horniny mělo negativní vliv na k_{LA} , a tedy na biologickou oxidaci Fe^{2+} . Stejný efekt byl pozorován i u bioloužení 10 % (w/v) pyritické zlaté horniny, které vedlo k limitaci oxidace Fe^{2+} při 1,2 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ [Sun a kol. 2012a]. Obecně to vypadá, že hladiny kyslíku pod 1 – 2 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ negativně ovlivňují

oxidační aktivitu bakterií v přítomnosti sulfidových minerálů [Deveci a kol. 2003]. Kultury acidofilních bakterií s Fe^{2+} a S^0 coby substrátem představují standardní podmínky pro stanovení nároků na kyslík a limitace kyslíkem bez difúzních bariér, které vytváří rozsuspendované sulfidy. Z praktického hlediska je u bioloužení sulfidických minerálů, které se uskutečňuje buď v míchaných tankových bioreaktorech nebo na haldách [Jadhav a kol. 2013; Johnson 2010], stěžejní oxidace Fe^{2+} . Elementární síra je oxidována acidofily oxidujícími síru na kyselinu sírovou [Fazzini a kol. 2013]. Je také meziproduktem v drahách oxidace anorganických sírných sloučenin včetně mnoha sulfidických minerálů.

4.2.1. Limitace kyslíkem a kritické hodnoty C_{crit} a $(k_L a)_{\text{crit}}$

Pro stanovení C_{crit} byly koncentrace rozpuštěného kyslíku detegovány s 10násobnou citlivostí, avšak na úkor vyššího šumu (obr. 32) ve srovnání se standardními podmínkami měření. Standardní měření vyšších hodnot koncentrace rozpuštěného kyslíku C (např. saturační křivka, která byla použita pro data na obr. 33) jsou prakticky bez šumu.

Hodnota C_{crit} byla určena v bodě, kde se lineární pokles C , odpovídající maximální rychlosti respirace (Q), změnil na nelineární, indikující tak začátek limitace kyslíkem. Tento bod byl určen jako průsečík dvou regresních přímek získaných proložení nelineární části a zlinearizované počáteční fáze nelineární části poklesu C (počáteční oblast limitace kyslíkem). Lineární část byla proložena přímkou od 12 do 4 μM pro kulturu oxidující železo ($r = 0,97$) a od 7 do 2 μM pro kulturu oxidující síru ($r = 0,96$) (obr. 32). Pro nelineární část byl počátek poklesu C (od 4 do 2 μM pro kulturu oxidující železo a od 2 do 0,5 μM pro kulturu oxidující síru, obr. 32) proložen rovněž lineární funkcí ($r = 0,91$ pro kulturu oxidující železo a $r = 0,88$ pro kulturu oxidující síru). Hodnoty odpovídající průsečíku regresních přímek byly velmi nízké. Aby se omezilo podhodnocení, byla jako C_{crit} určena dvojnásobná koncentrace kyslíku. Tyto rovněž nízké hodnoty ale s větší jistotou odpovídaly stále lineární (nelimitované) části průběhu spotřeby kyslíku.



Obr. 32. Průběh koncentrace kyslíku v kultuře *A. ferrooxidans* respirující na Fe^{2+} (A) a elementární síře (B) v uzavřené komůrce s Clarkovou elektrodou.

Hodnota C_{crit} pro oxidaci Fe^{2+} byla 6,250 a pro oxidaci elementární síry 3,125 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$. Hodnoty C_{crit} jsou přímo spojeny s Michaelisovou konstantou pro kyslík (K_m). Odpovídající hodnoty K_m byly $1,07 \pm 0,16 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ pro oxidaci Fe^{2+} a $0,61 \pm 0,08 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ (průměr \pm s, $n = 3$) pro oxidaci S^0 . Rozdíl mezi hodnotami K_m byl významný ($P < 0,05$). Nižší K_m získaná pro elementární síru je ve shodě s nižší hodnotou C_{crit} . Získané hodnoty K_m a koncentrace C_{crit} mohou být univerzální, protože rozdíly v těchto hodnotách pro mnoho jiných kmenů z různých geografických oblastí jsou nevýznamné (nepublikovaná data).

K_m byla v buněčné suspenzi stanovena na základě experimentálních dat použitých na stanovení C_{crit} (obr. 32). Hodnota K_m byla určena v triplicích dosazením experimentálních dat $Q = f(C)$ do rovnice Michaelise-Mentenové použitím nelineární regrese. Q bylo vypočítáno jako dC/dt použitím numerické derivace dat v obr. 32. Podmínky pro minimální aeraci byly určeny $(k_{LA})_{\text{crit}}$. Rovnice (19) popisuje saturaci buněčné suspenze atmosférickým kyslíkem, která nastává souběžně s příjmem kyslíku bakteriemi [Doran 1995]:

$$dC/dt = k_{LA}(C^* - C) - Q \quad (19)$$

kde t je čas a C^* je saturační (maximální) koncentrace rozpuštěného kyslíku. Při ustáleném stavu platí $dC/dt = 0$ a Q je definováno jako

$$Q = k_{LA}(C^* - C') \quad (20)$$

kde C' je koncentrace rozpuštěného kyslíku v ustáleném stavu. Po substituci C_{crit} za C' pro $(k_{LA})_{\text{crit}}$ platí:

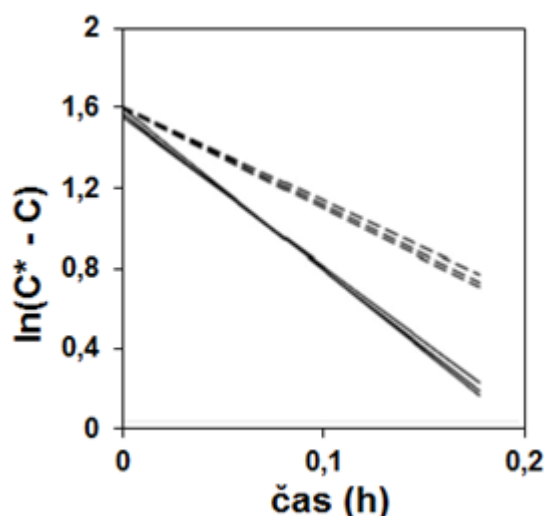
$$(k_{LA})_{\text{crit}} = Q / (C^* - C_{\text{crit}}) \quad (21)$$

K nezávislému ověření $(k_{LA})_{\text{crit}}$, která byla vypočítaná z rovnice (21), byla použita statická vytěšňovací technika využívající destilovanou vodu bez bakterií. 1. bakteriální kultura (s maximálním Q) byla přenesena do komůrky a magneticky míchána. Aerace byla nastavena tak, aby bylo dosaženo C_{crit} . Aerace za těchto podmínek představovala ustálený stav při C_{crit} a odpovídala aeraci při $(k_{LA})_{\text{crit}}$ podle rovnice (21). 2. byla provedena statická vytěšňovací technika s destilovanou vodou bez bakterií za stejných podmínek aerace, se stejným objemem a rychlostí míchání. Destilovaná voda byla nasycena plynným N_2 , koncentrace kyslíku tak byla snížena na hodnotu blízkou nule (C_0). Následně byla voda resaturována atmosférickým kyslíkem a z resaturační křivky byla získána hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$. Řešením rovnice (19) ($Q = 0$) je lineární vztah:

$$\ln(C^* - C) = \ln(C^* - C_0) - k_{LA} \times t \quad (22)$$

kde C_0 je koncentrace rozpuštěného kyslíku v čase $t = 0$. Hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$ byla určena jako směrnice závislosti $\ln(C^* - C)$ na čase použitím lineární regrese dat získaných rovnicí (22)

(obr. 33). Standardní hodnota C^* v destilované vodě při teplotě 26°C a aktuálním atmosférickém tlaku byla 250 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$, a byla použita ve všech experimentech.



Obr. 33. Určení $(k_{LA})_{\text{crit}}$ v destilované vodě s použitím statické vytěšňovací techniky. Každá regresní přímka je výsledkem nezávislého experimentu. Aerační podmínky simulují ustálený stav s maximálním Q kultury *A. ferrooxidans* oxidující Fe^{2+} při $C_{\text{crit}} = 6,250 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ (---) a elementární síru při $3,125 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ (—).

Pro oxidaci Fe^{2+} (průměr \pm s, $n = 3$) $Q = 31,3 \pm 1,5 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a z rovnice (21) $(k_{LA})_{\text{crit}} = 7,70 \pm 0,37 \text{ h}^{-1}$. Při použití vytěšňovací techniky a dat z obr. 33 $(k_{LA})_{\text{crit}} = 7,83 \pm 0,31 \text{ h}^{-1}$. Rozdíl mezi $7,70$ a $7,83 \text{ h}^{-1}$ je nevýznamný ($P > 0,05$). Pro oxidaci elementární síry (průměr \pm s, $n = 3$) $Q = 20,08 \pm 0,20 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a $(k_{LA})_{\text{crit}} = 4,88 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$. Při použití vytěšňovací techniky a dat z obr. 33 $(k_{LA})_{\text{crit}} = 4,93 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$. Rozdíl mezi $4,88$ a $4,93 \text{ h}^{-1}$ je opět nevýznamný ($P > 0,05$). Tedy statická vytěšňovací technika potvrdila $(k_{LA})_{\text{crit}}$ stanovené za ustálených a fyziologických podmínek (dle rovnice (21)).

Rozdíl mezi $(k_{LA})_{\text{crit}}$ pro kultury oxidující železo a síru, $7,70$ a $4,88 \text{ h}^{-1}$, byl vysoce významný ($P < 0,01$). Nižší hodnota $(k_{LA})_{\text{crit}}$ pro kulturu oxidující síru je ve shodě s nižšími hodnotami C_{crit} a K_m . Obě hodnoty $(k_{LA})_{\text{crit}}$ definují minimální stupeň aerace potřebný k tomu, aby bylo předcházeno limitaci kyslíkem v bioreaktorech.

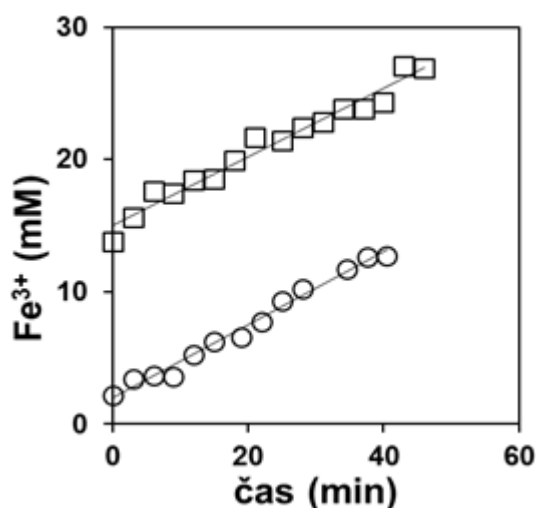
Abychom získali relativně univerzální hodnotu $(k_{LA})_{\text{crit}}$, která by zajišťovala aeraci bez limitace kyslíkem ve všech fázích oxidace substrátu, měla by hodnota Q v rovnici (21) odpovídat maximální hodnotě zjištěné ve fázi maximální metabolické aktivity. Při maximální Q by měla aerace při $(k_{LA})_{\text{crit}}$ mít za následek kyslíkem nelimitovanou substrátovou oxidaci, protože C neklesá pod C_{crit} . Hodnoty C jsou při $(k_{LA})_{\text{crit}}$ v kulturách s nižším Q vyšší než C_{crit} . Tedy $(k_{LA})_{\text{crit}}$ by měla předcházet limitaci kyslíkem i ve fázích oxidace substrátu s nejvyššími nároky na kyslík. Hodnoty Q standardních kultur pro výpočet $(k_{LA})_{\text{crit}}$ byly srovnatelné s nejvyššími publikovanými hodnotami. Pokud by se přece jen vyskytla vyšší hodnota Q , $(k_{LA})_{\text{crit}}$ může být korigován z rovnice (21).

Ačkoliv mohou bakterie během oxidace elementární síry adherovat na povrch substrátu a tvořit biofilm, získané výsledky nenaznačují výraznou limitaci kyslíkem způsobenou difúzními bariérami. Naopak nároky na kyslík byly nižší u kultur oxidujících síru v porovnání s kulturami oxidujícími železo, pravděpodobně v důsledku nízkého počtu adherovaných buněk, neboť planktonické buňky tvoří převažující podíl biomasy v aktivní růstové fázi [Pakostova a kol 2013b]. Nerozpustnost siřného substrátu tedy nehrála při limitaci kyslíkem u kultur oxidujících síru roli.

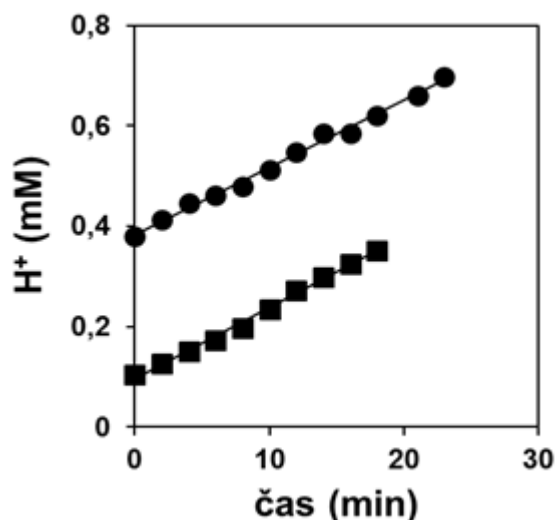
4.2.2. Kritická koncentrace kyslíku a substrátová oxidace

Abychom ověřili hodnoty C_{crit} určené respirometrickými experimenty (sekce 4.2.1.) dalším nezávislým experimentem, ve větším měřítku a po delší čas, sledovali jsme produkty oxidace Fe^{2+} a S^0 v buněčných suspenzích v 5-l bioreaktoru, jak bylo popsáno dříve [Pakostova a kol 2013b; Pokorna a kol. 2007]. Změnou nastavení aerace byly testovány rychlosti oxidace substrátu při vysokém C a C_{crit} . Pro určení rychlosti oxidace Fe^{2+} bylo použito spektrofotometrické stanovení Fe^{3+} [Mandl a Novakova 1993] a rychlost oxidace S^0 byla určena stanovením koncentrace H^+ pH elektrodou. Jestliže nedochází ke změnám rychlostí oxidace substrátů při C_{crit} a při výrazně vyšší hodnotě C , potvrzuje to vyloučení limitace kyslíkem při C_{crit} .

Oxidace Fe^{2+} a S^0 buněčnými suspenzemi z bioreaktoru jsou zachyceny na obr. 34 a 35. Výsledky potvrdily, že hodnoty C_{crit} určené respirometrickými experimenty (sekce 4.2.1.) zaručují kyslíkem nelimitovanou oxidaci Fe^{2+} a S^0 . Lze uzavřít, že snížení rychlostí oxidace v důsledku limitace kyslíkem by mohlo nastat až při hodnotách C pod C_{crit} .



Obr. 34. Oxidace Fe^{2+} klidovými buňkami *A. ferrooxidans*. Tvorba Fe^{3+} při $C_{crit} = 6,250 \mu\text{mol O}_2/l$ (○, $r = 0,992$), Fe^{2+} -oxidační aktivita na buňku byla 690 amol/min ; při $C = 187 \mu\text{mol O}_2/l$ (□, $r = 0,984$), Fe^{2+} -oxidační aktivita na buňku byla 650 amol/min . Z porovnání směrnice regresních přímek byl rozdíl mezi oxidačními aktivitami nevýznamný ($P > 0,05$).



Obr. 35. Oxidace S^0 klidovými buňkami *A. ferrooxidans* vyjádřená jako tvorba H^+ . (●) při $C_{crit} = 3,125 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ ($r = 0,996$) byla S^0 -oxidační aktivita na buňku $3,35 \text{ amol}/\text{min}$. (■) při $C = 187 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ ($r = 0,997$) byla S^0 -oxidační aktivita na buňku $3,55 \text{ amol}/\text{min}$. Z porovnání směrnic regresních přímků byl rozdíl mezi oxidačními aktivitami nevýznamný ($P > 0,05$).

Pro oxidaci Fe^{2+} je možné srovnat stanovenou hodnotu C_{crit} s kritickou rychlostí transferu kyslíku. Savič a kol. [1998] a Veljkovič a kol. [1999] uvádějí, že maximální rychlostní konstanta pro oxidaci Fe^{2+} nebyla ovlivněna rychlostí transferu kyslíku vyšší než zhruba $1 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Rychlost transferu kyslíku odpovídá dC/dt v rovnici (19) bez Q , tedy aeraci bez bakteriální respirace. Dosazením našich hodnot $(k_{LA})_{crit} = 0,1283 \text{ min}^{-1}$, $C_{crit} = 0,2 \text{ mg}/\text{l}$ a $C^* = 8 \text{ mg}/\text{l}$ do rovnice (19) získáme rychlost transferu kyslíku rovnou $1,001 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, což je ve velmi dobré shodě s dříve publikovanými výsledky a nepřímo potvrzuje námi určené hodnoty $(k_{LA})_{crit}$ a C_{crit} . Pro oxidaci elementární síry nejsou v literatuře dostupná data kritických hodnot a tedy podobné srovnání není možné.

4.3. Transkriptomická analýza vybraných genů během anaerobní oxidace síry u bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*

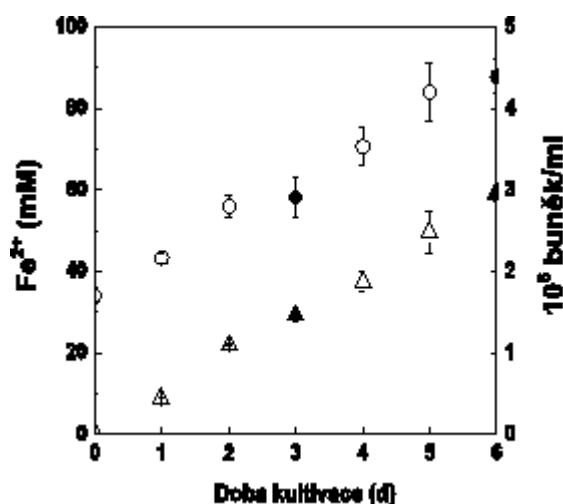
Anaerobní reakce zapojené v biogeochemickém cyklu železa a síry hrály významnou roli při vzniku Země, a studium anaerobní činnosti extremofilů oxidujících železo a síru tak může poskytnout cenné informace o prvotních mikrobiálních procesech. Bakteriální procesy odehrávající se v anaerobním nebo na kyslík chudém prostředí jsou také nedílnou součástí bioloužení sulfidických minerálů, kdy přítomná elementární síra je oxidována Fe^{3+} na kyselinu sírovou. Biochemické studie anaerobního procesu však pocházejí z mnohem mladší doby oproti studiím aerobním a mechanismus procesu je právě v této době předmětem výzkumů.

Vedle studia stechiometrie anaerobní oxidace síry [Kucera a kol. 2012b] se v našem kolektivu proces studoval nejdříve na úrovni změn proteomu klidových buněk [Kucera a kol. 2012a] a poté se přešlo k transkriptomické analýze za podmínek růstu [Kucera a kol. 2016]. Následující kapitola vychází z transkriptomické kvantifikace klíčových respiračních genů pravděpodobně zapojených v anaerobní oxidaci elementární síry spojené s disimilační redukcí Fe^{3+} , neboť mechanismus stále není plně popsán a jeho složky se u jednotlivých kmenů, příp. za různých podmínek, překvapivě liší. Genová exprese byla sledována během celého růstového cyklu.

4.3.1. Kinetické parametry anaerobní kultury *A. ferrooxidans*

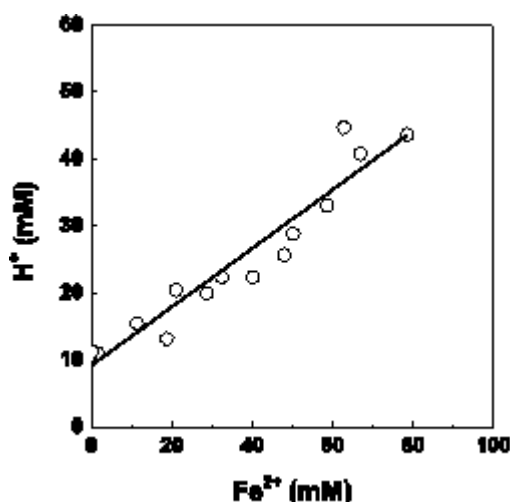
Pro optimalizaci anaerobních růstových podmínek bylo testováno dávkování oxidu uhličitého do bioreaktoru z důvodu zabezpečení růstu nelimitovaného oxidem uhličitým. Dávka 1,5 l zajistila nelimitovaný růst vždy na dobu 48 h (obr. 36), po které došlo následně k limitaci růstu. V důsledku dalších dávek CO_2 po 72 h od předešlé dávky se rychlost růstu obnovila na původní hodnotu před limitací CO_2 . Na rychlost redukce Fe^{3+} nebyly tyto změny měřitelné (obr. 36), zřejmě proto, jak plyne i z pozorování, že i nerostoucí biomasa si zachovává původní metabolickou aktivitu. Tedy dostatečná dávka pro nelimitovaný růst bakteriální kultury za daných experimentálních podmínek byla 0,75 l CO_2 denně, což odpovídalo $5,59 \pm 0,65$ nl CO_2 na buňku (průměr \pm s).

Dále byla testována inhibiční dávka oxidu uhličitého. Inhibice růstu a redukce Fe^{3+} nebylo dosaženo ani při nejvyšší testované dodávce – 10 dávek 3 l CO_2 během 24 h. Proto pro další experimenty byla zvolena dávka 1,5 l každých 24 h (aplikováno v průběhu 15 minut průtokem 1 l směsi Ar/ CO_2 za min).



Obr. 36. Vliv dávek CO_2 na anaerobní kulturu *A. ferrooxidans* oxidující elementární síru ve spojení s disimilační redukcí Fe^{3+} . Jako inokulum byly použity buňky oxidující železo. (○) Koncentrace buněk. (Δ) Koncentrace Fe^{2+} vznikajícího redukcí Fe^{3+} . 3. a 6. den (●) dochází postupně k zastavení růstu, zde patrný pouze počátek limitace CO_2 , čemuž bylo dále zabráněno dodávkou 1,5 l CO_2 .

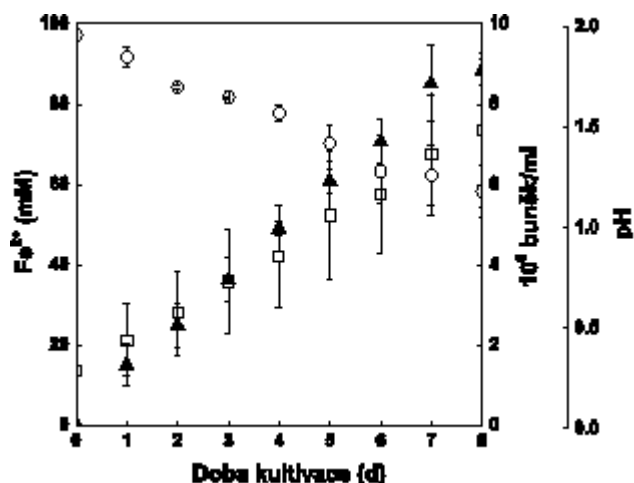
K ověření nedávno publikované stechiometrie anaerobní oxidace S^0 trojmocným železem u klidových anaerobních buněk [Kucera a kol. 2012b] byl u rostoucí anaerobní kultury zjišťován poměr mezi koncentracemi H^+ a Fe^{2+} . Podle stechiometrie modelové reakce Kucery a kol. [2012b] by poměr mezi změnami koncentrací H^+ a Fe^{2+} měl být 0,444. Experimentálně zjištěná směrnice (obr. 37) odpovídající poměru H^+/Fe^{2+} byla $0,438 \pm 0,036$ (průměr \pm s). Rozdíl mezi experimentálním a modelovým poměrem byl nevýznamný ($P > 0,05$). Fakt, že stechiometrie anaerobní oxidace síry za růstových podmínek odpovídá stechiometrii pro klidové buňky, potvrzuje stejný reakční mechanismus.



Obr. 37. Vztah mezi koncentracemi H^+ and Fe^{2+} během anaerobní oxidace elementární síry spojené s disimilační redukcí Fe^{3+} v rostoucí kultuře *A. ferrooxidans* (viz obr. 38). Poměr H^+/Fe^{2+} je dán směrnici $0,438 \pm 0,036$ ($r = 0,960$). Regresní přímka je výsledkem dvou nezávislých anaerobních kultur.

4.3.2. Analýza hladiny transkripce vybraných genů u bakterie *A. ferrooxidans* za anaerobních podmínek

Metoda real-time PCR byla použita ke sledování profilů exprese genů energetického metabolismu u anaerobních kultur *A. ferrooxidans* oxidujících elementární síru ve spojení s disimilační redukcí Fe^{3+} (obr. 38, 39) a kultur, které ztratily schopnost anaerobně redukovat Fe^{3+} (obr. 40). Získané profily ukázaly, že se hladiny transkripce genů mohou v průběhu procesu výrazně lišit, a tím mít za následek rozdíly mezi end-point transkriptomickou a proteomickou studií.



Obr. 38. Kinetika kultury *A. ferrooxidans* anaerobně oxidující elementární síru ve spojení s redukcí Fe^{3+} , která byla použita k analýze transkripčních profilů genů energetického metabolismu. Jako inokulum byla použita kultura vyrostlá na Fe^{2+} , počáteční hustota 10^8 buněk/ml. (□) Koncentrace buněk, (▲) tvorba Fe^{2+} , (○) pH.

Hladiny exprese genů spojených s metabolismem železa (zastoupených operony *res*, *petI* a *rus*) byly obecně během anaerobních růstových podmínek stejné anebo vyšší ve srovnání s aerobní oxidací Fe^{2+} . Expresse několika genů sirného metabolismu byla zvýšená na začátku anaerobního růstu, ale v průběhu procesu klesla na basální hladinu nebo byla potlačena. Geny *petII* operonu zapojené do transportu elektronů během aerobní sirné respirace vykazovaly stejný expresní profil za anaerobních podmínek jako geny operonu *petI* (obr. 39). Nicméně geny operonu *petI* byly transkribovány silněji než *petII* (tab. 3).

Tab. 3. Poměr transkripce genů operonů *petI* a *petII* (*petI* ku *petII*) během anaerobního růstu *A. ferrooxidans* anaerobně oxidující S^0 ve spojení s redukcí Fe^{3+} .

Gen	Kultivace (dny)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>petA</i>	1,05	1,10	1,26	1,32	1,13	1,01	1,03	1,13	1,13	
<i>petB</i>	0,84	1,26	0,76	0,96	0,95	0,94	0,92	1,52	0,89	
<i>petC</i>	1,00	1,35	0,95	1,17	1,26	1,35	1,20	1,38	1,34	
<i>sdrA</i>	1,19	1,94	1,16	1,14	1,52	0,78	1,45	1,28	1,58	
<i>cycA</i>	1,09	1,32	0,95	1,46	1,16	1,46	1,42	1,41	1,31	

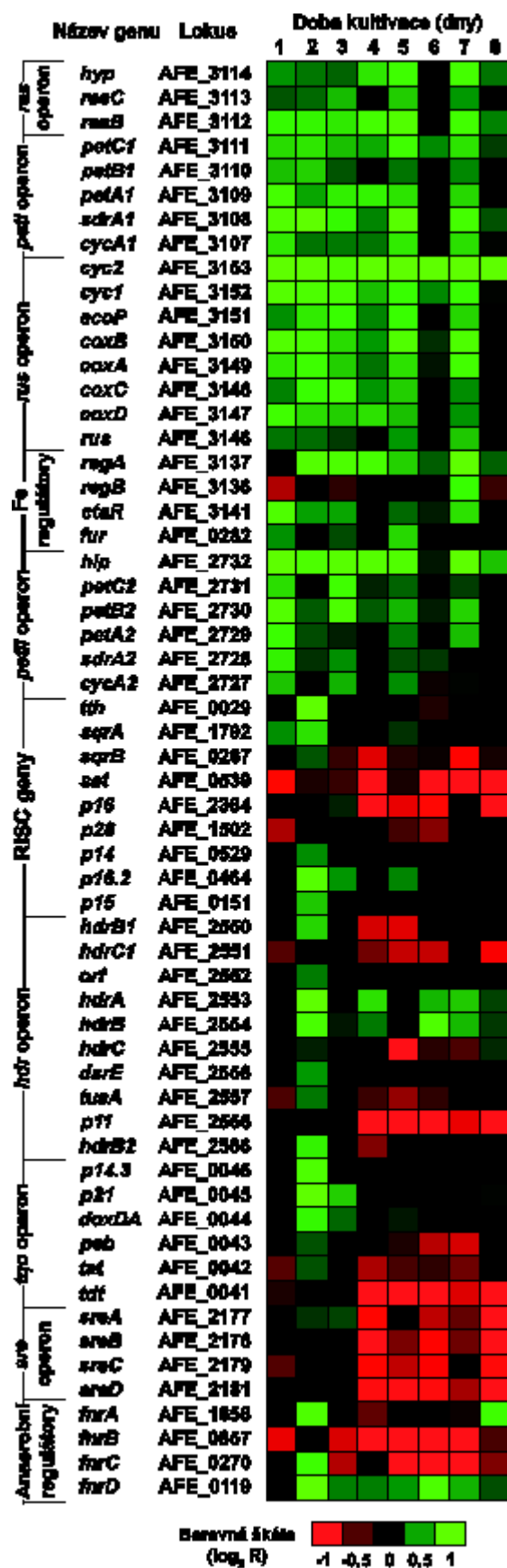
Pozn: Uvedené hodnoty jsou založeny na poměru normalizovaných C_T hodnot použitím normalizačních faktorů zjištěných pro kultury použité k získání profilů transkripce na obr. 40.

Abychom ověřili roli některých genů v anaerobní respirační dráze, sledovali jsme jejich hladinu transkripce v buňkách, které ztratily schopnost anaerobně redukovat Fe^{3+} a srovnali ji s hladinou transkripce v buňkách redukujícími Fe^{3+} (obr. 40). Ztráta schopnosti redukovat Fe^{3+} byla pozorována během anaerobní inkubace klidových buněk z první aerobní pasáže

oxidující síru, která byla získána adaptací kultury oxidující železo na síru. V této kultuře byla významně potlačena transkripce genů *cyc2*, *cyc1*, *petA1*, *cycA1* a *cycA2*.

Anaerobní respirační dráha – sirný metabolismus

V naší studii byla během anaerobní oxidace síry významně zvýšená exprese dvou genů *hdr* operonu v buňkách vyrostlých na Fe^{2+} (obr. 39) – *hdrA* (kódující podjednotku A heterodisulfidreduktasy) a *hdrB* (kódující podjednotku B heterodisulfidreduktasy). Toto zjištění je v rozporu s dříve publikovanými výsledky, kdy se hladina HdrA proteinu za anaerobních podmínek snižovala u klidových i rostoucích anaerobních kultur [Kucera a kol. 2012a; Osorio a kol. 2013], což však mohlo být důsledkem end-point analýzy v pozdní fázi sirné oxidace. V této fázi nebyl významný transkripční nárůst detegován ani v naší studii (obr. 39). Dalším faktorem, který mohl přispět k výše popsanému sníženému výskytu proteinů metabolismu RISCs u anaerobních kultur, mohlo být srovnání s aerobní sirnou kulturou, u které lze očekávat, že v přítomnosti energeticky výhodnějšího kyslíku jako elektronového akceptoru, namísto Fe^{3+} v případě anaerobiózy, bude vykazovat mnohem silnější respirační aktivitu. Zvýšená exprese *hdrA* a *hdrB* během anaerobní oxidace síry v buňkách vyrostlých na Fe^{2+} během anaerobní oxidace síry podporuje hypotézu, že se Hdr podílí na metabolismu RISCs, neboť většina genů metabolismu RISCs není v buňkách vyrostlých na Fe^{2+} exprimována. Vystává však otázka, zda je reverzně fungující enzymový komplex, který u anaerobů zajišťuje dvouelektronovou redukci, schopný katalyzovat přenos 4 elektronů z S^0 na SO_3^{2-} .



Obr. 39. Transkripční profily genů energetického metabolismu kultury *A. ferrooxidans* anaerobně oxidující elementární síru ve spojení s redukcí Fe³⁺ (obr. 38).

Transkripční profily získané v této studii silně podporují zapojení Hdr v anaerobní oxidaci S^0 . V kontrastu s výsledky Osoria a kol. [2013] nebyla pozorována významná indukce transkripce *dsrE* a *tusA* v žádné z fází anaerobního růstu (obr. 39). Jejich profily exprese naznačují funkci spíše v transportu asociovaném s oxidací elementární síry zprostředkovanou Hdr, což by odpovídalo i jejich lokalizaci v rámci *hdr* operonu. Exprese genu *p11*, kódující rhodanasu P11, a dalších genů (*hdrB1* a *hdrC1*) v rámci *hdr* operonu byla postupně snížena od třetího dne anaerobního růstu (obr. 39) a tedy s největší pravděpodobností nejsou zahrnuty v oxidaci S^0 nebo transportu za anaerobních podmínek.

Transkripce ATP sulfurylasy (Sat), která je kódovaná genem *sat* a katalyzuje tvorbu SO_4^{2-} a ATP z APS a pyrofosforečnanu [Quatrini a kol. 2009], byla výrazně snížena (obr. 39). Funkce Sat během anaerobního růstu nemusí být klíčová. Snížení exprese některých genů zapojených v metabolismu RISCs v pozdních fázích anaerobního růstu může být způsobeno nárůstem koncentrace vznikajícího Fe^{2+} . Za potlačení exprese genů RISCs metabolismu při nízkém redoxním potenciálu, tj. s narůstající koncentrací Fe^{2+} , může být zodpovědná indukce genu *regA* [Ponce a kol. 2012].

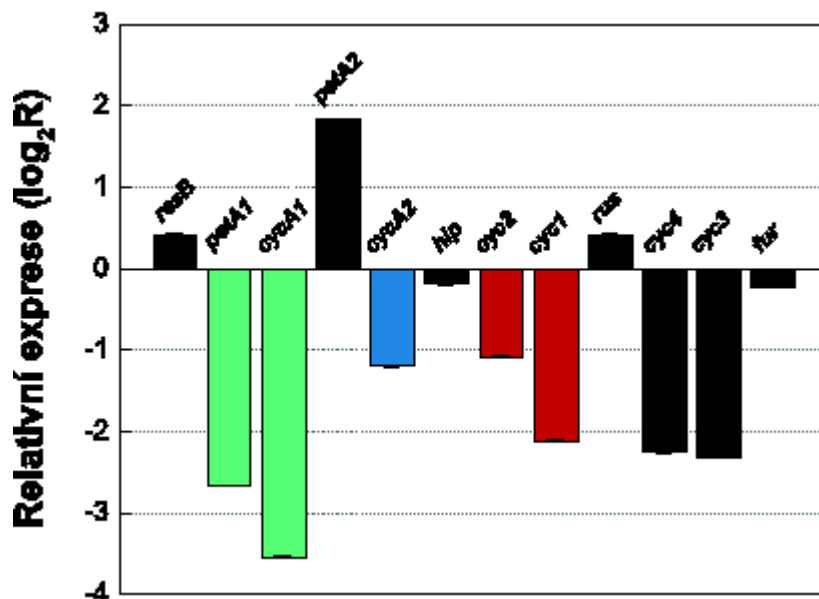
Po dvou dnech anaerobního růstu byla pozorována také zvýšená hladina transkriptu u genů *p14.3*, *p21* a *tth* (obr. 39). Rhodanasa P21, neboli thiosíransulfurtransferasa, byla mnohem více abundantní v kulturách na různých RISCs a sulfidech kovů než na Fe^{2+} [Ramirez a kol. 2002]. Geny *p21* a *p14.3* jsou součástí operonu *tqo*, který kóduje Tqo komplex [Quatrini a kol. 2009]. V naší studii jsme nedetegovali nárůst v expresi *tat* transkriptu, který kóduje protein s thiosírandehydrogenasovou aktivitou [Kikumoto a kol. 2013] a hojně se vyskytuje v anaerobních buňkách [Osorio a kol. 2013]. Exprese dalšího genu *tdt*, jež je součástí *tqo* operonu, byla od poloviny růstu snížena (obr. 39). Neboť syntéza Tat proteinu (*tat*) kódovaného *tqo* operonem byla snížena v buňkách neschopných redukovat Fe^{2+} v anaerobních podmínkách, a další dva proteiny kódované geny *p21* a *psb* (také součástí *tqo* operonu) nebyly v těchto buňkách nalezeny vůbec [Kucera et al. 2015], Tqo pravděpodobně přispívá k metabolismu RISCs za anaerobních podmínek.

Exprese *sre* operonu, který kóduje domnělou sulfurreduktasu, byla během anaerobního růstu významně snížena (obr. 39). Jeho expresní profil naznačuje, že na rozdíl od buněk oxidujících síru za anaerobních podmínek [Osorio a kol. 2013], v buňkách oxidujících železo nedochází k významné syntéze tohoto enzymu a proto asi ani k předpokládané disproporcionaci síry na H_2S a SO_4^{2-} . Mechanismus tvorby H_2S z S^0 vyžaduje další zkoumání [Osorio a kol. 2013; Laska a kol. 2003; Guiral a kol. 2005; Valdes a kol. 2008a]. Kvalitativní test přítomnosti H_2S založený na přidávku octanu olovnatého byl negativní. Maximální koncentrace rozpustných sulfidů v monitorovaných kulturách byla pod mezí detekce ($7,1 \mu M$) a tedy nulová nebo zanedbatelná. Naše výsledky nepotvrzují model anaerobní oxidace síry zahrnující disproporcionaci síry [Osorio a kol. 2013], jsou více v souladu s dřívějšími pozorováními [Pronk a kol. 1991a; Corbett a Ingledew 1987]. Mechanismus tvorby H_2S z S^0 vyžaduje další zkoumání [Osorio a kol. 2013; Laska a kol. 2003; Guiral a kol. 2005; Valdes a kol. 2008a]. Neboť redukce S^0 za anaerobních podmínek nemůže být zatím zcela vyloučena, předpokládáme, že v nepřítomnosti H_2 coby donoru elektronů se jedná o minoritní proces.

Navrhované mechanismy [Kucera a kol. 2012a; Osorio a kol. 2013] mohou odrážet variabilitu v rámci druhů, oba však zahrnují oxidaci S^0 zprostředkovanou Hdr a transfer elektronů na chinonový pool na vnitřní membráně, a dále složkami respiračního řetězce železa. Tqo přispívá k dodávání elektronů do chinonového poolu.

Anaerobní respirační dráha – disimilační redukce Fe^{2+}

Byla provedena komparativní analýza genomů mezofilních acidofilů [Valdes a kol. 2008b] a výsledky naznačují, že pouze druhy oxidující železo a síru obsahující operony *rus*, *petI* a *petII* jsou schopny anaerobní redukce Fe^{2+} s S^0 coby donorem elektronů. Yarzabal a kol. [2004] zjistil, že *rus* operon je silně exprimován při aerobní oxidaci Fe^{2+} , a slabě při aerobní oxidaci S^0 . Exprese jednoho z genů kódovaných tímto operonem, *cyc2*, byla v naší studii zvýšena během všech fází anaerobního růstu (obr. 39), což je zajímavé, neboť *cyc2* kóduje cytochrom Cyc2, který je počáteční akceptor elektronů při oxidaci Fe^{2+} . Exprese *cyc1*, který je také součástí *rus* operonu, byla zvýšená v prvních třech dnech anaerobního růstu. Pravděpodobně v důsledku kotranskripce celého *rus* operonu byly mírně indukovány i geny *coxBAC*, kódující terminální cytochrom *aa3* oxidasu (obr. 39). V buňkách neschopných anaerobní redukce byla exprese genů *cyc1* a *cyc2* významně snížena na úrovni transkripce (obr. 40), a Cyc2 a Rus také na proteinové úrovni [Kucera a kol. 2015].



Obr. 40. Exprese vybraných respiračních a regulačních genů v sírných buňkách *A. ferrooxidans* neschopných anaerobně redukovat Fe^{3+} , které byly získány aerobním pasážováním buněk rostlých na Fe^{2+} na S^0 . Všechny hladiny exprese jsou uvedeny v tab. 4. Geny kódované stejným operonem, které měly významnou změnu v expresi ($P < 0.05$), jsou zobrazeny stejnou barvou jako na obr. 41. Černě jsou zobrazeny geny s nevýznamnou změnou exprese ($P > 0.05$). Chybové úsečky představují průměr $\pm s$ ($n = 2$).

Byla navržena hypotéza, v níž by mohl funkci terminální Fe^{3+} reduktasy zastávat cytochrom Cyc2 lokalizovaný na vnější membráně a fungující v reverzním módu. Elektrony potřebné k redukci jsou pravděpodobně dodávány peiplasmatickým Rus. Zvýšené hladiny proteinů Rus a Cyc1 byly dříve pozorovány v klidových anaerobních buňkách [Kucera a kol. 2012a], a Rus byl také detegován během anaerobní redukce Fe^{3+} s H_2 coby donorem elektronů [Ohmura a kol. 2002]. Jelikož je rusticyanin přítomen ve velkém množství (až 4 % celkového proteinu v buňce), jeho zvýšená exprese pravděpodobně není nutná pro zachování funkce transportu elektronů za anaerobních podmínek (obr. 39). Nicméně i přesto bylo pozorováno jeho zvýšení na proteinové úrovni v buňkách oxidujících anaerobně síru [Kucera a kol. 2012a] ve srovnání s buňkami oxidujícími síru aerobně. Ty vykazovaly pouze přechodnou expresi operonu *rus* během časně exponenciální fáze růstu [Yarzabal a kol. 2004]. Dříve byla popsána přímá interakce mezi Rus a Cyc2, nikoliv však mezi Cyc2 a Cyc1 nebo Cyc2 a CycA1 [Castelle a kol. 2008]. To by mohlo vysvětlit potřebu Rus v anaerobní elektrontransportní dráze. Účast Cyc1 je stále nejasná, neboť zvýšená transkripční a proteinová hladina za anaerobních podmínek by mohla být dána kotranskripcí *rus* operonu anebo menší rovnováhou mezi syntézou a degradací proteinů respirace železa. Role Cyc2 a Rus v anaerobní respirační dráze jsou na druhou stranu podpořeny současnými výsledky a nedávnou studií popisující ztrátu schopnosti redukce Fe^{3+} [Kucera a kol. 2015].

Tab. 4. Expresse vybraných respiračních a regulačních genů v sirných buňkách *A. ferrooxidans* neschopných anaerobní redukce Fe^{3+} . Zdrojová data jsou uvedena v obr. 40.

Gen	lokus	poměr log2	± s	P-hodnota
<i>resB</i>	AFE_3112	0,42	0,01	6,39E-01
<i>petA1</i>	AFE_3109	-2,67	0,01	2,09E-06
<i>cycA1</i>	AFE_3107	-3,54	0,01	1,54E-04
<i>petA2</i>	AFE_2729	1,84	0,01	7,55E-02
<i>cycA2</i>	AFE_2727	-1,19	0,01	3,61E-05
<i>hip</i>	AFE_2732	-0,18	0,01	5,01E-01
<i>cyc2</i>	AFE_3153	-1,08	0,02	2,51E-03
<i>cyc1</i>	AFE_3152	-2,11	0,01	1,85E-02
<i>rus</i>	AFE_3146	0,42	0,01	6,10E-01
<i>cyc4</i>	AFE_1428	-2,26	0,01	2,61E-01
<i>cyc3</i>	AFE_1429	-2,31	0,01	1,28E-01
<i>fur</i>	AFE_0282	-0,22	0,02	5,40E-01

Ze získaných transkripčních profilů vyplývá, že v anaerobních podmínkách jsou přítomny oba cytochrom *bc₁* komplexy (obr. 39). Během anaerobní oxidace síry s Fe^{3+} bylo pozorováno snížení hladiny proteinu SdrA2 v klidových buňkách vyrostlých na Fe^{2+} [Kucera a kol. 2012a] a nárůst v transkripci *peA2*, *petB2* a *cycA2* v sirných buňkách [Osorio a kol. 2013]. SdrA2, podobně jako SdrA1, by mohl podporovat transport elektronů z chinonového poolu na NADH komplex [Quatrini a kol. 2009]. V naší studii bylo během anaerobního růstu pozorováno

významné zvýšení exprese *petA1*, *petC1*, *sdrA1*, *petC2*, *petB2* and *hip* (obr. 39). V souladu s dřívějším pozorováním na buňkách oxidujících železo v aerobních podmínkách [Bruscella a kol. 2007], operon *petI* byl za anaerobních podmínek exprimován mnohem silněji než *petIII* (tab. 3). Expresе genů *petA1* kódující Rieskeho protein cytochrom bc_1 komplexu I, a genů *cycA1* a *cycA2* kódující cytochromy c_4 byla potlačena v buňkách neschopných anaerobní redukce Fe^{3+} (obr. 40). Zdá se tedy, že role cytochrom bc_1 komplexu I v anaerobní elektrontransportní dráze je daleko významnější než role cytochrom bc_1 komplexem II v buňkách vyrostlých na Fe^{2+} . V anaerobní dráze navíc cytochrom bc_1 komplex I funguje v přímém, energeticky výhodném směru. Translokací H^+ z cytoplasmy do periplasmy dochází k tvorbě protonmotivní síly.

Během anaerobního růstu byly indukovány geny *resB* a *hyp* (obr. 39). Operon *res*, lokalizovaný vedle *petI* operonu, kóduje proteiny zapojené v maturaci produktů operonu *petI* [Cabrejos a kol. 1999; Levican a kol. 2002]. Zvýšená transkripce těchto genů podporuje zapojení *petI* operonu v anaerobní respiraci Fe^{3+} . Předpokládáme tedy, že cytochrom bc_1 komplex I je součástí hlavní anaerobní elektrontransportní dráhy, přijímá elektrony z oxidace S^0 a přenáší je přes chinonový pool ve vnitřní membráně a na cytochrom c_4 .

Jeden ze dvou možných respiračních cytochromů c_4 , Cyc1, interaguje s Rus a AcoP, a také se váže k terminální oxidase [Malarte a kol. 2005]. Zatím nebyla prokázána interakce mezi Cyc1 a cytochrom bc_1 komplexem I, Cyc1 se tedy pravděpodobně neúčastní transportu elektronů z cytochrom bc_1 komplexu I na Rus. Na druhou stranu CycA1 interaguje s Rus a je jím redukován [Malarte a kol. 2005]. Neboť jsou CycA1 i cytochrom bc_1 komplex I kódovány společným operonem *petI*, předpokládá se, že spolu interagují, přestože to zatím nebylo prokázáno. Z genové exprese v buňkách neschopných redukovat Fe^{3+} usuzujeme, že elektrony z oxidace S^0 , doručené na cytochrom bc_1 komplex I skrze chinonový pool, jsou dále transportovány na Rus pomocí cytochromu CycA1. Rusticyanin pak dále přenáší elektrony na terminální cytochrom Cyc2, který je zakotven do vnější membrány a katalyzuje redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} z vnější strany membrány.

Naše výsledky nevylučují účast cytochrom bc_1 komplexu II v alternativní respirační dráze, jak bylo navrženo dříve [Osorio a kol. 2013; Bruscella a kol. 2007]. Transport elektronů z cytochrom bc_1 komplexu II na terminální Fe^{3+} reduktasu by mohl být zprostředkován díky dvěma proteinům kódovaným *petIII* operonem – periplasmatický Hip, jehož exprese však byla zvýšená významně až na konci kultivace (obr. 39), nebo CycA2, jehož exprese byla potlačena v buňkách neredukujících Fe^{3+} (obr. 40). Hip navíc obsahuje [4Fe-4S] klastr, který je citlivý na O_2 , a má vlastnosti vhodné pro účast na anaerobním transportu elektronů.

Otázkou zůstává, jestli by v tomto případě byl cytochrom Cyc2 terminální Fe^{3+} reduktasou jako v případě hlavní dráhy. Jako alternativní Fe^{3+} reduktasa by mohl sloužit cytochrom c (*cyc4*; AFE_1428) kódovaný paralogním genem k *cyc2*. Bioinformatické analýzy naznačují, že geny kódující cytochrom bc_1 komplex jsou funkčními partnery genu *cyc3* (AFE_1429), paralogního genu k *cyc1*, který leží na genomové sekvenci hned vedle *cyc4* a kóduje cytochrom c_{552} . Ačkoliv během anaerobního růstu (obr. 39) nebyly pozorovány významné změny v expresi žádného z těchto paralogních genů, mohly by hrát roli v alternativním mechanismu redukce Fe^{3+} , jelikož byla u obou těchto genů potlačena exprese v buňkách

neschopných redukovat Fe^{3+} (obr. 40), nicméně statisticky nevýznamně ($P > 0.05$). K potvrzení této hypotézy je třeba další výzkum.

Regulace anaerobní respirační dráhy

V genomu *A. ferrooxidans* byly nalezeny čtyři potenciální geny kódující složky jednodílného regulátoru Fnr, který je nezbytný pro přechod z aerobního na anaerobní metabolismus [Lefimil a kol. 2009; Osorio a kol. 2009]. Transkripce genů *fnrACD* byla zvýšená po dvou dnech anaerobního růstu (obr. 39), což naznačuje, že by mohly být zapojeny do regulace přechodu na anaerobiosu. Na druhou stranu zapojení genu *fnrB* do této regulace nebylo v důsledku jeho trvale sníženého transkriptu (obr. 39) během anaerobního růstu podpořeno. U fakultativních anaerobů je v nepřítomnosti O_2 exprese genů zapojených v anaerobní respirační dráze řízena reversibilní aktivací Fnr [Unden a kol. 1995]. Navíc Fnr potlačuje expresi některých genů aerobní respirační dráhy [Unden a kol. 1991]. V aktivaci genů anaerobní respirační dráhy z S^0 na Fe^{3+} u *A. ferrooxidans* nemusí hrát Fnr zásadní roli, protože většina těchto genů se také účastní aerobní dráhy, a tedy by mohl působit i značně kontraproduktivně. Transkripční hladina *regA*, části dvoukomponentního regulačního systému RegBA, vzrostla na začátku anaerobní kultivace, kdy bylo přítomno pouze malé množství Fe^{2+} , a na konci kultivace, kdy téměř veškeré Fe^{3+} bylo zredukováno (obr. 39). Exprese *regA* odráží změny redoxního potenciálu a tím i koncentraci železa [Kucera a kol. 2013]. Systém pozitivně reguluje expresi *rus* operonu [Ponce a kol. 2012] a může tedy zvýšit indukcii respiračních genů, jakmile vzroste koncentrace Fe^{2+} .

Anaerobní sírná respirace by mohla být jedním z nejstarších mikrobiálních mechanismů konzervace energie [Schauder a Kröger 1993]. Je možné, že anaerobní sírný respirační systém byl ten, ze kterého se u *A. ferrooxidans* vyvinul aerobní. Schopnost fakultativně využívat energii za anaerobních podmínek mohla být zachována, protože se bakterie často vyskytuje v podmínkách s limitovaným kyslíkem.

5. Závěr

Při studiu metabolismu bakterie *A. ferrooxidans*, uplatňující se v prostředí sulfidových minerálů (odpady po těžbě kovů, důlní vody z aktivních i odstavených dolů) a biotechnologické těžbě kovů, vyplynuly následující závěry:

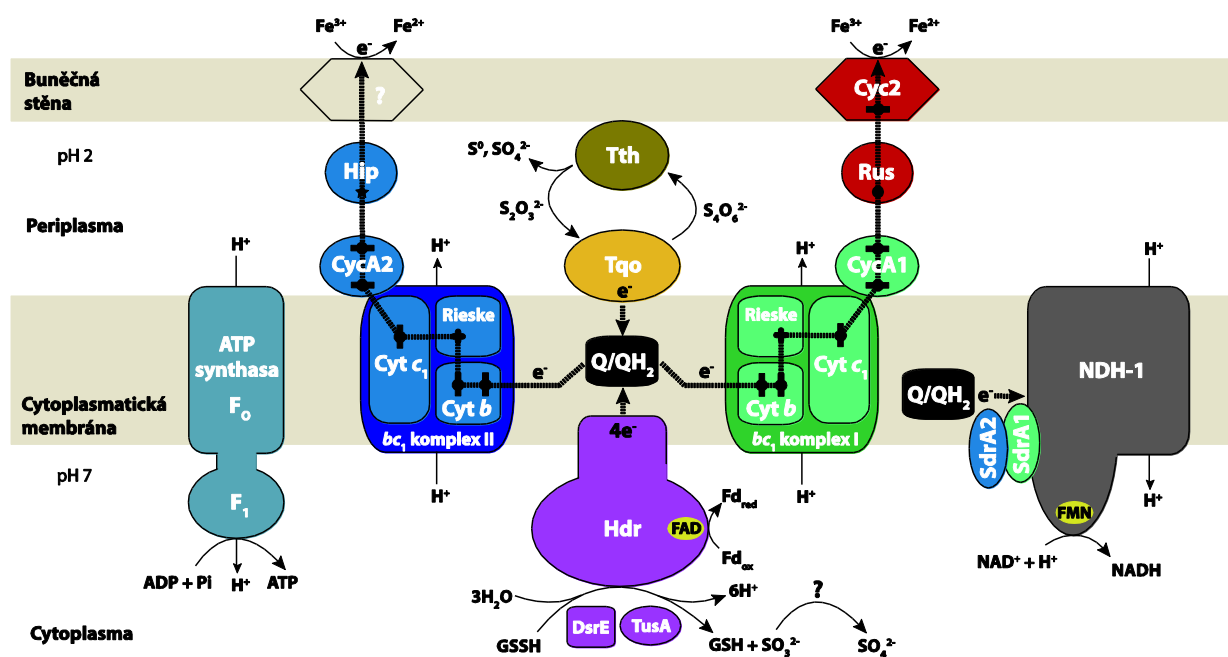
1. Maximální buněčný obsah ATP buněk oxidujících Fe^{2+} byl srovnatelný s hodnotami obecně uváděnými pro bakterie a asi třikrát vyšší než hodnota zjištěná pro bakterie oxidující síru. Nižší buněčný obsah ATP v sírných buňkách je nejpravděpodobněji způsoben kontinuální limitací síry danou její nízkou rozpustností ve vodě. Tato hypotéza, založená na dřívějších kinetických analýzách bioprocesu a současné analýze buněčného ATP, je v souladu s dalšími experimenty monitorujícími obsah ATP v buňkách vázaných na povrch síry, kde předpokládáme, že k sírné limitaci nedochází. Tím lze vysvětlit, proč hodnota buněčného ATP vázaných buněk byla shodná s hodnotou u buněk oxidujících Fe^{2+} . V případě kultury oxidující železo se bioluminiscenční metoda ukázala jako rychlý nástroj k monitorování růstu biomasy a oxidace substrátu. Intenzita bioluminiscence obecně korelovala s jednotlivými růstovými fázemi buněčných kultur, s výjimkou sírné kultury po zvýšení pH, jež v buňce vyúsťuje v odlišný metabolický mód. Proto bylo nutné definovat oblast použití bioluminiscenční metody k monitorování sírných kultur. Při znalosti podmínek použití umožňuje analýza ATP v kultuře i buňkách monitorování růstu biomasy i rychlosti oxidace substrátů pro potřeby studia fyziologie a biotechnologie těchto bakterií. Analýza celkového organického uhlíku umožnila rozlišit podíl buněk volných a vázaných na povrchu síry.

2. Intenzita aerace má mnohonásobné dopady na průběh kultur *A. ferrooxidans* i bioloužící procesy a úzce souvisí s podmínkami tvorby ATP a metabolizací substrátů. Pomocí parametrů $(k_{LA})_{\text{crit}}$ a C_{crit} jsme určili podmínky charakterizující minimální aeraci kultur *A. ferrooxidans* oxidujících Fe^{2+} a S^0 , jež zamezí limitaci kyslíkem. Hodnoty C_{crit} byly nezávisle ověřeny na buněčné suspenzi v bioreaktoru. Zjištěná data mohou být použita jako platné údaje pro stanovení minimální aerace ve zkušebním i komerčním rozsahu v bioreaktorech využívaných v biohydrometalurgii.

3. Rychlá adaptace železitých buněk *A. ferrooxidans* na anaerobní oxidaci S^0 spojenou s disimilační redukcí Fe^{3+} způsobila indukci genů aktivních v metabolismu železa a síry a s nimi spojených regulačních procesů. Expresе žádného z genů kódujících složky systému oxidace železa nebyla během anaerobního růstu snížena, exprese některých z nich byla naopak zvýšená. Relativně nízká indukce těchto genů může znamenat, že buňky využívají komponenty již přítomné a nasyntetizované během aerobní oxidace Fe^{2+} . Několik genů sírného metabolismu, které byly anaerobně indukovány, hrají pravděpodobně roli jak v aerobní tak anaerobní oxidaci síry. Většina genů sírného metabolismu však byla exprimována na basální úrovni pozorované v železitých buňkách. Z toho vyplývá, že enzymy sírného metabolismu jsou pravděpodobně dočasně syntetizovány i v železitých buňkách,

nicméně v mnohem menším měřítku než v sirných buňkách. To by také vysvětlovalo dřívější poznatky o rychlé adaptaci železitých buněk na oxidaci S^0 a 4-7denní lag fázi při adaptaci sirných buněk na Fe^{2+} .

Na základě našich výsledků a výsledků předešlých studií navrhuje možný mechanismus anaerobní oxidace S^0 spojené s redukcí Fe^{3+} u *A. ferrooxidans* (obr. 41).



Obr. 41. Model anaerobní oxidace S^0 spojené s disimilační redukcí Fe^{3+} u *A. ferrooxidans*. Elektrontransportní dráha čerpá z výsledků získaných během zde popsané studie a studií publikovaných dříve [Pronk a kol. 1991a, 1992; Das a kol. 1992; Corbett a Indledew 1987; Kucera a kol. 2012a, 2015; Ohmura a kol. 2002; Osorio a kol. 2013]. Elektrony z oxidace S^0 , která je katalyzována heterodisulfidreduktasou (Hdr), a RISCs, zprostředkovaných tetrathionanhydrolasou (Tth) a thiosíran:chinonoxidoreduktasou (Tqo), jsou sbírány chinonovým poolem (Q/QH₂). Většinu předává cytochrom bc_1 komplex I (PetA1B1C1) na cytochrom c_4 (CycA1), který by mohl interagovat s rusticyaninem (Rus), a dále na cytochrom c (Cyc2), který vně buňky redukuje Fe^{3+} . Alternativně může cytochrom bc_1 komplex II (PetA2B2C2) předávat elektrony na cytochrom c_4 (CycA2), který by mohl interagovat s vysokopotenciálovým železo-sírným proteinem (Hip), až na zatím neznámou Fe^{3+} reduktasu na vnější membráně. Některé elektrony prochází chinonovým poolem na NADH komplex (NDH-1) a redukuje NAD^+ . ATP syntasa fosforyluje ADP za využití vznikající protonmotivní síly. Proteiny kódované stejným operonem jsou zobrazeny ve stejných barvách. Přerušované je zobrazen transport elektronů, plně transport H^+ . Černé body představují Cu centra, černé body v přímce hemy, křížky [2Fe–2S], hvězdy [4Fe–4S] [Kucera a kol. 2016].

6. Seznam použité literatury

- Acharya, C., Sukla, L., Misra, V.,** 2004. Review biodepyritisation of coal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 79, 1-12.
- Adair, F.,** 1966. Membrane-associated sulfur oxidation by autotroph *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal of Bacteriology* 92, 899-904.
- Ageeva, S., Kondrat'eva, T., Karavaiko, G.,** 2001. Phenotypic characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *Microbiology* 70, 186-194.
- Aguilar-Barajas, E., Diaz-Perez, C., Ramirez-Diaz, M., Riveros-Rosas, H., Cervantes, C.,** 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals* 24, 687-707.
- Aiking, H., Stijnman, A., Vangarden, C., Vanheerikhuizen, H., Vantriet, J.,** 1984. Inorganic-phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella-aerogenes* NCTC-418 growing in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 374-377.
- Alam, A., Kamruzzaman, M., Lee, S., Kim, Y., Jo, H., Kim, S., Park, S.,** 2012. Sensitive determination of adenosine disodium triphosphate in soil, milk, and pharmaceutical formulation by enoxacin-europium (III) fluorescence complex in solution. *Journal of Luminescence* 132, 789-794.
- Alvarez, S., and Jerez, C.,** 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5177-5182.
- Amaro, A., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., Jerez, C.,** 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein-synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 173, 910-915.
- Amouric, A., Appia-Ayme, C., Yarzabal, A., Bonnefoy, V.,** 2009. Regulation of the iron and sulfur oxidation pathways in the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biohydrometallurgy: a Meeting Point between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation* 71-73, 163-166.
- Andrews, S., Robinson, A., Rodriguez-Quinones, F.,** 2003. Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews* 27, 215-237.
- Apel, W.A., Dugan, P.R., Tuttle, J.H.,** 1980. Adenosin 5'-triphosphate formation in *Thiobacillus ferrooxidans* vesicles by H⁺ ion gradients comparable to those of environmental conditions. *Journal of Bacteriology* 142, 295-301.
- Appia-Ayme, C., Bengrine, A., Cavazza, C., Giudici-Orticoni, M., Bruschi, M., Chippaux, M., Bonnefoy, V.,** 1998. Characterization and expression of the co-transcribed *cyc1* and *cyc2* genes encoding the cytochrome *c*₄ (C₅₅₂) and a high-molecular-mass cytochrome *c* from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC33020. *Fems Microbiology Letters* 167, 171-177.
- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V.,** 1999. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa(3)-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4781-4787.
- Appia-Ayme, C., Quatrini, R., Denis, Y., Denizot, F., Silver, S., Roberto, F., Veloso, F., Valdes, J., Cardenas, J., Esparza, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Bonnefoy, V., Holmes, D.,** 2006. Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83, 273-280.

- Arredondo, R., Garcia, A., Jerez, C.,** 1994. Partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its adhesion to solids. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2846-2851.
- Atomi, H.,** 2002. Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94, 497-505.
- Badger, M., and Price, G.,** 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* 54, 609-622.
- Bailey, A.D., and Hansford, G.S.,** 1993. Factors affecting bio-oxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids: a review. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 1164-1174.
- Baker-Austin, and C., Dopson, M.,** 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* 15, 165-171.
- Balci, N., Shanks, W., Mayer, B., Mandernack, K.,** 2007. Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced by bacterial and abiotic oxidation of pyrite. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 71, 3796-3811.
- Barreto, M., Quatrini, R., Bueno, S., Arriagada, C., Valdes, J., Silver, S., Jedlicki, E., Holmes, D.,** 2003. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy* 71, 97-105.
- Beard, S., Paradela, A., Albar, J., Jerez, C.,** 2011. Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generates extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase. *Frontiers in Microbiology* 2, 79-89.
- Berg, I.,** 2011. Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO₂ Fixation Pathways. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1925-1936.
- Bernier, L., and Warren, L.A.,** 2007. Geochemical diversity in S processes mediated by culture-adapted and environmental-enrichments of *Acidithiobacillus* spp. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 5684-5697.
- Bertoldo, C., and Antranikian, G.,** 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 151-160.
- Bird, L., Bonnefoy, V., Newman, D.,** 2011. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends in Microbiology* 19, 330-340.
- Bobadilla Fazzini, R.A., Cortes, M.P., Padilla, L., Maturana, D., Budinich, M., Maass, A., Parada, P.,** 2013. Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 2242-2251.
- Bonnefoy, V., and Holmes, D.S.,** 2012. Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology* 14, 1597-1611.
- Boon, M., Meeder, T.A., Heijnen, J.J., Luyben, K.,** 1992. Influence of oxygen adsorption on the dynamic K_La measurement in 3-phase slurry reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 1097-1106.
- Boon, M., and Heijnen, J.J.,** 1998. Gas-liquid mass transfer phenomena in bio-oxidation experiments of sulphide minerals: A critical review of literature data. *Hydrometallurgy* 48, 187-204.
- Booth, I.,** 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews* 49, 359-378.
- Bouchal, P., Zdrahal, Z., Helanova, S., Janiczek, O., Hallberg, K.B., Mandl, M.,** 2006. Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics* 6, 4278-4285.

Brasseur, G., Bruscella, P., Bonnefoy, V., Lemesle-Meunier, D., 2002. The bc₁ complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction. Is there a second bc₁ complex? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1555, 37-43.

Brasseur, G., Levican, G., Bonnefoy, V., Holmes, D., Jedlicki, E., Lemesle-Meunier, D., 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc₁ complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1656, 114-126.

Braun, V., 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *Fems Microbiology Reviews* 16, 295-307.

Brierley, C., 1978. Bacterial leaching. *Crc Critical Reviews in Microbiology* 6, 207-262.

Brock, T., and Gustafson, J., 1976. Ferric iron reduction by sulfur-oxidizing and iron-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 567-571.

Brown, A., and Jurinak, J., 1989. Mechanism of pyrite oxidation in aqueous mixtures. *Journal of Environmental Quality* 18, 545-550.

Brown, L., Dennehy, M., Rawlings, D., 1994. The F₁ genes of the F₁F₀ ATP synthase from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* complement *Escherichia coli* F₁ *unc* mutants. *Fems Microbiology Letters* 122, 19-25.

Bruscella, P., Appia-Ayme, C., Levican, G., Ratouchniak, J., Jedlicki, E., Holmes, D., Bonnefoy, V., 2007. Differential expression of two bc₁ complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology-Sgm* 153, 102-110.

Bryan, C., Davis-Belmar, C., van Wyk, N., Fraser, M., Dew, D., Rautenbach, G., Harrison, S., 2012. The effect of CO₂ availability on the growth, iron oxidation and CO₂-fixation rates of pure cultures of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 1693-1703.

Butcher, B.G., Deane, S.M., Rawlings, D.E., 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1826-1833.

Cabrejos, M.E., Zhao, H.L., Guacucano, M., Bueno, S., Levican, G., Garcia, E., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 1999. IST1 insertional inactivation of the resB gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fems Microbiology Letters* 175, 223-229.

Campbell, A., 1986. Living light – chemiluminescence in the reasearch and clinical laboratory. *Trends in Biochemical Sciences* 11, 104-108.

Castelle, C., Guiral, M., Malarte, G., Ledgham, F., Leroy, G., Brugna, M., Giudici-Orticoni, M.T., 2008. A new iron-oxidizing/O₂-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 25803-25811.

Cavazza, C., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Bruschi, M., 1995. Biochemical and EPR characterization of a high-potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fems Microbiology Letters* 130, 193-199.

Ceskova, P., Mandl, M., Helanova, S., Kasparovska, J., 2002. Kinetic studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 78, 24-30.

- Chaudhuri, S., Lack, J., Coates, J.,** 2001. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2844-2848.
- Chen, H., Yang, B., Chen, X.,** 2009. Identification and characterization of four strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* isolated from different sites in China. *Microbiological Research* 164, 613-623.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A., Shabanowitz, J., Hunt, D., Jerez, C.,** 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 2239-2251.
- Cobley, J., and Cox, J.,** 1983. Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiological Reviews* 47, 579-595.
- Codd, G., and Kuenen, J.,** 1987. Physiology and biochemistry of autotrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 53, 3-14.
- Coolen, E., Arts, I., Swennen, E., Bast, A., Stuart, M., Dagnelie, P.,** 2008. Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 864, 43-51.
- Corbett, C., and Ingledew, W.,** 1987. Is Fe^{3+/2+} cycling an intermediate in sulfur oxidation by Fe²⁺-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fems Microbiology Letters* 41, 1-6.
- Cox, J., and Boxer, D.,** 1978. Purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Journal* 174, 497-502.
- Cox, J., Nicholls, D., Ingledew, W.,** 1979. Transmembrane electrical potential and transmembrane pH gradient in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemical Journal* 178, 195-200.
- Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N., Kornberg, A.,** 1994. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 6290-6295.
- Crosa, J.,** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 319-336.
- Crossman, L., Holden, M., Pain, A., Parkhill, J.,** 2004. Genome watch - Genomes beyond compare. *Nature Reviews Microbiology* 2, 616-617.
- Crundwell, F.K.,** 2000. Modeling, simulation, and optimization of bacterial leaching reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 71, 255-265.
- Crundwell, F.,** 2003. How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy* 71, 75-81.
- Das, A., Mishra, A.K., Roy, P.,** 1992. Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters* 97, 167-72.
- Devasia, P., Natarajan, K., Sathyanarayana, D., Rao, G.,** 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4051-4055.
- Devasia, P., Natarajan, K., Rao, G.,** 1996. Role of bacterial growth conditions and adhesion in the bioleaching of chalcopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Minerals and Metallurgical Processing* 13, 82-86.
- Devasia, P., and Natarajan, K.,** 2010. Adhesion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to mineral surfaces. *International Journal of Mineral Processing* 94, 135-139.
- Deveci, H., Akcil, A., Alp, I.,** 2003. Parameters for control and optimization of bioleaching of sulfide minerals. *Modeling, Control and Optimization in Ferrous and Nonferrous Industry*, 77-90.

- DiSpirito, A., Dugan, P., Tuovinen, O.,** 1983. Sorption of *Thiobacillus ferrooxidans* to particulate material. *Biotechnology and Bioengineering* 25, 1163-1168.
- Diviskova, E.,** 2006. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta MU, Brno.
- Diviskova, E.,** 2008. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta MU, Brno.
- Doerffel, K.,** 1966. *Statistik in der analytischen Chemie.* Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie.
- Dopson, M., Lindstrom, E., Hallberg, K.,** 2002. ATP generation during reduced inorganic sulfur compound oxidation by *Acidithiobacillus caldus* is exclusively due to electron transport phosphorylation. *Extremophiles* 6, 123-129.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P., Bond, P.,** 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology-Sgm* 149, 1959-1970.
- Dopson, M., and Johnson, D.,** 2012. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology* 14, 2620-2631.
- Doran, M.P.** *Bioprocess Engineering Principles.* Academic Press, London (1995).
- Drobner, E., Huber, H., Stetter, K.,** 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2922-2923.
- Dziurla, M.A., Achouak, W., Lam, B.T., Heulin, T., Berthelin, J.,** 1998. Enzyme-linked immunofiltration assay to estimate attachment of thiobacilli to pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2937-2942.
- Edwards, K., Hu, B., Hamers, R., Banfield, J.,** 2001. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *Fems Microbiology Ecology* 34, 197-206.
- Efremenko, E.N., Azizov, R.E., Makhlis, T.A., Abbasov, V.M., Varfolomeev, S.D.,** 2005. Determination of minimal concentrations of biocorrosion inhibitors by a bioluminescence method. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41, 377-381.
- Eisele, T., and Gabby, K.,** 2014. Review of reductive leaching of iron by anaerobic bacteria. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* 35, 75-105.
- Elbehti, A., Nitschke, W., Tron, P., Michel, C., Lemesle-Meunier, D.,** 1999. Redox components of cytochrome bc-type enzymes in acidophilic prokaryotes I. Characterization of the cytochrome bc₁-type complex of the acidophilic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16760-16765.
- Elbehti, A., Brasseur, G., Lemesle-Meunier, D.,** 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc₁ and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 182, 3602-3606.
- Escobar, B., and Godoy, I.,** 2002. Enumeration of *Acidithiobacillus ferrooxidans* adhered to agglomerated ores in bioleaching processes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, 875-879.
- Escobar, B., and Vargas, T.,** 2013. Anaerobic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on pyrite. *Advanced Materials Research* 825, 96-99.
- Esparza, M., Bowien, B., Holmes, D.S., Jedlicki, E.,** 2009. Gene organization and CO₂-responsive expression of four cbb operons in the biomining bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Advanced Materials Research* 71-73, 207-210.

- Esparza, M., Cardenas, J., Bowien, B., Jedlicki, E., Holmes, D.,** 2010. Genes and pathways for CO₂ fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Carbon fixation in *A. ferrooxidans*. *Bmc Microbiology* 10, 229-244.
- Espejo, R., and Romero, P.,** 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1907-1912.
- Fahey, R.C., and Newton, G.L.,** 1987. Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid-chromatography. *Methods in Enzymology* 143, 85-96.
- Farias, P., Castro, A., Wagener, A., Miguel, E.,** 2008. Adenine determination in the presence of copper in diluted alkaline electrolyte by adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode. *Electroanalysis* 20, 1445-1453.
- Fazzini, R.A.B., Corte, M.P., Padilla, L., Maturana, D., Budinich, M., Maass, A., Parada, P.,** 2013. Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 2242–2251.
- Ferguson, S., and Ingledeu, W.,** 2008. Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1777, 1471-1479.
- Forchhammer, K.,** 2004. Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *Fems Microbiology Reviews* 28, 319-333.
- Fowler, T., Holmes, P., Crundwell, F.,** 1999. Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2987-2993.
- Fowler, T., Holmes, P., Crundwell, F.,** 2001. On the kinetics and mechanism of the dissolution of pyrite in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 59, 257-270.
- Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A., Yamanaka, T.,** 1988. Fe(II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Fems Microbiology Letters* 50, 169-172.
- Gao, H., Xi, M., Xu, L., Sun, W.,** 2011. Sensitive determination of ATP using a carbon paste electrode modified with a carboxyl functionalized ionic liquid. *Microchimica Acta* 174, 115-122.
- Garcia, O., Bigham, J., Tuovinen, O.,** 1995. Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 578-584.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W.,** 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2743-2747.
- Giudici-Orticoni, M., Leroy, G., Nitschke, W., Bruschi, M.,** 2000. Characterization of a new dihemic c₄-type cytochrome isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* 39, 7205-7211.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C., Rensing, C., Nies, D., Munkelt, D.,** 2005. FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Archives of Microbiology* 183, 9-18.
- Gray, N.,** 1996. A substrate classification index for the visual assessment of the impact of acid mine drainage in lotic systems. *Water Research* 30, 1551-1554.
- Griffiths, M.,** 1993. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 76, 3118-3125.

- Grunberg, K., Wawer, C., Tebo, B., Schuler, D.,** 2001. A large gene cluster encoding several magnetosome proteins is conserved in different species of magnetotactic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4573-4582.
- Guan, X., Zhang, H., Bi, Y., Zhang, L., Hao, D.,** 2010. Rapid detection of pathogens using antibody-coated microbeads with bioluminescence in microfluidic chips. *Biomedical Microdevices* 12, 683-691.
- Guiral, M., Tron, P., Aubert, C., Gloter, A., Iobbi-Nivol, C., Giudici-Ortoni, M.T.,** 2005. A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 42004-42015.
- Hantke, K.,** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4, 172-177.
- Harneit, K., Goeksel, A., Kock, D., Klock, J.H., Gehrke, T., Sand, W.,** 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83, 245-254.
- Harold, F.,** 1972. Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriological Reviews* 36, 172-230.
- Harrison, A.,** 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Archives of Microbiology* 131, 68-76.
- He, H., Zhang, C., Xia, J., Peng, A., Yang, Y., Jiang, H., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Nie, Z., Qiu, G.,** 2009. Investigation of Elemental Sulfur Speciation Transformation Mediated by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology* 58, 300-307.
- He, H., Xia, J., Jiang, H., Yan, Y., Liang, C., Ma, C., Zheng, L., Zhao, Y., Qiu, G.,** 2010. Sulfur Species Investigation in Extra- and Intracellular Sulfur Globules of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. *Geomicrobiology Journal* 27, 707-713.
- Hedrich, S., Schlomann, M., Johnson, D.,** 2011. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology-Sgm* 157, 1551-1564.
- Heidel, C., and Tichomirowa, M.,** 2011. The isotopic composition of sulfate from anaerobic and low oxygen pyrite oxidation experiments with ferric iron - New insights into oxidation mechanisms. *Chemical Geology* 281, 305-316.
- Heinhorst, S., Baker, S., Johnson, D., Davies, P., Cannon, G., Shively, J.,** 2002. Two copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Current Microbiology* 45, 115-117.
- Hoffner, S., Jimenez-Misas, C., Lundin, A.,** 1999. Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing. *Luminescence* 14, 255-261.
- Holmes, P., Fowler, T., Crundwell, F.,** 1999. The mechanism of bacterial action in the leaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of the Electrochemical Society* 146, 2906-2912.
- Holmes, D.S., Barreto, M., Valdes, J., Dominguez, C., Nayibe, M., et al.** 2001. Whole genome sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*: metabolic reconstruction, heavy metal resistance and other characteristics. Amsterdam: Elsevier, p. 237-51
- Holuigue, L., Herrera, L., Phillips, O., Young, M., Allende, J.,** 1987. CO₂ fixation by mineral-leaching bacteria: characteristics of the ribulose biphosphate carboxylase oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9, 497-505.
- Hsung, J., and Haug, A.,** 1977. Membrane-potential of *Thermoplasma acidophila*. *Febs Letters* 73, 47-50.

- Hugler, M., Huber, H., Stetter, K., Fuchs, G.,** 2003. Autotrophic CO₂ fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Archives of Microbiology* 179, 160-173.
- Hugler, M., Wirsén, C., Fuchs, G., Taylor, C., Sievert, S.,** 2005. Evidence for autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the epsilon subdivision of proteobacteria. *Journal of Bacteriology* 187, 3020-3027.
- Ilbert, M., and Bonnefoy, V.,** 2013. Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1827, 161-175.
- Ingledeu, W., Cox, J., Halling, P.,** 1977. Proposed mechanism for energy conservation during Fe²⁺ oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Chemiosmotic coupling to net H⁺ influx. *Fems Microbiology Letters* 2, 193-197.
- Ingledeu, W.,** 1982. *Thiobacillus ferrooxidans* - the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica Et Biophysica Acta* 683, 89-117.
- Ivancic, V., Mastali, M., Percy, N., Gornbein, J., Babbitt, J., Li, Y., Landaw, E., Bruckner, D., Churchill, B., Haake, D.,** 2008. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1213-1219.
- Jadhav, U.U., Hong, H., Weng, W.H.,** 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulfate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and surface roughness during the process. *Journal of Materials Processing Technology* 213, 1509-1515.
- Janiczek, O., Mandl, M., Ceskova, P.,** 1998. Metabolic activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on reduced sulfur compounds detected by capillary isotachopheresis. *Journal of Biotechnology* 61, 225-229.
- Janiczek, O., Zemanova, J., Mandl, M.,** 2007. Purification and some properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 37, 101-111.
- Jerez, C., Chamorro, D., Peirano, I., Toledo, H., Arredondo, R.,** 1988. Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Biochemistry International* 17, 989-999.
- Jiang, Y., Sun, C., Ding, X., Yuan, D., Chen, K., Gao, B., Chen, Y., Sun, A.,** 2012. Simultaneous determination of adenine nucleotides, creatine phosphate and creatine in rat liver by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 66, 258-263.
- Johnson, D., and McGinness, S.,** 1991. Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 207-211.
- Johnson, D.,** 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *Fems Microbiology Ecology* 27, 307-317.
- Johnson, D.B., Bruhn, D.F., Roberto, F.F.,** 2004. Survival of acidophilic bacteria under conditions of substrate depletion that occur during culture storage. In: Tsezos M, Hatzikioseyan A, Remoudaki E, editors. *Biohydrometallurgy; a Sustainable Technology in Evolution*. Zografou, Greece: National Technical University of Athens. p. 1195-1203.
- Johnson, D.B., and Hallberg, K.B.,** 2007. Techniques for detecting and identifying acidophilic mineral-oxidizing microorganisms. In: Rawlings DE and Johnson DB, editors. *Biomining*. Heidelberg: Springer. p 237-262.
- Johnson, D.,** 2008. Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18, 1367-1373.

- Johnson, D.B.**, 2010. The biogeochemistry of biomining. In: Barton, L.L., Mandl, M., Loy, A. (Eds.), *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer, Dordrecht, p. 401–426.
- Johnson, D.**, 2012. Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *Fems Microbiology Ecology* 81, 2-12.
- Johnson, D., Kanao, T., Hedrich, S.**, 2012. Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. *Frontiers in Microbiology* 3, 96-109.
- Johnson, D.B.**, 2015. Biomining goes underground. *Nature Geoscience*, 8, 165-166
- Kanao, T., Kamimura, K., Sugio, T.**, 2007. Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biotechnology* 132, 16-22.
- Karavaiko, G., Turova, T., Kondrat'eva, T., Lysenko, A., Kolganova, T., Ageeva, S., Muntyan, L., Pivovarov, T.**, 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 113-119.
- Katano, H., Tanaka, R., Maruyama, C., Hamano, Y.**, 2012. Assay of enzymes forming AMP plus PPi by the pyrophosphate determination based on the formation of 18-molybdopyrophosphate. *Analytical Biochemistry* 421, 308-312.
- Keasling, J., Bajpai, R., Zappi, M.**, 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Bioremediation of Surface and Subsurface Contamination* 829, 242-249.
- Kelly, D.**, 1982. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 298, 499-528.
- Kelly, D.**, 1999. Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Archives of Microbiology* 171, 219-229.
- Khlyntseva, S., Bazel, Y., Vishnikin, A., Andruch, V.**, 2009. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *Journal of Analytical Chemistry* 64, 657-673.
- Kikumoto, M., Nogami, S., Kanao, T., Takada, J., Kamimura, K.**, 2013. Tetrathionate-Forming Thiosulfate Dehydrogenase from the Acidophilic, Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 113-120.
- Kim, K., Rao, N., Fraley, C., Kornberg, A.**, 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7675-7680.
- Konishi, Y., Asai, S., Yoshida, N.**, 1995. Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3617-3622.
- Konishi, Y., Takasaka, Y., Asai, S.**, 1994. Kinetics of growth and elemental sulfur oxidation in batch culture of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 667-673.
- Kornberg, A., Rao, N., Ault-Riche, D.**, 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68, 89-125.
- Kucera, J., Bouchal, P., Cerna, H., Potesil, D., Janiczek, O., Zdrahal, Z., Mandl, M.**, 2012a. Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 101, 561-573.

- Kucera, J., Zeman, J., Mandl, M., Cerna, H.,** 2012b. Stoichiometry of bacterial anaerobic oxidation of elemental sulfur by ferric iron. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 101, 919-922.
- Kucera, J., Bouchal, P., Lochman, J., Potesil, D., Janiczek, O., Zdrahal, Z., Mandl, M.,** 2013. Ferrous iron oxidation by sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* and analysis of the process at the levels of transcription and protein synthesis. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 103, 905-919.
- Kucera, J., Pakostova, E., Janiczek, O., Mandl, M.,** 2015. Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ability to reduce ferric iron by elemental sulfur. *Adv Mater Res*;1130, 97–100.
- Kukkadapu, R., Zachara, J., Smith, S., Fredrickson, J., Liu, C.,** 2001. Dissimilatory bacterial reduction of Al-substituted goethite in subsurface sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 65, 2913-2924.
- Kupka, D., Liljeqvist, M., Nurmi, P., Puhakka, J., Tuovinen, O., Dopson, M.,** 2009. Oxidation of elemental sulfur, tetrathionate and ferrous iron by the psychrotolerant *Acidithiobacillus* strain SS3. *Research in Microbiology* 160, 767-774.
- Lack, J., Chaudhuri, S., Kelly, S., Kemner, K., O'Connor, S., Coates, J.,** 2002. Immobilization of radionuclides and heavy metals through anaerobic bio-oxidation of Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2704-2710.
- Lane, D., Harrison, A., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S., Olsen, G., Pace, N.,** 1992. Evolutionary relationships among sulfur-oxidizing and iron-oxidizing eubacteria. *Journal of Bacteriology* 174, 269-278.
- Laska, S., Lottspeich, F., Kletzin, A.,** 2003. Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology-Sgm* 149, 2357-2371.
- Lee, H., Ho, M., Bhuwan, M., Hsu, C., Huang, M., Peng, H., Chang, H.,** 2010. Enhancing ATP-based bacteria and biofilm detection by enzymatic pyrophosphate regeneration. *Analytical Biochemistry* 399, 168-173.
- Lefimil, C., Osorio, H., Quatrini, R., Holmes, D., Jedlicki, E.,** 2009. Regulation of expression of the *PetI* operon involved in iron oxidation in the biomining bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biohydrometallurgy: a Meeting Point between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation* 71-73, 199-202.
- Leigh, J., and Dodsworth, J.,** 2007. Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annual Review of Microbiology* 61, 349-377.
- Levican, G., Bruscella, P., Guacunano, M., Inostroza, C., Bonnefoy, V., Holmes, D., Jedlicki, E.,** 2002. Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184, 1498-1501.
- Levican, G., Ugalde, J., Ehrenfeld, N., Maass, A., Parada, P.,** 2008. Comparative genomic analysis of carbon and nitrogen assimilation mechanisms in three indigenous bioleaching bacteria: predictions and validations. *Bmc Genomics* 9, 581-600.
- Liermann, L., Hausrath, E., Anbar, A., Brantley, S.,** 2007. Assimilatory and dissimilatory processes of microorganisms affecting metals in the environment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 867-877.
- Liu, D., Zhang, T., Cheng, Y., Jia, Q.,** 2014. Poly(glycidyl methacrylate-co-N-methylolacrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monolith coupled to high-performance liquid chromatography for the determination of adenosine phosphates in royal jelly. *Journal of Separation Science* 37, 1826-1833.

- Liu, H., Gu, G., Xu, Y.,** 2011. Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy* 108, 143-148.
- Loser, C., Zehnsdorf, A., Gorsch, K., Seidel, H.,** 2005. Bioleaching of heavy metal polluted sediment: Kinetics of leaching and microbial sulfur oxidation. *Engineering in Life Sciences* 5, 535-549.
- Lovell, H.,** 1983. Coal Mine Drainage in the United States - An Overview. *Water Science and Technology* 15, 1-25.
- Lovley, D.,** 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* 55, 259-287.
- Lovley.,** 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology* 47, 263-290.
- Lovley, D., Holmes, D., Nevin, K., Poole, R.,** 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 49 49, 219-286.
- Lowson, R.,** 1982. Aqueous oxidation of pyrite by molecular oxygen. *Chemical Reviews* 82, 461-497.
- Lundin, A.,** 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, Pt C 305, 346-370.
- Mackintosh, M.,** 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* 105, 215-218.
- Malarte, G., Leroy, G., Lojou, E., Abergel, C., Bruschi, M., Giudici-Orticoni, M.T.,** 2005. Insight into molecular stability and physiological properties of the diheme cytochrome CYC41 from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* 44, 6471-6481.
- Mandl, M., and Novakova, O.,** 1993. An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of oxidation of iron sulfide minerals by bacteria. *Biotechnology Techniques* 7, 573-574.
- Mandl, M., Pakostova, E., Poskerova, L.,** 2014. Critical values of the volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen concentration that prevent oxygen limitation in ferrous iron and elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 150, 276-280.
- Mangold, S., Valdes, J., Holmes, D., Dopson, M.,** 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Frontiers in Microbiology* 2, 1-18.
- Mansfield, L., and Forsythe, S.,** 2000. Detection of salmonellae in food. *Reviews in Medical Microbiology* 11, 37-46.
- Matin, A., Wilson, B., Zychlinsky, E., Matin, M.,** 1982. Proton motive force and the physiological basis of delta pH maintenance in *Thiobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology* 150, 582-591.
- Matin, A.,** 1990. Keeping a neutral cytoplasm; the bioenergetics of obligate acidophiles. *Fems Microbiology Letters* 75, 307-318.
- Medvedev, D., and Stuchebrukhov, A.,** 2001. DNA repair mechanism by photolyase: Electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH(-) to DNA thymine dimer. *Journal of Theoretical Biology* 210, 237-248.
- Minikh, O., Tolba, M., Brovko, L., Griffiths, M.,** 2010. Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 82, 177-183.

- Mitchell, P.**, 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 41, 445-502.
- Mitchell, P.**, 1976. Vectorial chemistry and molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. *Biochemical Society Transactions* 4, 399-430.
- Mo, H., Chen, Q., Du, J., Tang, L., Qin, F., Miao, B., Wu, X., Zeng, J.**, 2011. Ferric Reductase Activity of the ArsH Protein from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 464-469.
- Mohapatra, B.R., Gould, W.D., Dinardo, O., Koren, D.W.**, 2008. An overview of the biochemical and molecular aspects of microbial oxidation of inorganic sulfur compounds. *Clean* 36, 823-829.
- Moses, C., Nordstrom, D., Herman, J., Mills, A.**, 1987. Aqueous pyrite oxidation by dissolved oxygen and by ferric iron. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 51, 1561-1571.
- Nieto, P.A., Covarrubias, P.C., Jedlicki, E., Holmes, D.S., Quatrini, R.**, 2009. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bmc Molecular Biology* 10, 63-74.
- Ninfa, A., and Jiang, P.**, 2005. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology* 8, 168-173.
- Ning, Y., Duan, Y., Feng, Y., Deng, L.**, 2014. Label-free fluorescent aptasensor based on a graphene oxide self-assembled probe for the determination of adenosine triphosphate. *Analytical Letters* 47, 2350-2360.
- Niu, Q., Liu, J., Li, G., Qin, H., Gao, H., Sun, W.**, 2012. Electrochemical Behaviours and Detection of Adenosine-5'-triphosphate on an Ionic Liquid Modified Carbon Paste Electrode. *Journal of the Chinese Chemical Society* 59, 667-673.
- Noorman, H.J.**, 2006. Mass transfer, In: Ratledge, C., Kristiansen, B. (Eds.), *Basic Biotechnology*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 201-217.
- Nouailler, M., Bruscella, P., Lojou, E., Lebrun, R., Bonnefoy, V., Guerlesquin, F.**, 2006a. Structural analysis of the HiPIP from the acidophilic bacteria: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Extremophiles* 10, 191-198.
- Nouailler, M., Morelli, X., Bornet, O., Chetrit, B., Dermoun, Z., Guerlesquin, F.**, 2006b. Solution structure of HndAc: A thioredoxin-like domain involved in the NADP-reducing hydrogenase complex. *Protein Science* 15, 1369-1378.
- Ohmura, N., Kitamura, K., Saiki, H.**, 1993. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4044-4050.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N., Saiki, H.**, 2002. Anaerobic respiration using Fe³⁺, S⁰, and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 184, 2081-2087.
- Okibe, N., and Johnson, D.B.**, 2011. A rapid ATP-based method for determining active microbial populations in mineral leach liquors. *Hydrometallurgy* 108, 195-198.
- Ona-Nguema, G., Abdelmoula, M., Jorand, F., Benali, O., Gehin, A., Block, J., Genin, J.**, 2002. Microbial reduction of lepidocrocite gamma-FeOOH by *Shewanella putrefaciens*; The formation of green rust. *Hyperfine Interactions* 139, 231-237.
- Orell, A., Navarro, C., Rivero, M., Aguilar, J., Jerez, C.**, 2012. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles* 16, 573-583.

- Oshita, S., Al-Haq, M., Kawagishi, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Ye, X., Shinozaki, S., Hiruma, N.,** 2011. Monitoring of ATP and viable cells on meat surface by UV-Vis reflectance spectrum analysis. *Journal of Food Engineering* 107, 262-267.
- Osorio, H., Martinez, V., Nieto, P., Holmes, D., Quatrini, R.,** 2008. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *Bmc Microbiology* 8, 203-221.
- Osorio, H., Cardenas, J.P., Valdes, J., Holmes, D.S.,** 2009. Prediction of FNR regulated genes and metabolic pathways potentially involved in anaerobic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biohydrometallurgy: a Meeting Point between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation* 71-73, 195-198.
- Osorio, H., Mangold, S., Denis, Y., Nancucheo, I., Esparza, M., Johnson, D., Bonnefoy, V., Dopson, M., Holmes, D.,** 2013. Anaerobic Sulfur Metabolism Coupled to Dissimilatory Iron Reduction in the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 2172-2181.
- Pakchung, A., Simpson, P., Codd, R.,** 2006. Life on earth. Extremophiles continue to move the goal posts. *Environmental Chemistry* 3, 77-93.
- Pakostova, E., Mandl, M., Pokorna, B.O., Diviskova, E., Lojek, A.,** 2013a. Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur. *Geomicrobiology Journal* 30, 1-7.
- Pakostova, E., Mandl, M., Tuovinen, O.H.,** 2013b. Cellular ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochemistry* 48, 1785-1788.
- Patil, S., Mote, U., Lee, S., Kolekar, G.,** 2010. Fluorimetric study of the interaction between ATP and ciprofloxacin- Y^{3+} complex and its application. *Journal of Rare Earths* 28, 329-332.
- Peck, H.,** 1961. Evidence for reversibility of reaction catalyzed by adenosine 5'-phosphosulfate reductase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 49, 621-624.
- Petersen, J.,** 2010. Determination of oxygen gas-liquid mass transfer rates in heap bioleach reactors. *Minerals Engineering* 23, 504-510.
- Pisapia, C., Chaussidon, M., Mustin, C., Humbert, B.,** 2007. O and S isotopic composition of dissolved and attached oxidation products of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Comparison with abiotic oxidations. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 71, 2474-2490.
- Pisapia, C., Humbert, B., Chaussidon, M., Mustin, C.,** 2008. Perforative corrosion of pyrite enhanced by direct attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiology Journal* 25, 261-273.
- Pogliani, C., and Donati, E.,** 1999. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22, 88-92.
- Pokorna, B., Mandl, M., Borilova, S., Ceskova, P., Markova, R., Janiczek, O.,** 2007. Kinetic constant variability in bacterial oxidation of elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3752-3754.
- Ponce, J.S., Moinier, D., Byrne, D., Amouric, A., Bonnefoy, V.,** 2012. *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizes ferrous iron before sulfur likely through transcriptional regulation by the global redox responding RegBA signal transducing system. *Hydrometallurgy* 127, 187-194.
- Pretorius, I., Rawlings, D., O'Neill, E., Jones, W., Kirby, R., Woods, D.,** 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 169, 367-370.

- Pronk, J., Meulenberg, R., Hazeu, W., Bos, P., Kuenen, J.,** 1990. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *Fems Microbiology Letters* 75, 293-306.
- Pronk, J., Liem, K., Bos, P., Kuenen, J.,** 1991a. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2063-2068.
- Pronk, J., Meijer, W., Hazeu, W., Vandijken, J., Bos, P., Kuenen, J.,** 1991b. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2057-2062.
- Pronk, J., Debruyne, J., Bos, P., Kuenen, J.,** 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2227-2230.
- Pu, W., Zhang, L., Huang, C.,** 2012. Graphene oxide as a nano-platform for ATP detection based on aptamer chemistry. *Analytical Methods* 4, 1662-1666.
- Quatrini, R., Jedlicki, E., Holmes, D.,** 2005a. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32, 606-614.
- Quatrini, R., Lefmimil, C., Holmes, D., Jedlicki, E.,** 2005b. The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology-Sgm* 151, 2005-2015.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., et al.,** 2006. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83, 263-272.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D., Bonnefoy, V.,** 2009. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Bmc Genomics* 10, 394-413.
- Ram, R., VerBerkmoes, N., Thelen, M., Tyson, G., Baker, B., Blake, R., Shah, M., Hettich, R., Banfield, J.,** 2005. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* 308, 1915-1920.
- Ramirez, P., Toledo, H., Guiliani, N., Jerez, C.A.,** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1837-1845.
- Rao, G., and Berger, L.,** 1971. Requirement of low pH for growth of *Thiobacillus thiooxidans*. *Archiv Fur Mikrobiologie* 79, 338-344.
- Rao, N., Gomez-Garcia, M., Kornberg, A.,** 2009. Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival. *Annual Review of Biochemistry* 78, 605-647.
- Rawlings, D.,** 1988. Sequence and structural analysis of the alpha-dinitrogenase and beta-dinitrogenase subunits of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Gene* 69, 337-343.
- Rawlings, D., and Johnson, D.B.,** *Extremophiles – Vol. III - Ecology and biodiversity of extremely acidophilic microorganisms.* UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, UK. (1998).
- Rawlings, D.,** 2001. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 59, 187-201.
- Rawlings, D.,** 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* 56, 65-91.
- Rawlings, D.,** 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4, 13-16.

- Rawlings, D., and Johnson, D.,** 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology-Sgm* 153, 315-324.
- Rodriguez, Y., Ballester, A., Blazquez, M., Gonzalez, F., Munoz, J.,** 2003a. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 37-46.
- Rodriguez, Y., Ballester, A., Blazquez, M., Gonzalez, F., Munoz, J.,** 2003b. Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite. *Geomicrobiology Journal* 20, 131-141.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W.,** 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 239-248.
- Rohwerder, T., and Sand, W.,** 2007. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences* 7, 301-309.
- Rojas, J., Giersig, M., Tributsch, H.,** 1995. Sulfur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation. *Archives of Microbiology* 163, 352-356.
- Rojas-Chapana, J., and Tributsch, H.,** 2001. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 59, 291-300.
- Romanova, N., Gawande, P., Brovko, L., Griffiths, M.,** 2007. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 71, 231-237.
- Saini, R., Kapoor, R., Kumar, R., Siddiqi, T., Kumar, A.,** 2011. CO₂ utilizing microbes - A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 29, 949-960.
- Sand, W.,** 1987. Importance of hydrogen sulfide, thiosulfate, and methylmercaptan for growth of thiobacilli during simulation of concrete corrosion. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1645-1648.
- Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R., Schippers, A.,** 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism – a critical evaluation of bacterial leaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 961-966.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., Schippers, A.,** 2001. (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59, 159-175.
- Sasaki, K., Tsunekawa, M., Konno, H.,** 1994. Nonstoichiometry in the oxidative dissolution of pyrite in acid solutions. *Bunseki Kagaku* 43, 911-917.
- Sasaki, K., Tsunekawa, M., Ohtsuka, T., Konno, H.,** 1995. Confirmation of a sulfur-rich layer on pyrite after oxidative dissolution by Fe(III) ions around pH 2. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 59, 3155-3158.
- Savic, D.S., Veljkovic, V.B., Lazic, M.L., Vrvic, M.M., Vucetic, J.L.,** 1998. Effects of the oxygen transfer rate on ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 427-431.
- Schaferling, M., Lang, T., Schnettelker, A.,** 2014. Turn-on fluorescence probes based on pyranine/viologen charge-transfer complexes for the determination of nucleotides. *Journal of Luminescence* 154, 458-464.
- Schauder, R., and Kroger, A.,** 1993. Bacterial sulfur respiration. *Archives of Microbiology* 159, 491-497.
- Schippers, A., Jozsa, P., Sand, W.,** 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3424-3431.
- Schippers, A., and Sand, W.,** 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 319-321.

Seidel, H., Goersch, K., Schuemichen, A., 2006. Effect of oxygen limitation on solid-bed bioleaching of heavy metals from contaminated sediments. *Chemosphere* 65, 102-109.

Selkov, E., Overbeek, R., Kogan, Y., Chu, L., Vonstein, V., Holmes, D., Silver, S., Haselkorn, R., Fonstein, M., 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes: Amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3509-3514.

Serour, E., and Antranikian, G., 2002. Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 73-83.

Sharma, P., Das, A., Rao, K., Forssberg, K., 2003. Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy* 71, 285-292.

Sharma, A., Kawarabayasi, Y., Satyanarayana, T., 2012. Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles* 16, 1-19.

Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., Kitagawa, Y., 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 171, 3458-3464.

Shrihari, Kumar, R., Gandhi, K., Natarajan, K., 1991. Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 278-282.

Shrihari, Modak, J., Kumar, R., Gandhi, K., 1995. Dissolution of particles of pyrite mineral by direct attachment of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 38, 175-187.

Silverman, M.P., and Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77, 642-647.

Singer, P., and Stumm, W., 1970. Acidic Mine Drainage: The Rate-Determining Step. *Science* 167, 1121-1123.

Slonczewski, J., Fujisawa, M., Dopson, M., Krulwich, T., Poole, R., 2009. Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*, Vol 55, 1-79.

Southam, G., and Beveridge, T., 1992. Enumeration of Thiobacilli within pH-Neutral and Acidic Mine Tailings and Their Role in the Development of Secondary Mineral Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1904-1912.

Sperotto, R., Gross, J., Vedoy, C., Passaglia, L., Schrank, I., 2004. The electron transfer flavoprotein *fzxABCX* gene products from *Azospirillum brasilense* show a NifA-dependent promoter regulation. *Current Microbiology* 49, 267-273.

Squirrel, D., Price, R., Murphy, M., 2002. Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence. *Analytica Chimica Acta* 457, 109-114.

Sreekrishnan, T.R., and Tyagi, R.D., 1996. A comparative study of the cost of leaching out heavy metals from sewage sludges. *Process Biochemistry* 31, 31-41.

Steudel, R., 1996. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35, 1417-1423.

Strehler, B., and Totter, J., 1952. Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms .1. Substrate and enzyme determination. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40, 28-41.

- Stumm, W., and Sulzberger, B.,** 1992. The cycling of iron in natural environments – considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 56, 3233-3257.
- Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K., Tano, T.,** 1989. Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur-ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 973, 250-256.
- Sugio, T., Hirose, T., Ye, L., Tano, T.,** 1992. Purification and some properties of sulfite-ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 174, 4189-4192.
- Sugio, T., Hisazumi, T., Kanao, T., Kamimura, K., Takeuchi, F., Negishi, A.,** 2006. Existence of aa(3)-type ubiquinol oxidase as a terminal oxidase in sulfite oxidation of *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70, 1584-1591.
- Sugio, T., Taha, T., Takeuchi, F.,** 2009. Ferrous Iron Production Mediated by Tetrathionate Hydrolase in Tetrathionate-, Sulfur-, and Iron-Grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73, 1381-1386.
- Suhai, T., Heidrich, N., Dencher, N., Seelert, H.,** 2009. Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. *Electrophoresis* 30, 3622-3625.
- Sun, L.X., Zhang, X., Tan, W.-S., Zhu, M.-L.,** 2012a. Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114, 531-536.
- Sun, W., Xu, L., Li, T., Wang, X., Li, G., Sun, Z.,** 2012b. Electrochemical Behaviors of Adenosine-5'-triphosphate on Molecular Wire Modified Carbon Paste Electrode and Its Sensitive Detection. *Journal of the Chinese Chemical Society* 59, 1571-1577.
- Suzuki, I.,** 1965a. Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 110, 97-101.
- Suzuki, U.,** 1965b. Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 104, 359-371.
- Tamura, H., Goto, K., Yotsuyan, T., Nagayama, M.,** 1974. Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-phenanthroline in presence of large amounts of iron(III). *Talanta* 21, 314-318.
- Thore, A., Lundin, A., Ansehn, S.,** 1983. Firefly luciferase ATP assay as a screening method for bacteriuria. *Journal of Clinical Microbiology* 17, 218-224.
- Tributsch, H., and Bennett, J.,** 1981. Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching 1. Oxidation of metal sulfides with large energy gaps. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 31, 565-577.
- Tributsch, H., and Rojas-Chapana, J.,** 2000. Metal sulfide semiconductor electrochemical mechanisms induced by bacterial activity. *Electrochimica Acta* 45, 4705-4716.
- Tributsch, H.,** 2001. Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59, 177-185.
- Tsaplina, I.A., Zhuravleva, A.E., Ismailov, A.D., Zakharchuk, L.M., Krasil'nikova, E.N., Bogdanova, T.I., Karavaiko, G.I.,** 2007. The dependence of intracellular ATP level on the nutrition mode of the acidophilic bacteria *Sulfobacillus thermotolerans* and *Alicyclobacillus tolerans*. *Microbiology* 76, 654-662.
- Tsutsumi, K., Munekata, M., Shiba, T.,** 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* 1493, 73-81.
- Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J., Six, S.,** 1995. O₂-sensing and O₂-dependent gene-regulation in facultatively anaerobic-bacteria. *Archives of Microbiology* 164, 81-90.

- Uden, G., and Trageser, M.,** 1991. Oxygen regulated gene-expression in *Escherichia coli* – control of anaerobic respiration by the Fnr protein. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 59, 65-76.
- Valdes, J., Veloso, F., Jedlicki, E., Holmes, D.,** 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *Bmc Genomics* 4, 51-67.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J., Holmes, D.,** 2008a. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *Bmc Genomics* 9, 597-621.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Holmes, D.S.,** 2008b. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94, 180-184.
- Valdes, J., Cardenas, J., Quatrini, R., Esparza, M., Osorio, H., Duarte, F., Lefimil, C., Sepulveda, R., Jedlicki, E., Holmes, D.,** 2010. Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching. *Hydrometallurgy* 104, 471-476.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D., Jerez, C.,** 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology Advances* 24, 197-211.
- Varela, C., Mauriaca, C., Paradela, A., Albar, J., Jerez, C., Chavez, F.,** 2010. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *Bmc Microbiology* 10, 7-21.
- Veljkovic, V.B., Savic, D.S., Lazic, M.L., Vrvic, M.M.,** 1999. Oxygen mass transfer requirements during ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* under controlled pH conditions. *Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century*, Pt a 1999 9, 617-623.
- Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M., Kern, R.,** 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods* 52, 367-377.
- Vera, M., Guiliani, N., Jerez, C.,** 2003. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 71, 125-132.
- Vera, M., Pagliai, F., Guiliani, N., Jerez, C.,** 2008. The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by expressing a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1829-1835.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W.,** 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7529-7541.
- Vestal, J., and Lundgren, D.,** 1971. Sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*). *Canadian Journal of Biochemistry* 49, 1125-1130.
- Viedma, P.,** 2007. Method for detecting presence of acidophilic microorganisms in bioleaching solution. U.S. Patent No. 7851177.
- von Papen, M., Gambaryan, S., Schutz, C., Geiger, J.,** 2013. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 40, 109-116.
- Wakai, S., Ohmori, A., Kanao, T., Sugio, T., Kamimura, K.,** 2005. Purification and biochemical characterization of the F₁-ATPase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1 and analysis of the *atp* operon. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69, 1884-1891.

- Wang, J., Chu, Y., Li, W., Wang, X., Guo, J., Yan, L., Ma, X., Ma, Y., Yin, Q., Liu, C.,** 2014. Simultaneous determination of creatine phosphate, creatine and 12 nucleotides in rat heart by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 958, 96-101.
- Wang, T., and Kang, J.,** 2009. Hexokinase inhibitor screening based on adenosine 5'-diphosphate determination by electrophoretically mediated microanalysis. *Electrophoresis* 30, 1349-1354.
- Wang, W., Yang, B., Qu, Y., Liu, X., Su, W.,** 2011. FeS/S/FeS₂ Redox System and Its Oxidoreductase-like Chemistry in the Iron-Sulfur World. *Astrobiology* 11, 471-476.
- Weber, K., Achenbach, L., Coates, J.,** 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752-764.
- Wiersma, C., and Rimstidt, J.,** 1984. Rates of reaction of pyrite and marcasite with ferric iron at pH-2. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 48, 85-92.
- Yang, M., Liao, L., Zhang, G., Xiao, X., Lin, Y., Nie, C.,** 2013. Determination of ATP using a double-receptor sandwich method based on molecularly imprinted membrane and fluorescence-labeled uranyl-salophen complex. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 7545-7551.
- Yarzabal, A., Brasseur, G., Ratouchniak, J., Lund, K., Lemesle-Meunier, D., DeMoss, J., Bonnefoy, V.,** 2002. The high-molecular-weight cytochrome c *cyc2* of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein (vol 184, pg 313, 2002). *Journal of Bacteriology* 184, 1502-1502.
- Yarzabal, A., Appia-Ayme, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V.,** 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology-Sgm* 150, 2113-2123.
- Yue, X., Zhang, Y., Zhang, Z.,** 2009. An On-Line Method for Determining ATPase Bioactivity and Its Application to Human Umbilical Vein Endothelial Cell Membrane. *Journal of Analytical Chemistry* 64, 967-971.
- Zeng, W., Wang, L., Liu, S., Lin, S., Beuerman, R., Cao, D.,** 2012. Cationic conjugated polyelectrolyte-based sensitive fluorescence assay for adenosinetriphosphate and alkaline phosphatase. *Sensors and Actuators B-Chemical* 171, 652-657.
- Zhang, C., Xia, J., Ding, J., Ouyang, X., Nie, Z., Qiu, G.,** 2009. Cellular acclimation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to sulfur biooxidation. *Minerals & Metallurgical Processing* 26, 30-34.
- Zhang, G., Walker, A., Lin, Z., Han, X., Blatnik, M., Steenwyk, R., Groeber, E.,** 2014. Strategies for quantitation of endogenous adenine nucleotides in human plasma using novel ion-pair hydrophilic interaction chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography a* 1325, 129-136.
- Zhao, M., Liao, L., Wu, M., Lin, Y., Xiao, X., Nie, C.,** 2012. Double-receptor sandwich supramolecule sensing method for the determination of ATP based on uranyl-salophen complex and aptamer. *Biosensors & Bioelectronics* 34, 106-111.
- Zokaei-Kadijani, S., Safdari, J., Mousavian, M.A., Rashidi, A.,** 2013. Study of oxygen mass transfer coefficient and oxygen uptake rate in a stirred tank reactor for uranium ore bioleaching. *Annals of Nuclear Energy* 53, 280-287.
- Zou, L., Li, Q., Han, G., Lu, L.,** 2011. Simultaneous Determination of Exogenous Phosphocreatine and Its Metabolite Creatine and Related Adenosine Triphosphate in Rat Plasma and Red Blood Cell by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet-Visible Assay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 39, 45-50.

zur Nedden, S., Eason, R., Doney, A., Frenguelli, B., 2009. An ion-pair reversed-phase HPLC method for determination of fresh tissue adenine nucleotides avoiding freeze-thaw degradation of ATP. *Analytical Biochemistry* 388, 108-114.

7. Seznam publikovaných prací

Časopisy

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka, DIVÍŠKOVÁ Eva, LOJEK Antonín. 2013a. Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur. *Geomicrobiology Journal* 30, 1-7. (IF = 1,804)

Příloha I

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, TUOVINEN Olli H. 2013b. Cellular ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochemistry* 48, 1785-1788. (IF = 2,524)

Příloha II

MANDL Martin, **PAKOSTOVÁ Eva**, POSKEROVÁ Lenka. 2014. Critical values of the volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen concentration that prevent oxygen limitation in ferrous iron and elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 150, 276-280. (IF = 2,224)

Příloha III

KUČERA Jiří, **PAKOSTOVÁ Eva**, JANICZEK Oldrich, MANDL Martin. 2015. Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ability to reduce ferric iron by elemental sulfur. *Advanced Material Research* 1130, 97-100. (recenzovaný ve WOS, bez IF)

KUČERA Jiří, **PAKOSTOVÁ Eva**, LOCHMAN Jan, JANICZEK Oldrich, MANDL Martin. Are there multiple mechanisms of anaerobic sulfur oxidation with ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans*? *Research in Microbiology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.02.004>. (IF = 2,705)

Příloha IV

8. Konferenční příspěvky

Plné články

MANDL Martin, **PAKOSTOVÁ Eva**, POSKEROVÁ Lenka. Impact of oxygen demand on aeration in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures: biotechnological implications. In *3rd International Conference on Biotechnology and Metals* (Kaduková Jana, Luptáková Alena, Velgosová Oksana, eds.), p. 66-69. Faculty of Metallurgy of Technical University and Institute of Geotechnics of Slovak Academy of Sciences, Košice 2014.

Abstrakty

MANDL Martin, **PAKOSTOVÁ Eva**, KUČERA Jiří, BARTÁKOVÁ Iva, BOUCHAL Pavel, JANICZEK Oldřich. Mobilization and phytotoxicity of iron under conditions of bacterial oxidation of iron sulfides. In *Biometals 2010*, p. 94. University of Arizona, Tucson 2010.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka, DIVÍŠKOVÁ Eva. Application of a bioluminescent ATP assay for monitoring growth of acidophilic bacteria. In *Biotech 2011 & 5th Czech-Swiss Symposium*, p. 88-89. Institute of Chemical Technology, Prague 2011.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka, DIVÍŠKOVÁ Eva. Bioluminescent assay as a tool for monitoring metabolic activity of acidophilic bacteria. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*, p. 48. Masarykova univerzita a Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Brno 2011.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka. ATP measurements in acidophilic bacteria oxidizing iron(II) and elemental sulfur. In *XIII. biochemický sjezd ČSBMB*, p. 157. Brno 2012.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka, DIVÍŠKOVÁ Eva. ATP assay for monitoring metabolic activity of acidophilic bacteria. In *15th European Congress on Biotechnology*. Istanbul 2012.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, a OMESOVÁ POKORNÁ Blanka. A bioluminescent assay for monitoring substrate oxidation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In *26. kongres Československé společnosti mikrobiologické*, p. 242. Prague 2013.

PAKOSTOVÁ Eva, MANDL Martin, OMESOVÁ POKORNÁ Blanka. Cellular ATP of iron-and sulfur-oxidizing bacteria as an indicator of cell energetics and growth. In *38th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies*, FEBS Journal (Suppl. 1), p. 99. Saint Petersburg 2013.

PAKOSTOVÁ Eva a **MANDL Martin**. Differences in cellular ATP levels in *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizing ferrous iron and elemental sulfur. In *BioMicroWorld 2013*, p. 93. Formatex, Madrid 2013.

MANDL Martin, **PAKOSTOVÁ Eva**, **POSKEROVÁ Lenka**. The parameters of oxygen demand and minimum aeration in a bioreactor to avoid oxygen limitation during substrate oxidation. In *BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium*, p. 155. Institute of Chemical Technology, Prague 2014.

MANDL Martin a **PAKOSTOVÁ Eva**. Bioprocesy a limitace kyslíkem. In *XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*, p. 58. Masarykova univerzita a Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, Brno 2014.

KUČERA Jiří, **PAKOSTOVÁ Eva**, **JANICZEK Oldřich**, **MANDL Martin**. A model of anaerobic dissimilatory iron reduction in the biomining extremophile. In *BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium*, p. 156. Institute of Chemical Technology, Prague 2014.

KUČERA Jiří, **PAKOSTOVÁ Eva**, **JANICZEK Oldřich**, **MANDL Martin**. Gene regulation during ferric iron reduction coupled to sulfur metabolism in biomining bacteria. In *XVI. Setkání biochemiků a molekulárních biologů*. Masarykova univerzita a Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, p. 64. Brno 2014.

9. Seznam zkratek

A.	<i>Acidithiobacillus</i>
ABC	ATP-vazebná kazeta
AcoP	cupredoxin
ADP	adenosindifosforečnan
AMP	adenosinmonofosforečnan
APS	adenosin-5'-fosfosíran
ATCC	American Type Culture Collection
aSOP	acidofilní prokaryota oxidující síru
aSRB	acidofilní bakterie redukující sírany
aSRP	acidofilní prokaryota redukující síru
AFM	mikroskopie atomárních sil
ATP	adenosintrifosforečnan
C	koncentrace rozpuštěného kyslíku
C'	koncentrace rozpuštěného kyslíku v ustáleném stavu
C*	saturační koncentrace rozpuštěného kyslíku
C ₀	nízká koncentrace kyslíku
CBB cyklus	Calvin-Benson-Basshamův cyklus
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
C _{crit.}	kritické koncentrace kyslíku
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní látky
FNR	protein regulující redukci fumaranu a dusičnanu
GSH	glutathion
GSSG	disulfid glutathionu
GSSH	polysulfidový glutathion
HDR	heterodisulfidreduktasa
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující 50% inhibici
K _m	Michaelisova konstanta
K _s	saturační konstanta
(k _{LA}) _{crit}	kritická hodnota koeficientu přestupu kyslíku
L.	<i>Leptospirillum</i>
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosforečnan
NDH1	NADH ubichinondehydrogenasa
PMF	protonmotivní síla
PAPS	3'-adenosin-5'-fosfosíran
PCR	polymerázová řetězová reakce
polyP	polyfosforečnany
PPi	pyrofosforečnan
Q	rychlost respirace

Q/QH ₂	ubichinonový pool
QS	quorum sensing
qRT-PCR	reverzně transkripční kvantitativní real-time PCR
Rhd	rhodanasa
RISCs	redukované anorganické sloučeniny síry
RLU	relativní luminiscenční jednotka
Rubisco	ribulosabisfosforečnankarboxylasa/oxygenasa
Rus	rusticyanin
Sat	ATP sulfurylase
Sdo	sulfurdioxygenasa
Sor	siřičitanoxidoreduktasa
Sqr	sulfid:chinonoxidoreduktasa
TCA	kyselina trichloroctová
TCA cyklus	reduktivní cyklus trikarboxylových kyselin
TOC	celkový organický uhlík
Tqo	thiosíran:chinonoxidoreduktasa
Tth	tetrathionanhydrolasa
Δ pH	transmembránový pH gradient
$\Delta\psi$	transmembránový elektrický potenciál

Příloha I

Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur.

Pakostova, E., Mandl, M., Omesova Pokorna, B., Diviskova, E., Lojek, A., 2013. Geomicrobiology Journal 30, 1-7.

This article was downloaded by: [Masarykova Univerzita v Brne], [Eva Pakostova]

On: 21 November 2012, At: 04:37

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Geomicrobiology Journal

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/ugmb20>

Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur

Eva Pakostova^a, Martin Mandl^a, Blanka Omesova Pokorna^a, Eva Diviskova^a & Antonin Lojek^b

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^b Institute of Biophysics ASCR, Brno, Czech Republic

Accepted author version posted online: 18 Apr 2012. Version of record first published: 08 Nov 2012.

To cite this article: Eva Pakostova, Martin Mandl, Blanka Omesova Pokorna, Eva Diviskova & Antonin Lojek (2013): Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur, *Geomicrobiology Journal*, 30:1, 1-7

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2011.636790>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Cellular ATP Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cultures Oxidizing Ferrous Iron and Elemental Sulfur

EVA PAKOSTOVA¹, MARTIN MANDL^{1*}, BLANKA OMESOVA POKORNA¹, EVA DIVISKOVA¹,
and ANTONIN LOJEK²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Institute of Biophysics ASCR, Brno, Czech Republic

Received October 2011, Accepted October 2011

Cellular ATP content of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures was determined with a bioluminescence assay in relation to batch growth and oxidation of ferrous iron and elemental sulfur. Inhibitory effects of inorganic substrates and products on luciferase were eliminated. Extracellular ATP levels were negligible. The ATP content of sulfur-grown cells decreased anomalously due to a culture pH increase at the stationary phase. Although the rates of growth and sulfur oxidation reached the original levels, the ATP content of the culture remained constant because of gradual decrease in the cellular ATP. The maximum ATP levels in *A. ferrooxidans* grown with Fe²⁺ and S⁰ were 1.16 and 0.33 amol per cell, respectively. The results defined conditions under which biomass growth could be monitored by the ATP assay to study biogeochemical activities of acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacteria.

Keywords: Acidithiobacillus, acidophiles, ATP assay, iron-oxidizing bacteria, sulfur-oxidizing bacteria

Introduction

ATP has been successfully used as a biomarker for viable microorganisms and various bioluminescence assays have been developed for this purpose (Lundin 2000; Venkateswaran et al. 2003). The technique has multiple applications in rapid clinical diagnostics and in industrial microbiology and microbial ecology. Acidophilic chemolithotrophs are intimately involved in acid production and metal solubilization in coal and metal mine sites and biomining industry as well as in biogeochemical processes in sulfide mineral deposits (Bhatti et al. 2011; Johnson 2010). *Acidithiobacillus ferrooxidans* is one of the central mesophilic bacteria in these processes. In general, while the growth kinetics with basic substrates has been characterized, the ATP content of *A. ferrooxidans* is relatively unknown although it has potential for process monitoring applications in biomining and geomicrobiology.

The luciferin-luciferase bioluminescence assay for ATP has been successfully employed to monitor ATP formation in *A. ferrooxidans* vesicles (Apel et al. 1980), and in cells separated from the culture and vesicles of moderately thermophilic

A. caldus (Dopson et al. 2002). Cellular ATP content in *A. ferrooxidans* has been determined but it was not monitored with respect to growth kinetics and specific substrates (Efremenko et al. 2005). Pronk et al. (1991) used the luciferin-luciferase reaction to analyze ATP in an anaerobic culture *A. ferrooxidans*, but the luciferase reaction in the assay was sensitive to inhibition by ferric iron in the samples. Tsaplina et al. (2007) used the assay to determine cellular ATP content of iron-oxidizing *A. ferrooxidans* and other chemolithotrophic acidophiles.

However, the authors' description of the sampling did not specify the actual physiological conditions of the bacterial cultures, and the study did not address the relationship between the culture ATP and growth kinetics. The ATP bioluminescence assay can also be applied to bioleaching solution samples by concentrating the bacteria by membrane filtration followed by washing and ATP extraction (Viedma 2007). However, cellular ATP levels are sensitive to experimental manipulation and treatments that affect the cell physiology.

Preliminary ATP data for iron-oxidizing *A. ferrooxidans* cultures have been reported (Mandl et al. 2009). Okibe and Johnson (2011) have used the ATP assay for determination of active bacteria in bioleaching systems. They tested several mesophilic and thermophilic bacteria and compared total and viable counts of *Leptospirillum ferriphilum* with cellular ATP contents. The sampling, sample treatment as well as some results were different from our study. In addition, Okibe and Johnson (2011) did not test *A. ferrooxidans* at depth. The above studies brought no specific information about bacteria oxidizing sulfur substrates.

We thank Dr. Arne Lundin for helpful discussions. This work was supported by grants 525/08/0697 from the Czech Science Foundation and MSM0021622413 from the Czech Ministry of Education.

*Address correspondence to Martin Mandl, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2 61137, Brno, Czech Republic; Email: mandl@chemi.muni.cz

The purpose of the present study was to measure cellular ATP levels in *A. ferrooxidans* cultures under specific physiological conditions and to develop a culture sampling protocol that eliminates interferences with the ATP assay. Fe²⁺ and elemental sulfur were used as basic electron donors, and their oxidation was correlated with growth and substrate oxidation kinetics.

Materials and Methods

Bacteria and Culture Conditions

A. ferrooxidans (CCM 4253) was grown on elemental sulfur (1.5% w/v) using a 5-l bioreactor as previously described (Pokorna et al. 2007). The culture medium and methods to monitor cell growth turbidimetrically and sulfate formation (isotachophoresis) have been previously reported (Ceskova et al. 2002; Janiczek et al. 1998). For inhibition experiments, colloidal sulfur (sulfur, powder; Riedel-deHaën, Germany) was used as the substrate. Cultures with iron (9K medium with 159 mM ferrous iron) were incubated in shake flasks on a rotary shaker (Bouchal et al. 2006).

The culture was maintained at about pH 1.7 to avoid the formation of iron precipitates and to use turbidimetry to measure bacterial density. Samples (2.4 ml) were mixed with 0.1 ml 85% phosphoric acid before measuring absorbance at 450 nm (Mandl 1984 as modified by D. Kupka). The regression line ($r = 0.997$, $n = 11$) for calibration (A_{450} against cell numbers) yielded a slope of 8.55×10^{-10} ml per cell. The bacterial numbers based on A_{450} , measured with samples from different growth phases, were always in agreement with those obtained by microscopic cell counting using a Cyrus chamber.

ATP Determination

Cellular ATP in the cultures was determined using an ATP Biomass Kit HS (266-311, BioThema AB, Handen, Sweden). Bioluminescence intensity was measured as relative luminescence units (RLU) using a Junior LB 9509 luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany). The ATP assay mixture contained a bacterial sample and the following kit components: luciferase and luciferin, buffer, ATP extractant and ATP standard. Aliquots of 50 μ l samples from the cultures grown with ferrous iron (diluted 300-fold) were mixed with the kit components to a total volume of 500 μ l of the ATP assay mixture. Residual sulfur in samples of sulfur-oxidizing cultures was sedimented by gravity settling for 1 min (Ceskova et al. 2002) prior to the ATP assay to keep correlation between the turbidimetrically obtained cell numbers and RLU.

The maximum number of attached bacteria during the active growth phase was about 5% of the total cell numbers, as determined by Ceskova et al. (2002). Aliquots of 20 μ l samples (diluted 50-fold) were mixed with the kit components to a total volume of 200 μ l of the ATP assay mixture. To determine extracellular ATP, distilled water was substituted for the extractant in the ATP assay mixture. To determine the cellular ATP, RLU was measured before and after the addition of an

internal ATP standard. The protocol to obtain RLU of the diluted sample took about 30 s.

The determination limit of RLU was expressed as $10 \times SD_0$, where SD_0 is the standard deviation ($n = 30$) of a blank determination (substitution of the bacterial sample with water). The efficiency of ATP extraction under standard conditions at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ was evaluated using two ways: (i) the bacterial cells were treated with kit extractant at 100°C for 2 min in closed Eppendorf tubes (Hoffner et al. 1999), and (ii) the extractant was substituted with 10% trichloroacetic acid (TCA) (Lundin 2000).

Results

ATP Extraction and Inhibitory Effects

The mean levels (\pm SD) of ATP calculated from triplicate samples of bacteria grown with elemental sulfur were 0.107 ± 0.013 , 0.098 ± 0.014 and 0.0903 ± 0.0073 pmol per reaction mixture using extraction under the standard conditions, at 100°C , and with TCA, respectively. The differences between the means were insignificant ($P > 0.05$). Extending the time course of extraction for up to 5 h did not increase the recovery of ATP.

The nutrient media used for *A. ferrooxidans* are acidic and include substrates that completely inhibited the luciferase activity, although the ATP assay mixture was buffered and the sample represented only 1/10 of the total volume. Samples of culture media at different pH values did not significantly impact the luciferase activity between pH of 6 and 1.8. The IC₅₀ was detected at pH 1.5. A pH 1.4 sample completely inhibited the luciferase activity (data not shown). The IC₅₀ values for ferrous iron, ferric iron and elemental sulfur were 0.62, 0.22 and 0.78 mM, respectively. The inhibitory effects were reduced to negligible levels by diluting the elemental sulfur-oxidizing bacteria (SOB) and iron-oxidizing bacteria (IOB) samples by 50- and 300-fold, respectively.

Cellular ATP and Determination Limit

The sensitivity of ATP determination in different samples may be a general problem in ATP assays. The ATP kit instructions indicate that the volume of an internal ATP standard (100 nM stock) added to the sample should always be 10 μ l (i.e., 1 pmol), and the RLU should be at least 10-fold higher after the internal standard addition. In this study, lower additions of the internal standard had to be used to obtain sensitive responses with low ATP levels because of low bacterial numbers in the samples. Aliquots of 1 μ l (0.1 pmol) undiluted standard and 1 μ l of 10-fold diluted standard (0.01 pmol) were used for the SOB and IOB samples, respectively.

Figure 1 shows the result for SOB, including a calibration plot of RLU against the cell number. Similar RLU responses were achieved with IOB samples (data not shown). The additions of 10 μ l internal standards resulted in responses that were in parallel line with the abscissa (data not shown). In general, for unknown samples, the volume of the internal

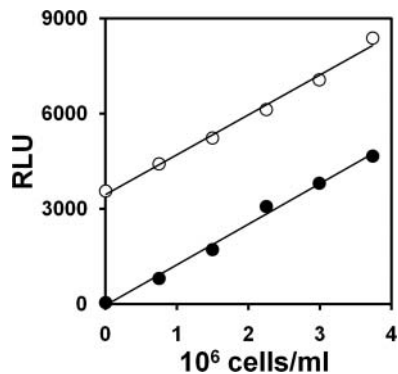


Fig. 1. Relationship between intensity of bioluminescence (expressed in relative luminescence units, RLU) and cell concentration in the ATP assay mixture with and without an internal ATP standard. Bacteria were grown aerobically on elemental sulfur until the culture lowered the pH from 4.0 to 1.5. Samples of bacterial cultures were diluted 50-fold with mineral salt medium, and the final dilution of the samples in the ATP assay mixture was 500-fold (●), $r = 0.997$. Subsequently, a $1 \mu\text{l}$ aliquot of the ATP standard (0.1 pmol) was added to each sample (○), $r = 0.996$. The difference between the slopes is insignificant ($P > 0.05$).

standard should be tested to optimize the sensitive response for the range of bacterial numbers in the culture.

The determination limits were 34 and 62 RLU in the ATP assay mixture for IOB and SOB, respectively. For the samples used to construct the calibration curves (e.g., Figure 1), the determination limits for bacterial numbers in the original cultures were 3.5×10^6 and 2.4×10^7 cells per ml for IOB and SOB (583 and 9600 cells per ATP assay mixture), respectively. These cell numbers are lower than the initial numbers following culture inoculation, underscoring the usefulness of ATP bioluminescence methodology for time course studies. The reason for higher values of determination limits expressed as cell counts and compared to the literature, is based on the high sample dilution and the criterion for the determination limit.

Oxidation of Ferrous Iron

Figure 2 shows the ATP results for an iron-oxidizing culture. Both the growth and iron oxidation over time were accompanied with an increase in ATP (as RLU) in the culture and cellular ATP changes. Therefore, the iron-unlimited growth phase could be documented by a linear relationship between RLU and cell growth (Figure 3A) to underline RLU as an indicator of cell growth and substrate oxidation. Depletion of ferrous iron upset this relationship and clearly separated this phase from active growth. The mean maximum ATP content per cell was determined from the phase of active growth. Based on the slope in Figure 3B, this value was 1.16 ± 0.41 amol ATP per cell (95% confidence interval). Figure 4A shows two phases of growth and iron oxidation.

The second phase was induced by additional ferrous iron following a stationary phase, which was caused by the depletion of ferrous iron. In response to the addition of ferrous iron,

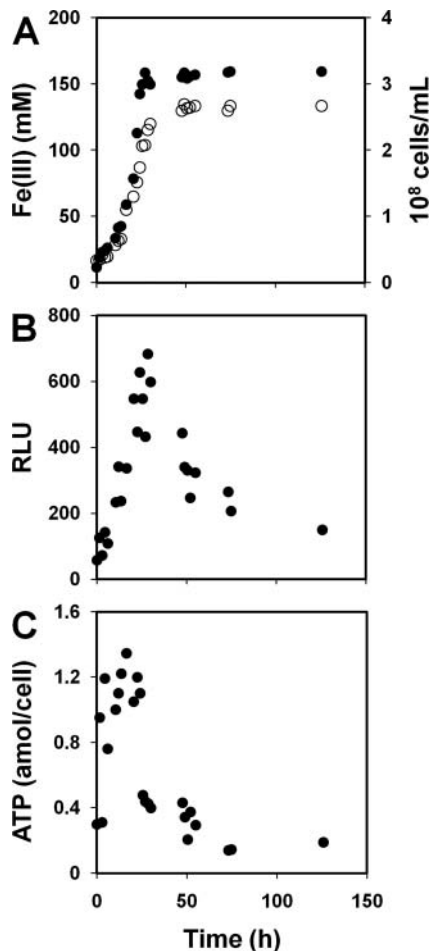


Fig. 2. A: Time course of iron oxidation by *A. ferrooxidans*. Ferric iron (●) and cell (○) concentrations in the culture. B: Intensity of bioluminescence in the culture (expressed in relative luminescence units, RLU, in the ATP assay mixture). C: Cellular ATP content.

the rates of growth and iron oxidation increased to the original levels. The intensity of RLU (Figure 4B) was in agreement with these changes. Thus, these data confirmed a close relationship between the time course of culture ATP levels, growth, and iron oxidation. Figure 4B also shows a level of extracellular ATP. The ATP values were lower than the determination limit. Therefore, within experimental error, extracellular ATP could be considered to be negligible during all those periods in Figure 4B. Similar results were obtained when the cells from the culture were removed by membrane filtration prior to ATP determination.

Oxidation of Elemental Sulfur

Figure 5 shows results for the elemental sulfur-oxidizing culture. The intensity of RLU and the cellular ATP content paralleled the lag phase, linear growth phase and stationary phase. Figure 6A shows a linear relationship between the intensity of RLU and cell growth. At 210 h (Figure 5), when the pH decreased to 1.2, the culture received additional elemental sulfur (1.5% w/v) and the pH was readjusted to 3.5. Although the

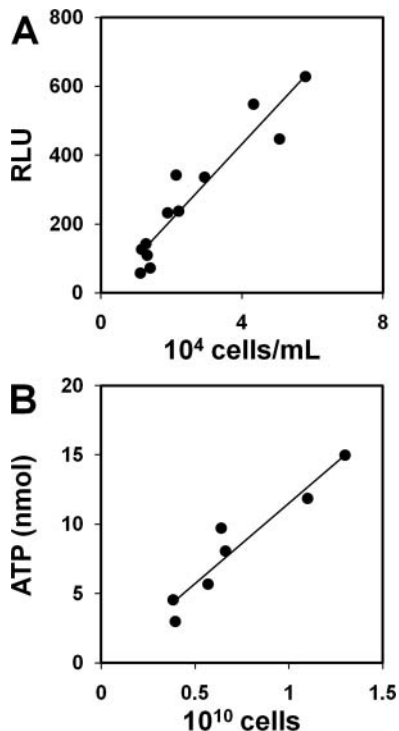


Fig. 3. A: Relationship between intensity of bioluminescence (expressed in relative luminescence units, RLU) and iron-oxidizing cell numbers in the ATP assay mixture, $r = 0.946$. B: Relationship between total amount of ATP and total cell number in the culture, $r = 0.954$. The data corresponded to the active growth phase (between the lag and stationary phases).

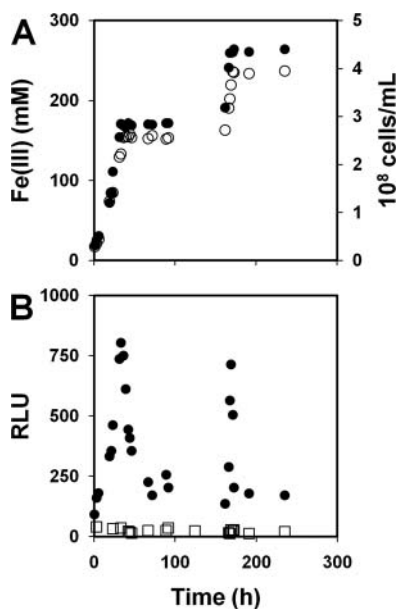


Fig. 4. Time course of iron oxidation by *A. ferrooxidans* in two phases. The second phase involved an addition of ferrous iron (90 mM) at 161 h. A: Ferric iron (●) and cell (○) concentrations in the culture. B: Intensity of bioluminescence in the culture (expressed in relative luminescence units, RLU, in the ATP assay mixture, ●) and the same without bacteria (extracellular ATP, □).

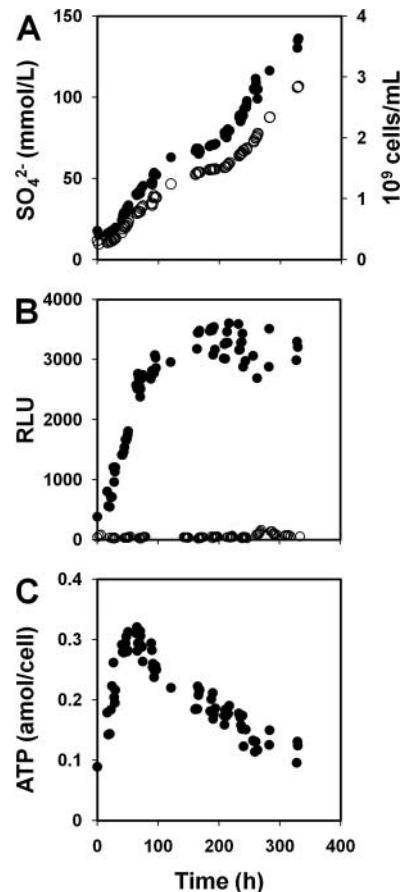


Fig. 5. Time course of elemental sulfur oxidation by *A. ferrooxidans*. A: Sulfate (●) and cell (○) concentrations in the culture. B: Intensity of bioluminescence in the culture (expressed in relative luminescence units, RLU, in the ATP assay mixture, ●) and the same without bacteria (extracellular ATP, ○). C: Cellular ATP content. After 210 h of incubation, the culture received additional sulfur (1.5% w/v) and pH adjustment from 1.2 to 3.5 after it had reached the stationary phase.

rates of resumed growth and sulfur oxidation subsequently increased to the preceding levels, the intensity of RLU did not increase in parallel but remained constant and the cellular ATP content continued in a downward trend (Figure 5C).

Further experiments showed that the above stationary phase was due to sulfuric acid inhibition instead of sulfur limitation. When the stationary phase culture was adjusted to the original pH without the sulfur addition, growth and sulfur oxidation resumed although the pH change affected the RLU values (data now shown), in agreement with the data in Figure 5B. Additional sulfur substrate, after the sulfur depletion occurred (pH maintained above 2), resulted in new growth and sulfur oxidation and the RLU increased as described with IOB (data not shown). Therefore, the increase of the pH of the culture was responsible for the observed cellular ATP decrease (Figure 5C).

The mean maximum ATP content per cell was determined from the first phase of active growth and sulfur oxidation. Based on the slope of the linear regression line (Figure 6B), this value was 0.327 ± 0.028 amol ATP per cell (95%

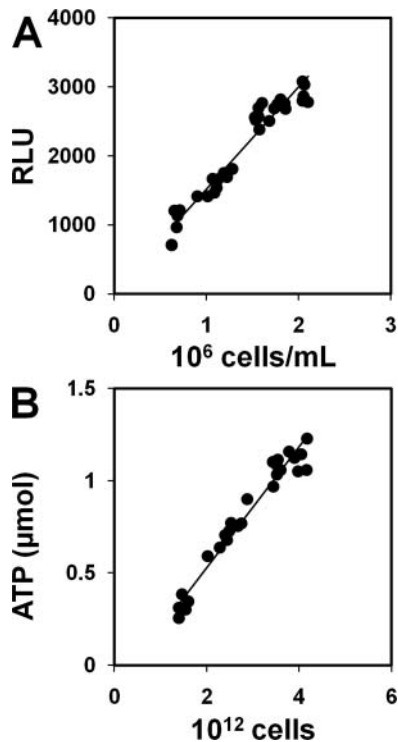


Fig. 6. A: Relationship between intensity of bioluminescence (expressed in relative luminescence units, RLU) and elemental sulfur-oxidizing cell numbers in the ATP assay mixture, $r = 0.969$. B: Relationship between total amount of ATP and total cell number in the culture, $r = 0.977$. The data are presented for the first period (26–96 h) of the active growth phase.

confidence interval). A similar value of 0.4 amol per cell for SOB under anaerobic conditions with ferric iron as the electron acceptor was determined (unpublished results). Extracellular ATP levels (Figure 5B) were negligible within experimental error and the determination limit. After a long-term culture incubation for up to 900 h, including repeated additions of elemental sulfur and pH adjustments, extracellular ATP was detected between 430 and 840 h. The RLU corresponding to extracellular ATP reached at the most 10% of the RLU value of the culture.

Discussion and Conclusions

The ATP Assay and Acidophilic Chemolithotrophs

The results of this study showed that the recovery of ATP using the kit extractant under the standard conditions was comparable to the sample boiling and TCA based extraction methods. The ATP assays for acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacteria are subject to inhibition due to acidity, iron and sulfur substrates, all of which inhibited luciferase activity. The inhibition has been a long-standing reason (Pronk et al. 1991) for the lack of application of the ATP-bioluminescence assay to monitor *A. ferrooxidans* cultures. Tsaplina et al. (2007) alleviated the inhibitory effects by separating the cells from media by

centrifugation. However, combined with sample storage, their results may not accurately represent the actual physiological ATP levels.

Harvesting of cells by membrane filtration followed by washing has also been used to eliminate inhibitory effects caused by liquid media and bioleaching solutions (Viedma 2007). However, all these treatments may cause varying losses of cellular ATP. In our study, the inhibitory sample components were resolved by dilution. Introducing the diluted sample directly into the ATP assay mixture alleviated these unknown variables and minimized the delay in measurement of physiological ATP levels and monitoring of *A. ferrooxidans* cultures under all substrate conditions. In addition, nontoxic precipitates do not interfere with the ATP assay to monitor growth. The sensitivity of the bioluminescence assay allowed sample dilution, except at very low cell counts, to the range of $\sim 10^3$ cells and subpicomol quantities of ATP per assay.

Comparison of these results with data published with other sample treatment protocols is impractical because of differences in sample matrix, pretreatment, and toxic constituents as well as criteria for determination limits. When only the RLU values are used to characterize biomass growth, it is especially important to reduce all inhibitory factors that may affect the assay. These may be variable during the process. To obtain the correct ATP content in the culture or per cell, the effects of inhibitory constituents and sample matrix were overcome by addition of the ATP standard into the sample. Although our study has been focused on *A. ferrooxidans*, it is apparent the same approaches may be applied to other acidophiles.

Differences in Oxidation of Iron and Elemental Sulfur

Ferrous iron and elemental sulfur represent the basic substrates characterizing *A. ferrooxidans* activity. Their oxidation is an important aspect of geomicrobiology of sulfide mineral environments.

Our results were used to determine ATP levels in IOB and SOB cultures and to obtain data on cellular ATP contents of bacteria. In the case of iron oxidation, the fast ATP assay was very useful as a tool to monitor growth. The RLUs were proportional to the substrate-unlimited growth and iron oxidation rates. The maximum cellular ATP content of iron-oxidizing bacteria was similar to the general value of about 2 amol ATP determined for unstressed bacterial cells (Lundin 2000). Efremenko et al. (2005) reported 270 amol ATP per cell for *A. ferrooxidans*, but no details were given regarding the substrate and physiological conditions, and the value appears to be overestimated. Our value is higher than 0.08 amol per cell determined by Okibe and Johnson (2011).

Different bacterial strains may account for large variations in cellular ATP contents, as Okibe and Johnson (2011) indicated for two strains of *Leptospirillum ferriphilum*. However, there are additional reasons for different ATP results. Our maximum value was obtained from a substrate-unlimited growth phase where the cellular ATP content was constant and the results were based on a frequent sampling schedule. In addition, the relatively low ATP content reported by Okibe and Johnson (2011) was measured for a cell suspension which

had been separated from substrate (pyrite, where iron may be considered as a dominant substrate) by centrifugation, which may cause leakage of cellular contents.

Okibe and Johnson (2011) showed a gradual decrease in numbers of viable *L. ferriphilum* cells following iron depletion, especially after several hours. The corresponding cellular ATP contents in viable cells were relatively stable during iron oxidation and depletion, equaling about 10^{-19} mol ATP per viable cell. Although the RLU values were used as a parameter for active biomass detection, characterizing the long phases of ferrous iron oxidation and depletion, the results were based on a limited number of experimental data points. It is, of course, plausible that endogenous metabolism following ferrous iron depletion sustains relatively high cellular ATP content.

However, our ATP data measured for samples near the end of active growth and beginning of iron limitation in *A. ferrooxidans* showed large changes in the RLU and cellular ATP contents and are not in agreement with the ATP values of endogenous metabolism. The data did not confirm that the changes were related to variation in total and viable biomass, although it was established that the number of viable cells decreased after an extended time course of ferrous iron depletion. Counting of colonies using selective overlay media (as described by Johnson and Hallberg 2007) did not indicate significant difference between total and viable cell numbers within the above short period of the active growth end and iron limitation beginning. This is in agreement with earlier data for *A. ferrooxidans* (Johnson et al. 2004). The different results in numbers of viable *L. ferriphilum* cells (Okibe and Johnson 2011) emphasize the cell viability differences due to species.

The large changes in bioluminescence intensity and cellular ATP content occurred although the number of bacteria did not change significantly during the above short period. Limitation by the substrate caused an intense decrease in the RLU (Figure 2B) and cellular ATP content (Figure 2C) within a few hours. The main decrease in RLU due to ferrous iron limitation (Figure 4B) took place within 3 h, whereas the parallel cell numbers were relatively constant. Similar results were obtained with a sulfur-oxidizing culture when colloidal elemental sulfur was added to a cell suspension which had been maintained without sulfur substrate for 3 days.

Following an initial short-term sulfur oxidation without changes in cell numbers, there was a relatively rapid increase in RLU (data not shown). The relationship between the cellular ATP and substrate oxidation is predictable. Substrate limitation also impacts the growth and cellular ATP. During the active growth phase the total and viable numbers are similar and substrate oxidation is coupled with energy transduction and ATP formation. The RLU values then can serve as an indicator of growth and substrate limitation to evaluate the growth curves easily.

In contrast to IOB where no culture pH increase is needed and the used pH decrease had no impact, the stationary phase SOB cells responded in a specific way after the pH increase. The pH adjustments, together with additional elemental sulfur to avoid substrate limitation, resulted in renewed growth and sulfur oxidation, but the cellular ATP did not reach the levels comparable to those preceding the stationary phase. Cellular ATP gradually decreased to about one third of the level

measured during the active growth phase. The physiological reason for this anomaly is not clear. Thus, the RLU intensity as a monitoring method may be limited to cultures in active growth and substrate oxidation phases that are not affected by external effects such as the pH increase.

The difference between the maximum cellular ATP contents in SOB and IOB was highly significant ($P < 0.01$). The low value for SOB may be the result of continual limitation by the sulfur substrate due to its low aqueous solubility (Ceskova et al. 2002). Similarly, the low value obtained for SOB under anaerobic conditions may also be the result of sulfur insolubility, causing substrate limitation.

From a practical standpoint, although different substrates may affect the maximum cellular ATP content, its constant value during the active growth phase was in good agreement with intensity of bioluminescence and cell growth and substrate oxidation, with the notable exception of SOB cultures under a different metabolic mode due to the culture pH adjustment. The successful application of bioluminescence intensity to monitor the basic growth curves in biogeochemical processes is a universal conclusion for both iron and sulfur-oxidizing cultures.

References

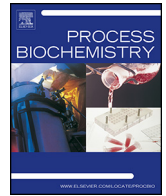
- Apel WA, Dugan PR, Tuttle JH. 1980. Adenosine 5'-triphosphate formation in *Thiobacillus ferrooxidans* vesicles by H^+ ion gradients comparable to those of environmental conditions. *J Bacteriol* 142:295–301.
- Bhatti TM, Bigham JM, Vuorinen A, Tuovinen OH. 2011. Weathering of biotite in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures. *Geomicrobiol J* 28:130–134.
- Bouchal P, Zdrahal Z, Helanova S, Janiczek O, Hallberg KB, Mandl M. 2006. Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics* 6:4278–4285.
- Ceskova P, Mandl M, Helanova S, Kasparovska J. 2002. Kinetic studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnol Bioeng* 78:24–30.
- Dopson M, Lindström EB, Hallberg KB. 2002. ATP generation during reduced inorganic sulfur compound oxidation by *Acidithiobacillus caldus* is exclusively due to electron transport phosphorylation. *Extremophiles* 6:123–129.
- Efremenko EN, Azizov RE, Makhlis TA, Abbasov VM, Varfolomeev SD. 2005. Determination of minimal concentrations of biocorrosion inhibitors by a bioluminescence method. *Appl Biochem Microbiol* 41:377–381.
- Hoffner SE, Jimenez-Misas CA, Lundin A. 1999. Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing. *Luminescence* 14:255–261.
- Janiczek O, Mandl M, Ceskova P. 1998. Metabolic activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on reduced sulfur compounds detected by capillary isotachopheresis. *J Biotechnol* 61:225–229.
- Johnson BD. 2010. The biogeochemistry of biomining. In: Barton LL, Mandl M, Loy A, editors. *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Dordrecht: Springer. p. 401–426.
- Johnson DB, Bruhn DF, Roberto FF. 2004. Survival of acidophilic bacteria under conditions of substrate depletion that occur during culture storage. In: Tsezos M, Hatzikioseyan A, Remoudaki E, editors. *Biohydrometallurgy; a Sustainable Technology in Evolution*.

- Zografou, Greece: National Technical University of Athens. p. 1195–1203.
- Johnson DB, Hallberg KB. 2007. Techniques for detecting and identifying acidophilic mineral-oxidizing microorganisms. In: Rawlings DE and Johnson DB, editors. *Bio-mining*. Heidelberg: Springer. p 237–262.
- Lundin A. 2000. Use of firefly luciferase in ATP related assay of biomass, enzymes and metabolites. *Meth Enzymol* 305:346–370.
- Mandl M. 1984. Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO₂ and O₂. *Biologia* 39: 429–434.
- Mandl M, Markova R, Lojek A. 2009. ATP measurements in iron-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv Mater Res* 71–73:275–278.
- Okibe N, Johnson DB. 2011. A rapid ATP-based method for determining active microbial populations in mineral leach liquors. *Hydrometallurgy* 108:195–198.
- Pokorna B, Mandl M, Borilova S, Ceskova P, Markova R, Janiczek O. 2007. Kinetic constant variability in bacterial oxidation of elemental sulfur. *Appl Environ Microbiol* 73:3752–3754.
- Pronk T, Liem K, Bos P, Kuenen JG. 1991. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 57:2063–2068.
- Tsaplina IA, Zhuravleva AE, Ismailov AD, Zakharchuk LM, Krasil'nikova EN, Bogdanova TI, Karavaiko GI. 2007. The dependence of intracellular ATP level on the nutrition mode of the acidophilic bacteria *Sulfobacillus thermotolerans* and *Alicyclobacillus tolerans*. *Microbiology* 76:654–662.
- Venkateswaran K, Hattori N, La Duc MT, Kern R. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J Microbiol Meth* 52:367–377.
- Viedma P. 2007. Method for detecting presence of acidophilic microorganisms in bioleaching solution. U.S. Patent No. 7851177.

Příloha II

Cellular ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Pakostova, E., Mandl, M., Tuovinen, O.H., 2013. *Process Biochemistry* 48, 1785-1788.



Short communication

Cellular ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Eva Pakostova^a, Martin Mandl^{a,*}, Olli H. Tuovinen^b^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, 61137 Brno, Czech Republic^b Department of Microbiology, Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2013

Received in revised form 28 July 2013

Accepted 31 July 2013

Available online 12 August 2013

Keywords:

Acidithiobacillus ferrooxidans

ATP

Attached bacterial cells

Cellular carbon

Sulfur oxidation

ABSTRACT

This study demonstrates differences in ATP levels between attached and planktonic cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans* growing with elemental sulfur. A small fraction of 3.7–14.4% of the bacterial cells was attached to the sulfur particles. The highest cell attachment of 14.4% was at the end of the lag phase, decreasing to 3.7% into the latter part of the active growth phase. Therefore, attached cells and their ATP content made a minor contribution to the total culture biomass in the active growth phase. However, the cellular ATP content was 1.01 amol per attached cell and 0.34 amol per planktonic cell. The significantly ($P < 0.01$) lower ATP content was attributed to sulfur limitation in the planktonic cells. These results suggest that a negligibly small subpopulation may be a link in cooperative interaction whereby sulfur oxidation by attached cells under boundary conditions provides bioavailable substrates to planktonic cells in the population.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In bioleaching processes, *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizes elemental sulfur, an intermediate in the oxidation of many sulfide minerals. The roles of planktonic and attached cells of *A. ferrooxidans* and other sulfur-oxidizing acidophiles in the oxidation of elemental sulfur have relevance in the bioleaching of sulfide ores because of the central role of oxidative and reductive reactions of sulfur in the transformations and dissolution of sulfide minerals [1,2]. Although the proportion of attached cells is usually relatively low in cultures growing with elemental sulfur, their metabolism is believed to make an important contribution during bacterial attack on this solid substrate [3,4]. The role of attached cells in elemental sulfur conversion to soluble forms such as colloidal S and sulfoxyanions has been previously discussed [5]. Planktonic and attached cells are subject to different kinetic constraints when growing with a solid substrate such as elemental sulfur. In contrast to planktonic cells, the fraction attached to elemental sulfur may not be subject to similar substrate limitation. In general, however, there is not much information on such kinetic differences in *A. ferrooxidans*. Changes in cellular ATP levels have been analyzed in *A. ferrooxidans* cultures growing with ferrous iron and elemen-

tal sulfur as substrates [6]. Cellular ATP has been extensively used as a measure of biomass formation in numerous microorganisms [7]. Okibe and Johnson [8] applied the luciferin-luciferase ATP bioluminescence assay for monitoring active acidophilic bacteria in bioleaching solutions. Data on cellular ATP levels in sulfur-attached *A. ferrooxidans* have not been reported, although bacterial growth on elemental sulfur particles has been measured in terms of ³²P incorporation [9] and microscopic counts [10]. Protocols for detachment of cells from sulfur particles by treatment with CS₂ have also been developed [10,11]. The purpose of this study was to perform a comparative analysis of cellular ATP content and biomass of attached and planktonic *A. ferrooxidans* growing with elemental sulfur. Cellular ATP was used as a tool to analyze the attached and planktonic cells of *A. ferrooxidans* culture because the method is sufficiently sensitive to differentiate between their ATP pools. Combined with determination of cellular biomass, it is now possible to define the contribution of sulfur-attached cells to the overall biomass and to demonstrate that attached cells, in contrast to planktonic cells, are not affected by limitation of the sulfur substrate.

2. Materials and methods

A. ferrooxidans (CCM 4253) was grown with 2% (w/v) elemental sulfur (sulfur extra pure, Riedel-deHaën, Seelze, Germany, obtained from Sigma–Aldrich, Product Number 13803). The mean particle diameter was 10.1 μm (information kindly provided by Dr. Daniel Kupka using Multisizer™ 4 Coulter Counter, Beckman) in mineral salts medium (MSM) that contained (per L) 0.2 g (NH₄)₂SO₄, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, and 0.127 g CaCl₂. The cultures were grown in a 5 L bioreactor with stirring and agitation (agitation speed 300 rpm, air flow rate 1.5 L/min) at 28 °C

* Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 549495728.

E-mail addresses: 150560@mail.muni.cz (E. Pakostova), mandl@chemi.muni.cz (M. Mandl), Tuovinen.1@osu.edu (O.H. Tuovinen).

and at initial pH about 4 as previously described [12]. Elemental sulfur oxidation was monitored by analysis of sulfate concentration over time by capillary isotachophoresis [13]. Planktonic cell numbers were determined turbidimetrically [5]. The number of attached cells was determined by microscopic cell counts using a Cyrus chamber after decantation of planktonic cells, washing the suspended solids with MSM (re-adjusted to the actual pH of the culture), and vortexing for 5 min to release sulfur-attached cells [14,15]. ATP was extracted from cell samples and the bioluminescence intensity as a function of ATP concentration was determined as described previously [6]. Measurement of total organic carbon (TOC) was also used to determine biomass concentration of attached cells. Aliquots (500 μ l) of five parallel, homogenized culture samples were analyzed in triplicate using a Multi N/C 2100 analyzer (Analytik Jena, Jena, Germany). Where necessary, samples of elemental sulfur were dried at 50 °C for 12 h.

The growth with elemental sulfur usually results in a pH decrease to about 1.0–1.1, at which point the increased acidity becomes almost completely prohibitive to sulfur oxidation. The inhibitory effect is noticeable below pH 1.6. The inhibition increases with acidity and affects the cellular ATP content. In this study, the time course of the bioreactor culture was sampled during the active growth phase between pH 4.0 and 1.6. At this range, the pH was not inhibitory and the cellular ATP content was constant.

3. Results and discussion

Fig. 1A and B shows sulfate formation and changes in bioluminescence intensity during sulfur oxidation by *A. ferrooxidans*. Both parameters were proportional to cell growth in the active phase, which was linear with sulfur as the substrate, as previously reported [6]. The bioluminescence intensities are shown separately for planktonic cells and total population in Fig. 1B. Within experimental error, no major difference in bioluminescence intensity was detected between planktonic cells and the total population of cells, indicating a negligible contribution from the attached cells to the measured total ATP content in the culture. Therefore, neither bacterial attachment nor detachment has fundamental impact on the total ATP data. When normalized to individual cells, the results are contrastingly different, however. Fig. 1C shows the cellular ATP content normalized to individual planktonic and attached cells. For this analysis, cells were sampled from the culture during the active growth phase, in which the maximum cellular ATP content was observed [6]. These values were 1.01 ± 0.21 and 0.34 ± 0.05 amol ATP per cell (mean \pm SD) for the attached and planktonic bacteria, respectively. This difference was highly significant ($P < 0.01$). The mean ATP content of planktonic cells is in agreement with data for multiple subcultures of sulfur-oxidizing *A. ferrooxidans*. The ATP content of attached cells is comparable to 1.16 amol ATP per cell determined for *A. ferrooxidans* oxidizing Fe^{2+} as energy source [6]. Thiosulfate oxidation, which partially involves cell attachment after elemental sulfur is formed as an intermediate, yielded 0.63 ± 0.12 amol ATP per cell (unpublished data). The differences between this value for the thiosulfate grown cells and those for the sulfur grown cells (1.01 and 0.34 amol ATP per attached and planktonic cell, respectively) were significant ($P < 0.05$). The value of 0.63 amol ATP per cell is also significantly lower than 1.16 amol ATP per cell for iron-grown cultures [6]. The change from soluble thiosulfate to insoluble sulfur substrate, and back to soluble upon further oxidation of intermediate elemental sulfur by predominantly planktonic cells, can decrease the cellular ATP content in the overall biochemical energy balance. As expected, the ATP levels for thiosulfate grown cells are lower as opposed to cells oxidizing fully soluble iron substrate and attached cells oxidizing elemental sulfur, and higher than the ATP value for planktonic cells oxidizing elemental sulfur.

We hypothesize that the 3-fold higher cellular ATP content of the attached cells resulted from the surface microniche conditions where cells oxidize sulfur. Based on the very low aqueous solubility of elemental sulfur and linear oxidation kinetics, Ceskova et al. [5] concluded that planktonic cells are dominant in the culture but are limited by available substrate because they are dependent on soluble or colloidal intermediates that the attached cells produce upon

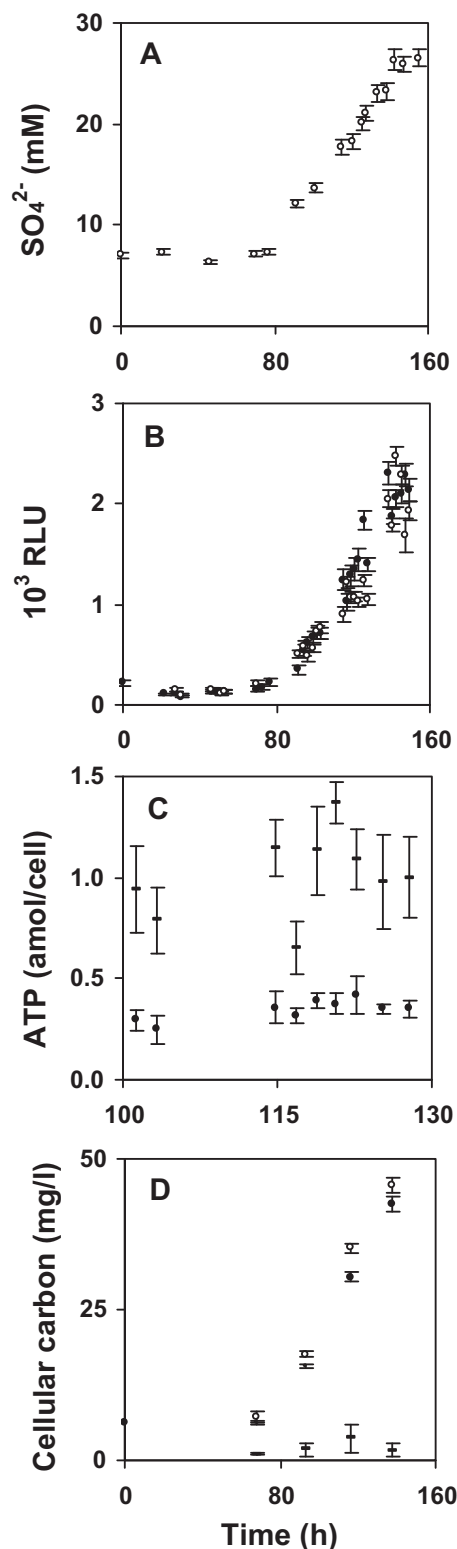


Fig. 1. Time course of elemental sulfur oxidation by *A. ferrooxidans*, measured as changes in (A) sulfate formation by total biomass over time and (B) bioluminescence expressed as relative luminescence units in the ATP assay mixture. Symbols: \circ , total cells; \bullet , planktonic cells. (C) Cellular ATP content in attached (\circ) and planktonic (\bullet) cells. (D) Concentration of cellular carbon (TOC) of total (\circ), planktonic (\bullet), and attached (\circ) cells, 1 mg TOC = 1.25×10^{10} cells. Cellular ATP data are shown for the main part of the active growth phase. Standard deviations are indicated with vertical bars and if not shown, are smaller than the size of the symbol.

elemental sulfur oxidation. Thus, by comparison with planktonic cells, the activity of attached cells may not be subject to a similar substrate limitation because sulfur compounds are abundantly available at the solid/liquid interface of the sulfur. Metabolism associated with this interfacial flux of S-compounds can increase the cellular ATP content to the extent that it is comparable with iron-oxidizing cells [6]. Thus the previously observed sulfur limitation [5] may explain the multi-fold differences in cellular ATP contents.

Hong and Brown [16] reported that when attached to glass beads the cellular ATP content of *Escherichia coli* and *Bacillus brevis* increased two to five times as compared to planktonic cells. The authors hypothesized that the charge regulation effect resulted in an increase in local H⁺ concentration between the cell and the negatively charged surface, thus increasing the proton motive force and the cellular ATP level. A direct comparison with our results is, however, not possible because of numerous metabolic and experimental differences such as chemolithotrophic vs. chemoorganotrophic physiology and biochemistry, media, pH, and surface properties of sulfur substrate vs. inert glass beads. *A. ferrooxidans* is an extreme acidophile, thriving in environments with high concentrations of H⁺. The proton motive force is coupled to energy transduction in both attached and planktonic cells in highly acidic solution with no apparent or specific link to cellular attachment. The above hypothesis formulated for the two chemoorganotrophs does not seem to apply to these acidophiles.

The planktonic and attached cells in four representative culture samples were separated and analyzed for TOC (Fig. 1D). The TOC data had a low experimental error and resolved significant differences ($P < 0.05$) between planktonic and total cells. Such significant differences were not observed between the corresponding bioluminescence data for total and planktonic cells (Fig. 1B). In addition, the sum of the planktonic TOC plus the TOC of the attached cells was in agreement with the TOC of the total population (Fig. 1D). Attached cells represented 14.4, 10.4, 10.4 and 3.7% of total TOC in the four samples retrieved from the sulfur-oxidizing culture (Fig. 1D). The average value of about 10% for attached cells corresponds to the data reported previously for *A. ferrooxidans* [10] and *A. thiooxidans* [11] growing with sulfur. An estimate of about 5% cell attachment was previously reported for sulfur-grown cultures of *A. ferrooxidans* [5].

In general, experimental errors in cell counts may be much higher than 10%, but this problem was alleviated by resorting to high precision TOC analysis in the present study. This made it possible to distinguish planktonic cells from the total biomass, although the total TOC was quite close to the planktonic cell TOC during the active growth. The amount of attached biomass in sulfur-growing cultures constitutes a small fraction and its contribution to the total biomass amount can be ignored for practical considerations.

When the numbers of attached cells per g sulfur (Fig. 1D) were compared with each other, the differences were insignificant ($P > 0.05$). The mean value was 0.23 ± 0.06 mg cellular C (as TOC) per g sulfur, which corresponds to $2.85 \pm 0.68 \times 10^9$ (mean \pm SD) attached cells per g sulfur using our conversion factor of 1 mg TOC = 1.25×10^{10} cells. A value of 1.4×10^9 attached cells per g sulfur was reported by Harneit et al. [3]. For reference, Konishi et al. [10] reported maximum sorption of 4.9×10^{10} cells per g sulfur for *A. ferrooxidans*, which may be an overestimate.

In conclusion, the difference in the cellular ATP content is attributed to fewer metabolic constraints in attached cells because they oxidize elemental sulfur via soluble (possibly colloidal) sulfur intermediates under boundary conditions. By contrast, planktonic cells compete with attached bacteria for soluble intermediates, and

this competition in substrate oxidation, previously observed in the sulfur-oxidizing *A. ferrooxidans* culture, may affect the energetic state of planktonic cells. Similar growth analyses with ATP data for sulfur-grown *A. ferrooxidans* have not been previously reported in the literature. Because of the low proportion of attached cells in the actively growing culture, and allowing for experimental error, the numbers of planktonic cells are almost comparable to total population. Although cellular attachment to sulfur has a negligible impact on the total biomass amount as well as total ATP content in the active culture, our study showed that the planktonic and attached cells in our culture differed with respect to substrate oxidation. Attached cells had significantly higher ATP levels as opposed to planktonic cells.

These results support the concept that attached bacteria are the first to oxidize the sulfur substrate without sulfur limitation and this takes place under boundary conditions, while planktonic cells are contingent on the preceding first step in the oxidative pathway. These findings emphasize the importance of the cellular contact by a small fraction of population with solid substrate for initial attack and contribute to physiological characterization of sulfur-oxidizing bacteria that take part in elemental cycles and environmental bioprocesses including the bioleaching of sulfide minerals. Whether differential ATP contents of cells apply to sulfide mineral oxidation by *A. ferrooxidans* is difficult to predict because, for example, pyrite and chalcopyrite represent a mixed substrate and the complex oxidation can proceed via boundary contact or indirect, Fe³⁺-mediated pathway or their combination through a cooperative interaction [17].

Acknowledgement

This work was supported by Grant no. 525/08/0697 from the Czech Science Foundation.

References

- [1] Rohwerder T, Sand W. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences* 2007;7:301–9.
- [2] Fazzini RAB, Corte MP, Padilla L, Maturana D, Budinich M, Maass A, et al. Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 2013;110:2242–51.
- [3] Harneit K, Göksel A, Kock D, Klock JH, Gehrke T, Sand W. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 2006;83:245–54.
- [4] Loser C, Zehnsdorf A, Gorsch K, Seidel H. Bioleaching of heavy metal polluted sediment: kinetics of leaching and microbial sulfur oxidation. *Engineering in Life Sciences* 2005;5:535–49.
- [5] Ceskova P, Mandl M, Helanova S, Kasparovska J. Kinetic studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 2002;78:24–30.
- [6] Pakostova E, Mandl M, Omesova Pokorna B, Diviskova E, Lojek A. Cellular ATP changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures oxidizing ferrous iron and elemental sulfur. *Geomicrobiology Journal* 2013;30:1–7.
- [7] Lundin A. Use of firefly luciferase in ATP related assay of biomass, enzymes and metabolites. *Methods in Enzymology* 2000;305:346–70.
- [8] Okibe N, Johnson DB. A rapid ATP-based method for determining active microbial populations in mineral leach liquors. *Hydrometallurgy* 2011;108:195–8.
- [9] Espejo RT, Romero P. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Applied and Environment Microbiology* 1987;53:1907–12.
- [10] Konishi Y, Takasaka Y, Asai S. Kinetics of growth and elemental sulfur oxidation in batch culture of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* 1994;44:667–73.
- [11] Konishi Y, Asai S, Yoshida N. Growth kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the surface of elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61:3617–22.
- [12] Pokorna B, Mandl M, Borilova S, Ceskova P, Markova R, Janiczek O. Kinetic constant variability in bacterial oxidation of elemental sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 2007;73:3752–4.
- [13] Janiczek O, Mandl M, Ceskova P. Metabolic activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on reduced sulfur compounds detected by capillary isotachopheresis. *Journal of Biotechnology* 1998;61:225–9.

- [14] Southam G, Beveridge TJ. Enumeration of *Thiobacilli* within pH-neutral and acidic mine tailings and their role in the development of secondary mineral soil. *Applied and Environmental Microbiology* 1992;58:1904–12.
- [15] Escobar B, Godoy I. Enumeration of *Acidithiobacillus ferrooxidans* adhered to agglomerated ores in bioleaching processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2002;18:875–9.
- [16] Hong Y, Braun DG. Variation in bacterial ATP level and proton motive force due to adhesion to a solid surface. *Applied and Environmental Microbiology* 2009;75:2346–53.
- [17] Kawashima Y, Li N, Li J, Chandra AP, Gerson AR. A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite. *Advances in Colloid and Interface Science* 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.03.004>.

Příloha III

Critical values of the volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen concentration that prevent oxygen limitation in ferrous iron and elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Mandl, M., Pakostova, E., Poskerova, L., 2014. Hydrometallurgy 150, 276-280.



Critical values of the volumetric oxygen transfer coefficient and oxygen concentration that prevent oxygen limitation in ferrous iron and elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[☆]



Martin Mandl^{*}, Eva Pakostova, Lenka Poskerova

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Available online 28 September 2014

Keywords:

Acidithiobacillus ferrooxidans

Aeration

Oxygen limitation

Volumetric oxygen transfer coefficient

ABSTRACT

Biochemical and biotechnological aspects of aeration conditions in iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures were studied. The critical values of volumetric oxygen transfer coefficient, $(k_{La})_{crit}$, and oxygen concentration, C_{crit} , were used to define the conditions necessary for minimum aeration and to eliminate potential oxygen limitation during substrate oxidation by the model bioleaching culture. The Michaelis constants for oxygen were 1.07 and 0.61 $\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ for the oxidation of ferrous iron and elemental sulfur, respectively. The C_{crit} values, below which oxygen limitation may occur, were 6.250 and 3.125 $\mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$, determined in respirometric experiments for the oxidation of ferrous iron and elemental sulfur, respectively. The rates of iron and sulfur oxidation were also determined at the C_{crit} values by measuring the formation of ferric iron and protons in the corresponding cell suspensions. Neither iron nor sulfur oxidation was limited by oxygen at C_{crit} . The $(k_{La})_{crit}$ values required to maintain oxygen-unlimited oxidation of ferrous iron and elemental sulfur were 7.70 and 4.88 h^{-1} , respectively.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) is a robust and commonly used parameter for the characterization of aeration conditions in bioreactors (Doran, 1995; Noorman, 2006). It is also widely analyzed and discussed as an aeration parameter in bioleaching processes (Boon and Heijnen, 1998; Petersen, 2010a). The $(k_{La})_{crit}$ is a system parameter and represents a critical value of the volumetric oxygen transfer coefficient, corresponding to the minimum aeration necessary in the bioreactor to maintain substrate oxidation without oxygen limitation. The $(k_{La})_{crit}$ value is constant for specific bioreactor properties under steady-state physical conditions, and provides information for the minimum aeration under defined respiration rate and specific bioreactor conditions. During growth, the culture in the bioreactor increases its total (volumetric) respiration and substrate oxidation rate and thus the corresponding oxygen demand. The highest requirement of oxygen supply is connected with the phase of the fastest respiration rate in the bioreactor. If the $(k_{La})_{crit}$ is used as a defined parameter of the minimum aeration conditions, its specific value should cover all the culture phases

to guarantee the oxygen-unlimited substrate oxidation. As the $(k_{La})_{crit}$ expresses the minimum aeration conditions during the maximum respiration rate in the culture, bacterial cells under aeration at $(k_{La})_{crit}$ can oxidize ferrous iron or elemental sulfur without oxygen limitation throughout all phases of the culture. The critical dissolved oxygen concentration (C_{crit}) is useful for characterization of oxygen demand and the corresponding minimum aeration intensity. It is defined as the lowest oxygen concentration that does not limit the rate of bacterial respiration. In contrast to the k_{La} , the C_{crit} value reflects biochemical properties of the bacteria. In addition, it is dependent on the substrate but not on culture conditions. Ideally, the C_{crit} in the culture should correspond to the minimum aeration at $(k_{La})_{crit}$.

Bioleaching of metal sulfides using acidophilic chemolithoautotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacteria (Dopson and Johnson, 2012; Johnson, 2010; Vera et al., 2013) is dependent on oxygen supply, although anaerobic oxidation of elemental sulfur to sulfuric acid may also occur (Kucera et al., 2012a; Kucera et al., 2012b; Osorio et al., 2013). The effect of oxygen is usually determined in bioleaching media containing finely ground sulfide minerals at various pulp densities (Bailey and Hansford, 1993; Boon and Heijnen, 1998; Boon et al., 1992; Crundwell, 2000; Devci et al., 2003; Seidel et al., 2006). Suspended solids (with attached bacteria) represent additional diffusion barriers affecting oxygen transfer. For example, 5–15% pulp densities of a low-grade polymetallic ore were shown to have a negative effect on the volumetric oxygen mass transfer coefficient and thus on biological iron oxidation (Zokaei-Kadijani et al., 2013). This effect was also observed in the bioleaching of a pyritic gold

[☆] This work is dedicated to the memory of Professor Dušan Hal'ama (Slovak University of Technology), a valued mentor and an outstanding human being.

^{*} Corresponding author at: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 61137 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 549495728; fax: +420 549492690.

E-mail address: mandl@chemi.muni.cz (M. Mandl).

ore at 10% pulp density, which resulted in limitation of iron oxidation at $1.2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ (Sun et al., 2012). In general, oxygen levels below $1\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$ seem to adversely affect iron oxidation activity of bacteria in the presence of suspended, finely ground sulfide minerals (Deveci et al., 2003). Cultures of acidophilic bacteria with ferrous iron and elemental sulfur as the substrates represent the standard conditions for determining oxygen demand and oxygen limitation without additional diffusion barriers such as sulfide minerals as suspended solids. From a practical point of view, bacterial oxidation of iron is of fundamental importance in the bioleaching of sulfide minerals. This takes place optimally in stirred tank bioreactors and less intensively in heaps and dumps (Jadhav et al., 2013; Johnson, 2010).

Elemental sulfur is readily oxidized by sulfur-oxidizing acidophiles to sulfuric acid (Fazzini et al., 2013). It is also an intermediate in the oxidative pathway of inorganic sulfur compounds including many sulfide minerals. Because both elemental sulfur and ferrous iron can be substrates for bacteria in bioleaching processes, the oxygen demand and limitation in their oxidation are important parameters in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures.

Autotrophic growth of acidophilic bacteria requires carbon dioxide and limitation due to CO_2 supply has been demonstrated (Bastias and Gentina, 2010; Boon and Heijnen, 1998; Deveci et al., 2003; Mandl, 1984; Petersen, 2010b; Petersen et al., 2010). Substrate oxidation by acidithiobacilli is dependent on oxygen availability and may involve oxygen uptake by non-growing cells that do not assimilate CO_2 . Substrate oxidation uncoupled from CO_2 assimilation may appear at very low pH values (Penev and Karamanev, 2010) but more typically under exclusion of CO_2 , growth inhibition, or lack of nutrient ions (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2008; Mandl et al., 1996; Nemati and Harrison, 2000).

The purpose of this study was to define the minimum aeration conditions by the critical volumetric oxygen transfer coefficient $(k_{\text{L}a})_{\text{crit}}$ and critical oxygen concentration C_{crit} for ferrous iron- and sulfur-oxidizing acidithiobacilli. Only the oxygen limitation was considered in this study without relation to cell growth because oxygen availability, compared to CO_2 , can have considerably greater effects on substrate oxidation and bioleaching processes. As the rate of aeration plays a significant role in the cost of bioleaching (Sreekrishnan and Tyagi, 1996), defining the minimum aeration conditions also has practical and economical consequences.

2. Experimental

2.1. Bacterial strain, growth conditions and resting cell suspensions

A. ferrooxidans strain CCM 4253 was used in this study. This strain was originally isolated from acid mine water from an abandoned mine (Zlaté Hory, Czech Republic) and was shown to be highly related (100% sequence identity) to the type strain ATCC 23270 of *A. ferrooxidans* by 16S rRNA gene sequencing (GenBank EF465493, Pokorna et al., 2007). Culture conditions for growth on ferrous iron and elemental sulfur have been previously described (Pakostova et al., 2013a), which provided standard batch cultures based on usual culture media and conditions. Respiration measurements in the iron- and sulfur-oxidizing cultures were made at a culture phase with maximum respiration rate (Ceskova et al., 2002; Mandl, 1984). For the determination of iron- and sulfur-oxidizing activities of bacteria in a bioreactor, cultures were harvested by centrifugation (6500 g, 30 min). Bacteria from the iron-oxidizing culture were resuspended in water acidified with sulfuric acid to pH 1.9. The final cell number in the suspension was 4×10^8 per ml, with an initial ferrous iron concentration of 89.5 mM. Bacteria from the sulfur-oxidizing culture were harvested using the same centrifugation protocol. The sediment with bacteria and elemental sulfur particles (a physiological substrate present in excess) was resuspended in

water acidified with sulfuric acid to pH 4. The final cell number in the suspension was 4×10^9 per ml.

2.2. Experimental procedures

The values of volumetric oxygen uptake rate (Q) and C_{crit} in the standard culture oxidizing ferrous iron or elemental sulfur were determined at 26°C using a Clark-type oxygen electrode (Electrofact, Netherlands) in a closed 20-ml chamber with magnetic stirring.

C_{crit} was determined based on the oxygen uptake by bacterial cultures that were not limited by the substrate. The C_{crit} value was related to the point where a linear decrease in the concentration of dissolved oxygen (C), corresponding to the maximum Q , changed to a nonlinear trend, indicating the beginning of oxygen limitation. This point was determined as an intercept of two regressed lines. For the linear portion, the decrease of C over time was regressed as a linear line (from 12 to $4 \mu\text{M}$ for the iron-oxidizing culture, $r = 0.97$, and from 7 to $2 \mu\text{M}$ for the sulfur-oxidizing culture, $r = 0.96$; see Fig. 1). For the nonlinear portion, the initial decrease of C over time (from 4 to $2 \mu\text{M}$ for the iron-oxidizing culture, and from 2 to $0.5 \mu\text{M}$ for the sulfur-oxidizing culture, see Fig. 1) was fitted to a linear function using linear regression, $r = 0.91$ and 0.88 for the iron- and sulfur-oxidizing cultures, respectively. The intercept of the two regression lines provided a value of C between the linear and nonlinear parts of the time course at a very low oxygen concentration. A two-fold higher oxygen concentration was taken as C_{crit} to avoid underestimation. This value also corresponded to a very low oxygen concentration but was detected with certainty within the linear portion of the time course of oxygen uptake.

The Michaelis constant for oxygen (K_{m}) was evaluated in the bacterial suspension based on the experimental data used for the C_{crit} determination. The value of K_{m} was determined in triplicate by fitting the experimental data (Q as a function of C) to the Michaelis–Menten equation using nonlinear regression (Microcal Origin, version 8.0). Q was calculated as dC/dt using numerical derivation of data in Fig. 1. The conditions for minimum aeration were characterized using $(k_{\text{L}a})_{\text{crit}}$. Eq. (1) describes the saturation of the cell suspension with atmospheric oxygen, which occurs concurrently with oxygen uptake by the bacteria (Doran, 1995):

$$dC/dt = k_{\text{L}a}(C^* - C) - Q \quad (1)$$

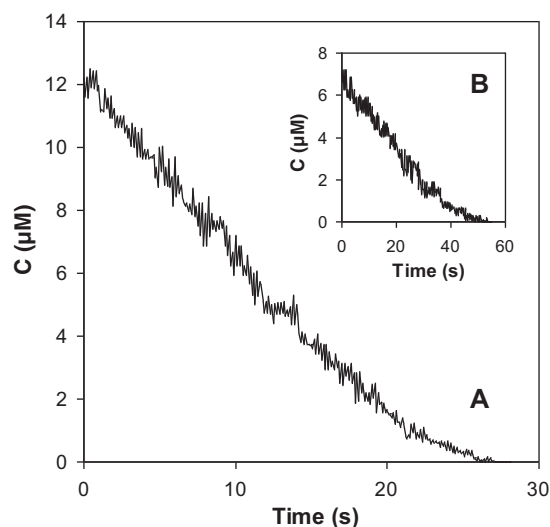


Fig. 1. Oxygen concentration time course of an *Acidithiobacillus ferrooxidans* culture respiring either on ferrous iron (A) or elemental sulfur (B) in a closed Clark electrode chamber.

where t is time, and C^* is the saturated dissolved oxygen concentration. At steady-state, $dC/dt = 0$, and Q is defined as

$$Q = k_L a (C^* - C') \quad (2)$$

where C' is the dissolved oxygen concentration at the steady-state conditions. After substitution of C' by C_{crit} , $(k_L a)_{crit}$ is

$$(k_L a)_{crit} = Q / (C^* - C_{crit}). \quad (3)$$

The static gassing-out technique using distilled water without bacteria in the oxygen electrode chamber was used to verify the $(k_L a)_{crit}$, which was calculated according to Eq. (3). The static gassing-out technique requires the same aeration conditions as corresponds to Eq. (3). First, a standard bacterial culture (at the Q maximum) was injected into the electrode chamber and aerated by magnetic stirring. Aeration was adjusted to reach C_{crit} . Aeration under these conditions represented the steady-state at C_{crit} and corresponded to aeration at $(k_L a)_{crit}$ according to Eq. (3). Second, under these aeration conditions, liquid volume and rate of stirring, the static gassing-out technique was performed using distilled water and no bacterial cells. Distilled water was saturated with N_2 gas to decrease the oxygen concentration to low values (see C_0). Subsequently, the re-saturation of water by atmospheric oxygen was used to obtain the $(k_L a)_{crit}$ value from the re-saturation curve. The solution of Eq. (1) ($Q = 0$ because of distilled water) is a linear relationship:

$$\ln(C^* - C) = \ln(C^* - C_0) - k_L a t \quad (4)$$

where C_0 is the dissolved oxygen concentration at $t = 0$. The $(k_L a)_{crit}$ was determined as the slope of $\ln(C^* - C)$ vs. time using linear regression of data obtained by Eq. (4). The standard value of C^* in distilled water at 26 °C and actual atmospheric pressure is $250 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$, and it was used in all experiments. All calculations were based on similar oxygen solubility in distilled water and acidified water (or 9 K medium), as supported by closely similar $(k_L a)_{crit}$ values determined in distilled water and 9 K medium. The possible effect of different viscosity between distilled water and bacterial culture on the $(k_L a)_{crit}$ value was neglected because of diluted solutions and low biomass concentrations of *A. ferrooxidans*. No significant differences between the $(k_L a)_{crit}$ values were discerned either.

To confirm oxygen unlimited substrate oxidation at C_{crit} , iron- and sulfur-oxidizing activities were determined in resting cell suspensions using a 5-l bioreactor as previously described (Pakostova et al., 2013b; Pokorna et al., 2007) under adjusted aeration to test the substrate oxidation rates at high C and C_{crit} . The determination of ferric iron (Mandl and Novakova, 1993) and protons using a pH electrode (Radiometer Copenhagen) were used for the determination of the oxidation rates of iron and elemental sulfur, respectively. The rates were normalized to cell numbers.

3. Results and discussion

3.1. Oxygen limitation and critical values in the cultures

For the C_{crit} determination, dissolved oxygen concentrations were detected with a 10 times higher sensitivity although with a higher noise (Fig. 1) compared to the standard C measurements. The sensitivity of the standard measurement of higher C values (e.g., the saturation curve which served for data in Fig. 2) involved virtually no noise.

The C_{crit} concentrations for the oxidation of ferrous iron and elemental sulfur were 6.250 and $3.125 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$, respectively. The C_{crit} values correspond to cellular oxygen demand and are directly connected with K_m . The corresponding K_m values were 1.07 ± 0.16 and $0.61 \pm 0.08 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 3$) for ferrous iron and elemental sulfur oxidation, respectively. The difference between the K_m values was significant ($P < 0.05$). The lower K_m value obtained for elemental sulfur

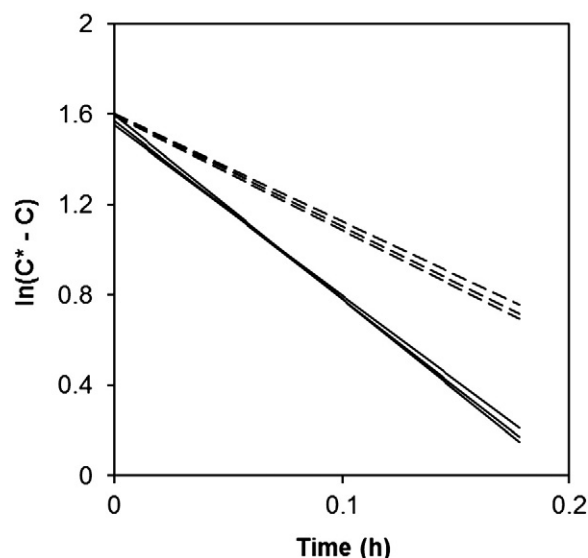


Fig. 2. Determination of $(k_L a)_{crit}$ in distilled water using the static gassing-out technique. Each regression line was the result of an independent experiment. Aeration conditions simulated the steady-state with the maximum Q of an *Acidithiobacillus ferrooxidans* culture oxidizing ferrous iron at $C_{crit} = 6.250 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ (---) and elemental sulfur at $C_{crit} = 3.125 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1}$ (—).

is in agreement with the corresponding lower C_{crit} value. These K_m values and C_{crit} concentrations may be universal because the differences in these values measured with many other strains from various geographical areas are insignificant (unpublished data).

A. ferrooxidans strain CCM 4253 was selected for the study because it had highest Q values among many isolates from abandoned mine sites in the Czech Republic. The standard cultures used in the steady-state experiments were obtained from growth phases that involved maximum respiration rates. We have previously demonstrated this approach with iron- and sulfur-oxidizing *A. ferrooxidans* cultures (Ceskova et al., 2002; Mandl, 1984).

For ferrous iron oxidation (mean \pm SD, $n = 3$), $Q = 31.3 \pm 1.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and based on Eq. (3), $(k_L a)_{crit} = 7.70 \pm 0.37 \text{ h}^{-1}$. Using the static gassing-out technique and the data in Fig. 2, $(k_L a)_{crit} = 7.83 \pm 0.31 \text{ h}^{-1}$. The difference between 7.70 and 7.83 h^{-1} was insignificant ($P > 0.05$). Thus, the static gassing-out technique confirmed the $(k_L a)_{crit}$ determination obtained under steady-state and physiological conditions. For elemental sulfur oxidation (mean \pm SD, $n = 3$), $Q = 20.08 \pm 0.20 \mu\text{mol O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $(k_L a)_{crit} = 4.88 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$. Using the static gassing-out technique and based on the data shown in Fig. 2, $(k_L a)_{crit} = 4.93 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$. Again, the difference between 4.88 and 4.93 h^{-1} was insignificant ($P > 0.05$). Thus, the static gassing-out technique supported accuracy of the $(k_L a)_{crit}$ value at steady state. However, the difference between the $(k_L a)_{crit}$ values for iron- and sulfur-oxidizing cultures of 7.70 and 4.88 h^{-1} , respectively, was highly significant ($P < 0.01$). The lower $(k_L a)_{crit}$ value for the sulfur-oxidizing culture is in agreement with its lower C_{crit} and K_m values. Both $(k_L a)_{crit}$ values define the minimum level of aeration required to avoid oxygen limitation in bioreactors.

To obtain a relatively universal $(k_L a)_{crit}$ value that ensures aeration in all phases of substrate oxidation without oxygen limitation, aside from defined physical conditions, the Q value in Eq. (3) should correspond to its maximum value. Under the maximum Q , aeration at $(k_L a)_{crit}$ should result in oxygen-unlimited substrate oxidation because C is not decreased below C_{crit} . The C values at $(k_L a)_{crit}$ are higher than the C_{crit} in cultures with lower Q values. Thus, the $(k_L a)_{crit}$ should predominantly avoid oxygen limitation in the most critical phases of substrate oxidation with the highest oxygen demand. In this study, the Q values of the standard cultures for the $(k_L a)_{crit}$ calculation were comparable with the highest values published in the literature, thus validating the

use of standard batch cultures. Should higher Q values occur, the $(k_L a)_{\text{crit}}$ can be calculated from Eq. (3).

The temperature effect on $(k_L a)_{\text{crit}}$ within the common temperature range used for *A. ferrooxidans* cultures is negligibly small compared to experimental and analytical sources of variability; for example, a change in the incubation temperature from 26 to 30 °C would change the C^* with less than 3% increase the $(k_L a)_{\text{crit}}$.

Although bacteria in elemental sulfur-oxidizing cultures may be attached on the sulfur particles to form a biofilm, the above results do not indicate more intensive oxygen limitation due to diffusion barriers. On the contrary, there was a lower oxygen demand in sulfur-oxidizing cultures compared to iron-oxidizing cultures, perhaps related to relatively low number of attached cells in the sulfur-oxidizing culture. Planktonic cells may represent the predominant biomass in the active growth phase (Pakostova et al., 2013b). Therefore, the insolubility of the sulfur substrate played no role in oxygen limitation of sulfur-oxidizing cultures.

3.2. Critical oxygen concentration and substrate-oxidizing activities

To validate the C_{crit} at a larger scale, for a longer time scale and not only based on respirometric experiments, iron- and sulfur-oxidation at defined oxygen concentrations was estimated by the determination of reaction products in the bioreactor cell suspensions. The aim of the bioreactor study was to test the C_{crit} value obtained in the respirometric experiments. In the bioreactor approach, the adjustment of the aeration resulted in defined C values. The lack of oxygen limitation at C_{crit} would be confirmed if there are no differences in the substrate oxidation rates at C_{crit} and at higher C .

Iron- and sulfur-oxidizing activities of bioreactor cell suspensions are shown in Figs. 3 and 4, respectively. These results confirmed that the value of C_{crit} determined in respirometric experiments (Section 3.1.) support oxygen unlimited oxidation of ferrous iron and elemental sulfur. Decreased oxidation rates, caused by oxygen limitation, may involve C values considerably lower than the C_{crit} .

The C_{crit} value determined for iron oxidation may be compared to the critical oxygen transfer rate in *A. ferrooxidans* cultures. Savić et al. (1998) and Veljković et al. (1999) reported that the maximum reaction

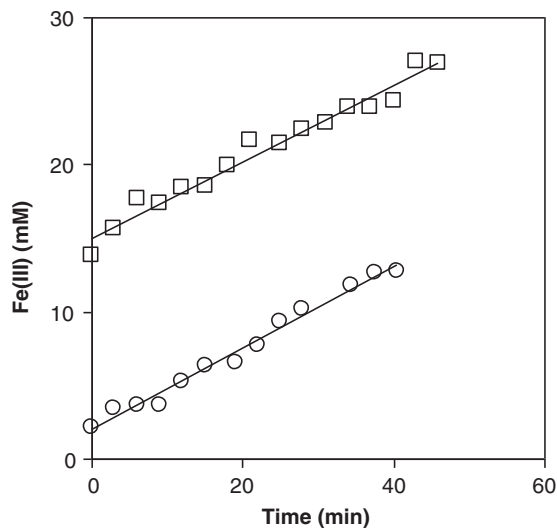


Fig. 3. Ferrous iron-oxidizing activity of resting *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. The formation of ferric iron at $C_{\text{crit}} = 6.250 \mu\text{mol O}_2 \text{l}^{-1}$ (\circ , $r = 0.992$), iron-oxidizing activity per cell was 690amol min^{-1} ; and at $C = 187 \mu\text{mol O}_2 \text{l}^{-1}$ (\square , $r = 0.984$), iron-oxidizing activity per cell was 650amol min^{-1} . Based on the slopes of the regression lines, the difference between the activities was insignificant ($P > 0.05$).

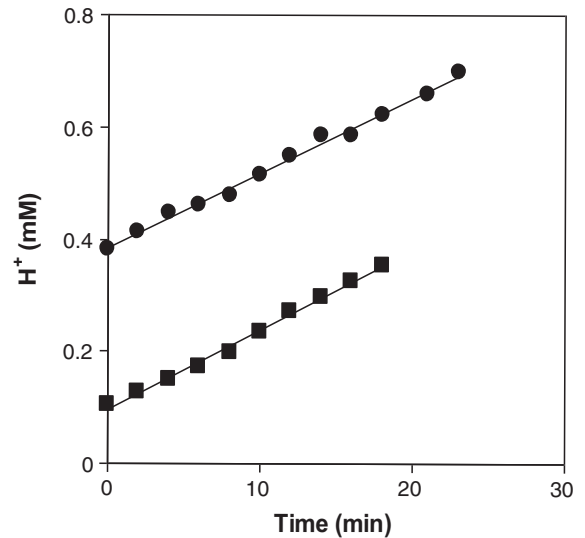


Fig. 4. Sulfur-oxidizing activity of resting *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. The formation of protons at $C_{\text{crit}} = 3.125 \mu\text{mol O}_2 \text{l}^{-1}$ (\bullet , $r = 0.996$), sulfur-oxidizing activity per cell was $3.35 \text{amol min}^{-1}$; and at $C = 187 \mu\text{mol O}_2 \text{l}^{-1}$ (\blacksquare , $r = 0.997$), sulfur-oxidizing activity per cell was $3.55 \text{amol min}^{-1}$. Based on the slopes of the regression lines, the difference between the activities was insignificant ($P > 0.05$).

rate constant for ferrous iron oxidation was not affected by oxygen transfer rate higher than approx. $1 \text{mg O}_2 \text{l}^{-1} \text{min}^{-1}$. The oxygen transfer rate corresponds to dC/dt in Eq. (1) without Q ; i.e., aeration without bacterial respiration. Substituting our values ($(k_L a)_{\text{crit}} = 0,1283 \text{min}^{-1}$, $C_{\text{crit}} = 0.2 \text{mg l}^{-1}$ and $C^* = 8 \text{mg l}^{-1}$ into Eq. (1), the oxygen transfer rate equals $1.001 \text{mg O}_2 \text{l}^{-1} \text{min}^{-1}$, which is in a very good agreement with previously published information. There are no data for C_{crit} values for elemental sulfur oxidation in the literature and hence a comparative evaluation is not possible.

4. Conclusions

Ferrous iron is a typical soluble substrate for *A. ferrooxidans* and *A. ferrooxidans* is among the main iron-oxidizers to produce ferric iron as an oxidant for sulfide minerals in biohydrometallurgy. Elemental sulfur is a poorly soluble substrate and is also formed as an intermediate in the oxidation of many sulfide minerals. This study determined the parameters for monitoring minimum aeration of iron- and sulfur-oxidizing cultures of *A. ferrooxidans*. The intensity of aeration has multiple consequences at the biochemical and bioleaching process control level. The comparison of the $(k_L a)_{\text{crit}}$ and C_{crit} data for iron and sulfur oxidation shows that if there is no oxygen limitation in the culture with ferrous iron, no oxygen limitation appears in the culture with elemental sulfur with similar aeration conditions.

The $(k_L a)_{\text{crit}}$ and C_{crit} values were determined under experimental conditions involving oxygen supply for unlimited substrate oxidation at high oxidation rates. The C_{crit} value was validated with a bioreactor suspension of *A. ferrooxidans*. Although the results were obtained under laboratory-scale conditions, the $(k_L a)_{\text{crit}}$ and C_{crit} values are valid guidelines for minimum aeration criteria for pilot- and commercial-scale bioreactors employed in biohydrometallurgy.

Acknowledgments

This work was supported by the European Union and the Czech Ministry of Education, grant no. CZ.1.07/2.4.00/31.0133 and the Masaryk University Program, project no. MUNI/A/0981/2013.

References

- Bailey, A.D., Hansford, G.S., 1993. Factors affecting biooxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids—a review. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 1164–1174.
- Bastias, M., Gentina, J.C., 2010. Variables affecting the growth and ferrous oxidation capacity of *L. ferrooxidans* in continuous culture. *Hydrometallurgy* 104, 351–355.
- Boon, M., Heijnen, J.J., 1998. Gas-liquid mass transfer phenomena in bio-oxidation experiments of sulphide minerals: a critical review of literature data. *Hydrometallurgy* 48, 187–204.
- Boon, M., Meeder, T.A., Heijnen, J.J., Luyben, K.C.A.M., 1992. Influence of oxygen adsorption on the dynamic $k_L a$ measurement in three-phase slurry reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1097–1106.
- Ceskova, P., Mandl, M., Helanova, S., Kasparovska, J., 2002. Kinetic studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 24–30.
- Crundwell, F.K., 2000. Modeling, simulation, and optimization of bacterial leaching reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 71, 255–265.
- Deveci, H., Akcil, A., Alp, I., 2003. Parameters for control and optimisation of bioleaching of sulphide minerals. In: Kongoli, F., Thomas, B., Sawamiphakdi, K. (Eds.), *Process Control and Optimization in Ferrous and Non Ferrous Industry*, Materials Science and Technology 2003 Symposium. TMS, Warrendale, PA, pp. 77–90.
- Dopson, M., Johnson, D.B., 2012. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environ. Microbiol.* 14, 2620–2631.
- Doran, M.P., 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London.
- Fazzini, R.A.B., Corte, M.P., Padilla, L., Maturana, D., Budinich, M., Maass, A., Parada, P., 2013. Stoichiometric modeling of oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (Riscs) in *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 2242–2251.
- Jadhav, U.U., Hong, H.C., Weng, W.H., 2013. Innovative use of biologically produced ferric sulfate for machining of copper metal and study of specific metal removal rate and surface roughness during the process. *J. Mater. Process. Technol.* 213, 1509–1515.
- Johnson, D.B., 2010. The biogeochemistry of biomining. In: Barton, L.L., Mandl, M., Loy, A. (Eds.), *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer, Dordrecht, pp. 401–426.
- Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2008. Thermodynamic and kinetic characterization using process dynamics: acidophilic ferrous iron oxidation by *Leptospirillum ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 49–60.
- Kucera, J., Bouchal, P., Cerna, H., Potesil, D., Janiczek, O., Zdrahal, Z., Mandl, M., 2012a. Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 561–573.
- Kucera, J., Zeman, J., Mandl, M., Cerna, H., 2012b. Stoichiometry of bacterial anaerobic oxidation of elemental sulfur by ferric iron. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 919–922.
- Mandl, M., 1984. Growth and respiration kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* limited by CO₂ and O₂. *Biologia* 39, 429–434.
- Mandl, M., Novakova, O., 1993. An ultraviolet method for the determination of oxidation of iron sulphide minerals by bacteria. *Biotechnol. Tech.* 7, 573–574.
- Mandl, M., Hrbáč, D., Dočekalová, H., 1996. Inhibition of iron(II) oxidation by arsenic(III, V) in *Thiobacillus ferrooxidans*: effects on arsenopyrite bioleaching. *Biotechnol. Lett.* 18, 333–338.
- Nemati, M., Harrison, S.T.L., 2000. A comparative study on thermophilic and mesophilic biooxidation of ferrous iron. *Miner. Eng.* 13, 19–24.
- Noorman, H.J., 2006. Mass transfer. In: Ratledge, C., Kristiansen, B. (Eds.), *Basic Biotechnology*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 201–217.
- Osoorio, H., Mangold, S., Denis, Y., Nancuqueo, I., Esparza, M., Johnson, D.B., Bonnefoy, V., Dopson, M., Holmes, D.S., 2013. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2172–2181.
- Pakostova, E., Mandl, M., Pokorna, B.O., Diviskova, E., Lojek, A., 2013a. Cellular ATP changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures oxidizing ferrous iron and elemental sulfur. *Geomicrobiol. J.* 30, 1–7.
- Pakostova, E., Mandl, M., Tuovinen, O.H., 2013b. Cellular ATP and biomass of attached and planktonic sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochem.* 48, 1785–1788.
- Penev, K., Karamanev, D., 2010. Batch kinetics of ferrous iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* at moderate to high total iron concentration. *Biochem. Eng. J.* 50, 54–62.
- Petersen, J., 2010a. Determination of oxygen gas-liquid mass transfer rates in heap bioleach reactors. *Miner. Eng.* 23, 504–510.
- Petersen, J., 2010b. Modelling of bioleach processes: connection between science and engineering. *Hydrometallurgy* 104, 404–409.
- Petersen, J., Minnaar, S.H., du Plessis, C.A., 2010. Carbon dioxide and oxygen consumption during the bioleaching of a copper ore in a large isothermal column. *Hydrometallurgy* 104, 356–362.
- Pokorna, B., Mandl, M., Borilova, S., Ceskova, P., Markova, R., Janiczek, O., 2007. Kinetic constant variability in bacterial oxidation of elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3752–3754.
- Savić, D.S., Veljković, V.B., Lazić, M.L., Vrvic, M.M., Vučetić, J.L., 1998. Effects of the oxygen transfer rate on ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 427–431.
- Seidel, H., Gorsch, K., Schumichen, A., 2006. Effect of oxygen limitation on solid-bed bioleaching of heavy metals from contaminated sediments. *Chemosphere* 65, 102–109.
- Sreekrishnan, T.R., Tyagi, R.D., 1996. A comparative study of the cost of leaching out heavy metals from sewage sludges. *Process Biochem.* 31, 31–41.
- Sun, L.X., Zhang, X., Tan, W.S., Zhu, M.L., 2012. Effects of dissolved oxygen on the biooxidation process of refractory gold ores. *J. Biosci. Bioeng.* 114, 531–536.
- Veljković, V.B., Savić, D.S., Lazić, M.L., Vrvic, M.M., 1999. Oxygen mass transfer requirements during ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* under controlled pH conditions. *Process Metall.* 9A, 617–623.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W., 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7529–7541.
- Zokaei-Kadjani, S., Safdari, J., Mousavian, M.A., Rashidi, A., 2013. Study of oxygen mass transfer coefficient and oxygen uptake rate in a stirred tank reactor for uranium ore bioleaching. *Ann. Nucl. Energy* 53, 280–287.

Příloha IV

Are there multiple mechanisms of anaerobic sulfur oxidation with ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans*?

Kucera, J., Pakostova, E., Lochman, J., Janiczek, O., Mandl, M., 2016. Research in Microbiology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.02.004>.



Institut Pasteur

Research in Microbiology xx (2016) 1–10



www.elsevier.com/locate/resmic

Original article

Are there multiple mechanisms of anaerobic sulfur oxidation with ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans*?

Jiri Kucera*, Eva Pakostova, Jan Lochman, Oldrich Janiczek, Martin Mandl

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Received 11 November 2015; accepted 11 February 2016

Available online ■ ■ ■

Abstract

To clarify the pathway of anaerobic sulfur oxidation coupled with dissimilatory ferric iron reduction in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain CCM 4253 cells, we monitored their energy metabolism gene transcript profiles. Several genes encoding electron transporters involved in aerobic iron and sulfur respiration were induced during anaerobic growth of ferrous iron-grown cells. Most sulfur metabolism genes were either expressed at the basal level or their expression declined. However, transcript levels of genes assumed to be responsible for processing of elemental sulfur and other sulfur intermediates were elevated at the beginning of the growth period. In contrast, genes with predicted functions in formation of hydrogen sulfide and sulfate were significantly repressed. The main proposed mechanism involves: outer membrane protein Cyc2 (assumed to function as a terminal ferric iron reductase); periplasmic electron shuttle rusticyanin; *c*₄-type cytochrome CycA1; the inner membrane cytochrome *bc*₁ complex I; and the quinone pool providing connection to the sulfur metabolism machinery, consisting of hetero-disulfide reductase, thiosulfate:quinone oxidoreductase and tetrathionate hydrolase. However, an alternative mechanism seems to involve a high potential iron-sulfur protein Hip, *c*₄-type cytochrome CycA2 and inner membrane cytochrome *bc*₁ complex II. Our results conflict with findings regarding the type strain, indicating strain- or phenotype-dependent pathway variation.

© 2016 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Anaerobic respiration pathway; Sulfur metabolism; Ferric iron reduction; Real-time quantitative PCR

1. Introduction

Since various forms of iron and sulfur have played important roles in the evolution of the Earth, studies on iron- and sulfur-dependent extremophiles under anaerobic conditions might provide important insight into the primordial microbial processes that occurred on our planet. Anaerobic bacterial activity indicates that some bacteria can survive without molecular oxygen (O₂) in sulfide-rich environments where elemental sulfur (S⁰) is available, and can be (bio)oxidized by ferric iron (Fe³⁺) to sulfuric acid. The process may affect such environments and biomining possibilities under O₂-limited or

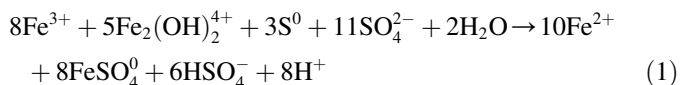
anaerobic conditions [1]. In extremely acidic environments, the ability to catalyze the dissimilatory reduction of Fe³⁺ using inorganic and organic electron donors is relatively widespread in diverse species of acidophilic prokaryotes. Nevertheless, the use of Fe³⁺ as an electron acceptor to support cell growth is generally facultative and occurs when availability of the primary electron acceptor O₂ becomes limited [2]. The microbial mechanisms of Fe³⁺ reduction under neutral conditions (where most forms of Fe³⁺ are insoluble) have been relatively well described [3]. However, there is little knowledge of mechanisms operating when the pH is below 3, even though Fe³⁺ is a more bioavailable and thermodynamically favorable electron acceptor under these conditions [4]. Mesophilic and acidophilic ferrous iron (Fe²⁺)- and S⁰-oxidizing *Acidithiobacillus* spp. (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrivorans*, *Acidithiobacillus ferridurans*) and thermo-tolerant *Acidiferrobacter thiooxydans*

* Corresponding author.

E-mail addresses: jiri.kucera@mail.muni.cz (J. Kucera), 150560@mail.muni.cz (E. Pakostova), lochik@mail.muni.cz (J. Lochman), janiczek@chemi.muni.cz (O. Janiczek), mandl@chemi.muni.cz (M. Mandl).

(formerly *Thiobacillus ferrooxidans* strain M-1) can couple dissimilatory Fe³⁺ reduction to S⁰ oxidation, while *A. ferrooxidans* and *A. ferridurans* can also use hydrogen (H₂) as an electron donor. In addition, the moderate thermophiles *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Sulfobacillus benefaciens* grow anaerobically via Fe³⁺ reduction with H₂ as an electron donor [5].

The most widely studied chemolithotrophic acidophile *A. ferrooxidans* has been shown to anaerobically oxidize S⁰ with Fe³⁺ according to the stoichiometry shown below [6].



While the ability of *A. ferrooxidans* to anaerobically reduce Fe³⁺ has been known for many years [7–10], the molecular mechanism involved remains unclear. The first model of the anaerobic respiratory pathway assumed electron transport from S⁰ via the bc₁ complex and periplasmic transporters of the iron-oxidizing system to the terminal acceptor Fe³⁺ [11]. The proposed mechanism was supported by inhibition studies [8], and partially, by an increase in the abundance of rusticyanin (Rus) and c₄-type cytochrome Cyc1 during anaerobic incubation of resting Fe²⁺-grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells [12]. Involvement of the iron-oxidizing system in anaerobic respiration was indirectly supported by dissimilarities in kinetic traits of two *A. ferrooxidans* CCM 4253 phenotypes. Fe²⁺-grown cells of this strain could anaerobically reduce Fe³⁺, but not cells that had been maintained on S⁰ for several generations, most likely because they lacked some parts of the iron-oxidizing system. Additionally, Fe²⁺-grown cells lost their Fe³⁺-reducing activity after transition and subsequent passaging on S⁰ [12]. Our recent broad-range proteomic analysis of these cells lacking the Fe³⁺-reducing capacity revealed downregulation of energy metabolism proteins. In some cases, these proteins were even absent. Among the repressed and missing proteins, Cyc2, Rus, heterodisulfide reductase (Hdr), thiosulfate:quinone oxidoreductase (Tqo) and sulfide:quinone reductase (Sqr) were identified [13].

High levels of a c-type cytochrome were observed in *A. ferrooxidans* JCM 7811 grown anaerobically on S⁰ or H₂ in the presence of Fe³⁺ as an electron acceptor [14]. The reduced form of this soluble acid-stable 27.4-kDa protein was re-oxidized by Fe³⁺. Immunostaining also revealed the presence of Rus in cells anaerobically grown on H₂ with Fe³⁺ as an electron acceptor [14].

In contrast to the above observations, different expression patterns of energy metabolism genes and proteins were observed in an RNA microarray- and proteomics-based study of S⁰-grown *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (the type strain) cells grown anaerobically on S⁰ as an electron donor and Fe³⁺ as an electron acceptor. These included increases in abundance under anaerobic conditions of an iron-sulfur binding subunit of sulfur reductase (SreB) and Tat, the twin-arginine translocation pathway signal sequence domain protein [15]. Tat was recently described as a tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase [16]. In addition, transcript-level upregulation

of *tusA* and *dsrE* encoding sulfur-relay enzymes (parts of the *hdr* operon) and *petIII* operon (*petA2*, *petB2* and *cycA2*) genes encoding the bc₁ complex II (PetA2B2C2) and cytochrome CycA2 was detected in anaerobic cells. Furthermore, anaerobic induction of the *sre* operon encoding four subunits of putative sulfur reductase (Sre) was confirmed using real-time PCR. In contrast, reductions in the abundance of Cyc2, an outer-membrane iron oxidase, and heterodisulfide reductase subunits HdrA and HdrB2, were detected in anaerobic cells of the type strain. Genes encoding heterodisulfide reductase subunit B (*hdrB2*), which is separated from the *hdr* operon, tetrathionate hydrolase (*tth*) and iron oxidation system-encoding *rus* operon (*cyc1*, *cyc2*, *coxA*, *coxC* and *rus*), were downregulated at the transcript level in the type strain under anoxic conditions. Thus, a second model of the anaerobic respiratory pathway has been suggested which includes S⁰ disproportionation, whereby hydrogen sulfide (H₂S) is formed via the action of Sre, and sulfate (SO₄²⁻) via the actions of Hdr and ATP sulfurylase (Sat) [15]. Under this proposed mechanism, Fe³⁺ reduction is mediated, at least in part, by an indirect chemical reaction with H₂S in the acidic medium. A direct mechanism within this model, involving electron transfer from S⁰ to Fe³⁺ via a respiratory chain consisting of the bc₁ complex II and c₄-type cytochrome CycA2, was also postulated. However, terminal Fe³⁺ reductase and other possible electron carriers during anaerobic S⁰ oxidation remain undiscovered [15].

As outlined above, there are interesting and poorly understood variations in outcomes of end-point screening across various strains and proposed mechanisms [12,15]. Thus, the purpose of this study was to verify and extend previous observations by real-time analysis of energy metabolism genes that could be involved in the anaerobic pathway of S⁰ oxidation coupled with dissimilatory Fe³⁺ reduction in *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells. To meet these aims, gene transcript profiles were monitored throughout the cells' growth phases. The results of this and previous studies indicate that there may exist more mechanisms of the anaerobic respiratory pathway.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria and culture conditions

A. ferrooxidans strain CCM 4253 (Czech Collection of Microorganisms) was used in this study. This strain was shown to be closely related (100% identity) to the type strain of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 by 16S rRNA gene sequencing (EF465493) [17]. Fe²⁺-grown cells were cultured in 9K medium [18]. For anaerobic growth, *A. ferrooxidans* CCM 4253 was cultivated in a 10-L bioreactor (Biostat B-DCU; B. Braun Biotech International) with agitation by stirring (200 rpm) at 28 °C. The bioreactor was charged with a basal salts trace element medium [14] containing 89.5 mM of Fe³⁺ in the form of filter-sterilized ferric sulfate hexahydrate and 1% (w/v) S⁰ sterilized by boiling (Sulfur Extra Pure, Riedel-deHaën). Fe²⁺-grown cells were harvested by centrifugation at 15,000 × g for 10 min and then inoculated into the bioreactor at a final

density of around 10^8 per mL. The pH of the inoculated medium was adjusted to 1.9–2.0 with ammonia, and an Ar/CO₂ (9:1) gas mix was bubbled through the culture to eliminate dissolved O₂ and provide a source of carbon. On the basis of optimization studies, the influx speed was set to 1 L min⁻¹ for 15 min on each day of cultivation. Culture samples of 300–500 mL were collected for transcript analyses at 24-h intervals over 8 days (all the Fe³⁺ in the medium had been consumed after this period). The remaining S⁰ was removed from the samples by paper filtration, and the biomass was harvested by centrifugation ($15,000 \times g$ for 10 min at 4 °C). The resulting cell pellets were then carefully washed once with a fresh basal salts medium without added trace elements and frozen at -70 °C.

For studies on anaerobic culture growth kinetics and optimization of cultivation conditions, 250-mL flasks with outlets for gas supply and sampling were charged with Fe²⁺-grown cells in 200 mL of the basal salts-trace element medium containing 89.5 mM Fe³⁺ and 1% (w/v) S⁰. The pH was adjusted to 1.9–2.0 and the temperature was maintained at 28 °C. The cultures were agitated by stirring at 200 rpm, and an Ar/CO₂ (9:1) gas mix was bubbled through the cultures at an influx speed of 1 L min⁻¹ at various frequencies.

2.2. Analytical procedures for kinetic studies

Cell densities were monitored turbidimetrically at 450 nm [19] and microscopically using a Cyrus chamber and an Olympus BX50 optical microscope. Concentrations of Fe²⁺ in cultures were determined by the o-phenanthroline method [20] and H⁺ concentrations were determined with a pH electrode (Radiometer Copenhagen). O₂ levels were measured using a dissolved O₂ sensor (Mettler-Toledo), and sulfide concentrations in culture samples were quantified using a modification of an established method [21] based on a reaction with the thiol-specific derivatization agent monobromobimane, followed by reversed-phase fluorescence HPLC (Agilent Technologies). Limit of detection of this method was determined from a calibration curve [22].

2.3. Transcript analysis

Gene expression was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using the fluorescent intercalating dye SYBR-Green and a Light Cycler 480 (Roche). Total RNA was isolated from two biological replicates of 300–500 mL using the TRI Reagent[®] (Sigma) with spin column purification by Direct-zol[™] RNA MiniPrep (Zymogene Research) including in-column DNase I treatment (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and cDNA amplification by qPCR were carried out as previously described [23]. Briefly, the cDNA for each gene of interest was amplified in triplicate by qPCR using gene-specific primers (we used the available *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genomic sequence and annotation; details are given in Table S1 in Supplementary data) and GoTaq qPCR Master Mix (Promega) according to the manufacturer's instructions. The qPCR

reaction conditions consisted of 35 cycles of DNA denaturation at 95 °C for 20 s followed by annealing and extension at 60 °C for 40 s. The transcript level of each gene was normalized using a normalization factor (defined by transcript levels of the reference genes *rrs*, *map* and *alaS*) to facilitate evaluation of gene expression in relation to an endogenous control by the $\Delta\Delta C_T$ method [24,25]. The normalized values at different time points during the culture periods were compared with those obtained at time zero (when the inoculum was added). A 0.7-fold deviation in log₂ ratio was regarded as an indicator of significant differential gene expression [15], and each gene expression value was evaluated by the *t*-test, with the significance threshold set at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Growth kinetics of an anaerobic *A. ferrooxidans* CCM 4253 culture

The optimal CO₂ supply rate for *A. ferrooxidans* under anaerobic growth conditions is not known; thus, in preliminary tests, we grew the test strain with several supply rates. Our results indicated that a daily CO₂ supply of 0.75 L, corresponding to 5.59 ± 0.65 nL CO₂ per cell (mean \pm SD), was sufficient for unlimited cell growth in the 10-L bioreactor (see illustrative Fig. S1 in Supplementary data). In additional experiments to identify potentially growth-inhibiting dosages, cell growth was not inhibited by CO₂ doses up to forty times this level (30 L/day). Overall, we concluded that a CO₂ supply of 1.5 L every 24 h was sufficient to sustain unlimited growth.

According to the model reaction stoichiometry (1), the ratio of changes in H⁺ and Fe²⁺ concentrations should be 0.444 [6]. The experimentally determined slope (see Fig. S2 in Supplementary data), corresponding to the H⁺/Fe²⁺ ratio, was 0.438 ± 0.036 (mean \pm SD), insignificantly different from the model ratio ($P > 0.05$). Thus, the stoichiometry of anaerobic S⁰ oxidation during cell growth corresponded to that determined for resting cells [6], indicating that the reaction mechanism was the same.

3.2. Transcript analysis of *A. ferrooxidans* CCM 4253 under anaerobic conditions

Real-time qPCR was used to monitor the transcript profiles of energy metabolism genes in anaerobic *A. ferrooxidans* CCM 4253 cultures that were performing dissimilatory Fe³⁺ reduction coupled with S⁰ oxidation (Figs. 1 and 2). The acquired transcript profiles demonstrated that transcriptional levels of genes might vary substantially throughout the process, and thus affect results of end-point analyses, responses of translational and protein turnover machinery, and (hence) both transcript and protein profiles.

Generally, during anaerobic growth of Fe²⁺-grown cells, transcript levels of iron metabolism-related genes (represented by the *res*, *petI*, and *rus* operons) were the same and/or higher than their basal levels in aerobic Fe²⁺-grown cells. Several sulfur metabolism-related genes were induced at the beginning

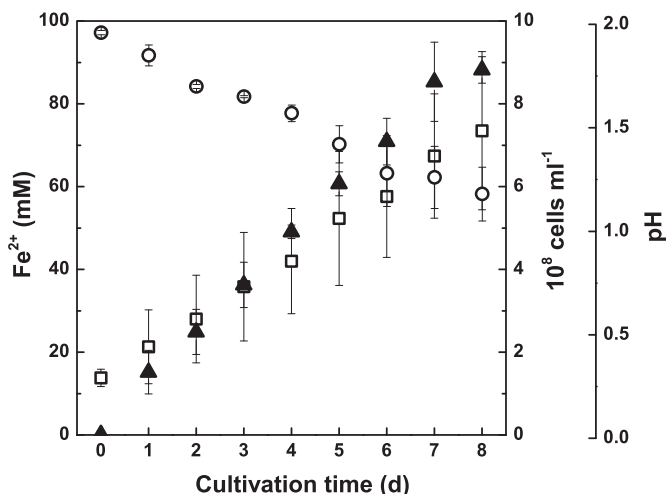


Fig. 1. Growth kinetics of an anaerobic *A. ferrooxidans* CCM 4253 culture during oxidation of S^0 with Fe^{3+} . The culture was generated using Fe^{2+} -grown cells as an inoculum, with an initial density of 10^8 cells per mL. Cell numbers are indicated by open squares, Fe^{2+} formation by filled triangles, and pH by open circles. The error bars represent means \pm SD ($n = 2$).

of the anaerobic growth period, but subsequently most of them were expressed at their basal level or significantly repressed. The *petII* operon involved in electron transport during aerobic sulfur respiration showed a similar transcript profile during anaerobic growth to the *petI* operon (Fig. 2). However, the *petI* operon was more heavily transcribed than the *petII* operon (Table 1).

3.2.1. Anaerobic respiratory pathway – sulfur metabolism

The mechanism of sulfur metabolism involving S^0 and other reduced inorganic sulfur compounds (RISC) in *A. ferrooxidans* differs from that in most prokaryotes. The sulfur-oxidizing systems encoded by the *sox* and *sor* genes that are found in most bacteria and archaea have not been identified in the *A. ferrooxidans* genome sequence [26]. On the other hand, a cluster of six co-transcribed genes (*hdr* operon) encoding a heterodisulfide reductase complex has been found to be greatly upregulated during growth on S^0 [27,28]. In *A. ferrooxidans* under both aerobic and anaerobic conditions, Hdr has been postulated to work in reverse, using the naturally existing proton gradient to drive the oxidation of disulfide compounds – probably glutathione sulfane-sulfur (GSSH) – to sulfite (SO_3^{2-}). S^0 is poorly soluble in water and it reacts non-enzymatically with glutathione (GSH) to form GSSH. However, it is still unknown how S^0 is incorporated into the cell. The collected electrons from GSSH oxidation are then delivered to an inner-membrane quinone pool (Q/QH₂) [15,28].

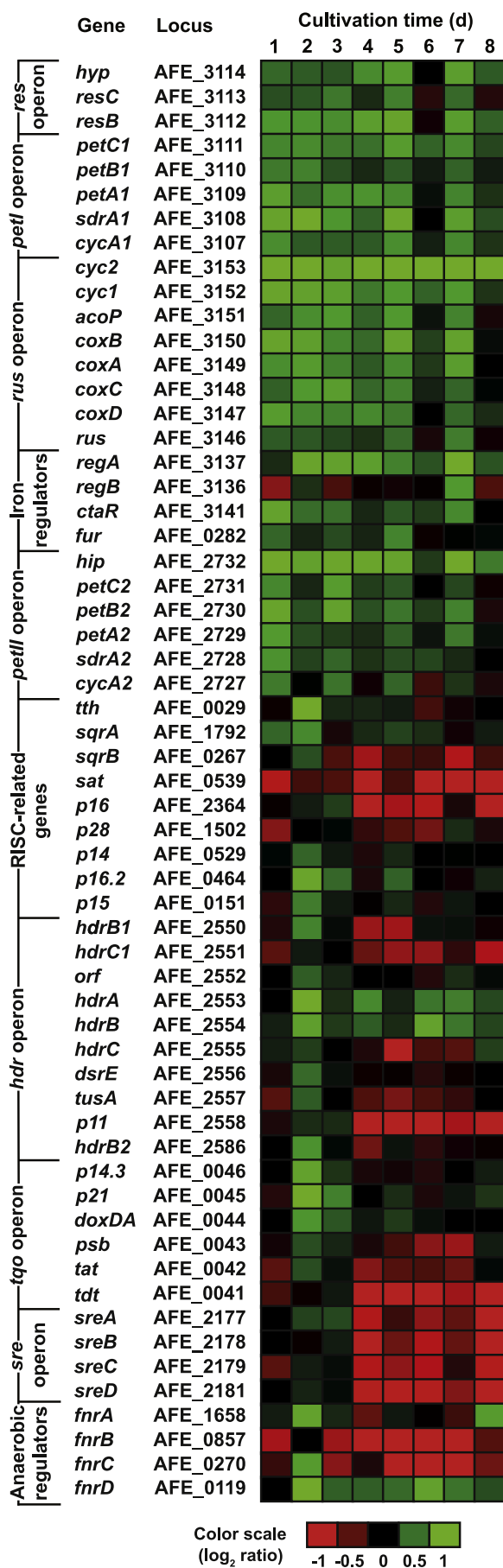
In our experiments, two genes of the *hdr* operon that were significantly overexpressed in Fe^{2+} -grown cells during anaerobic S^0 oxidation were *hdrA* and *hdrB* (Fig. 2), which encode FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (heterodisulfide reductase subunit A) and heterodisulfide reductase subunit B, respectively. This conflicts with previous findings that the corresponding HdrA protein declines in abundance under anaerobic conditions [12,15]. However, the

apparent reduction in abundance of RISC metabolism proteins under anaerobic conditions may have occurred because the end-point analysis focused on a level of the late active S^0 oxidation phase [12,15]. We detected no significant increase in the transcript levels in this phase (Fig. 2). Use of an aerobic S^0 -grown culture (which would be expected to exhibit strong sulfur respiration activity with O_2 as an electron acceptor) in the comparison may also have contributed to the reported reduction in abundance of RISC metabolism proteins under anaerobic conditions. Despite these caveats, the overexpression of *hdrA* and *hdrB* in Fe^{2+} -grown cells during anaerobic S^0 oxidation supports the hypothesis that Hdr is involved in the anaerobic process, since the RISC metabolism genes are expressed weakly in aerobic Fe^{2+} -grown cells. However, this raises questions regarding the enzyme complex's ability to fulfill this function because, given its recognized role in two-electron reduction in anaerobes, even acting in reverse, it may be unable to catalyze four-electron transfer from S^0 to SO_3^{2-} .

No significant induction of *dsrE* and *tusA* transcription was detected in any monitored anaerobic growth phase (Fig. 2), in contrast to previous reports [15], where their function in the H_2S transport associated with S^0 reduction by Sre was assumed. However, their transcript profiles in *A. ferrooxidans* CCM 4253 rather indicate functions in sulfur transport associated with S^0 oxidation by Hdr, implying their localization in the *hdr* operon. Rhodanese-like protein encoded by *p11*, and other genes (*hdrB1* and *hdrC1*) included in the *hdr* operon, were repressed after three days of anaerobic growth (Fig. 2) and are probably not involved in S^0 oxidation or transport under anaerobic conditions. On the other hand, our preliminary quantitative proteomic analysis of whole cell lysates of the culture that lost anaerobic Fe^{3+} -reducing activity during passage on S^0 indicated that it contained no pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (HdrA) or iron-sulfur cluster-binding protein (HdrC1), while the preceding culture retained these proteins [13]. Proteomic data together with transcription profiles in this work strongly support involvement of Hdr in anaerobic S^0 oxidation. Nevertheless, the role of HdrC1 in the anaerobic process remains ambiguous with respect to current transcript-level results.

ATP sulfurylase (Sat), which is encoded by *sat* and catalyzes production of SO_4^{2-} and ATP from adenosine-5'-phosphosulfate (APS) and pyrophosphate [28], was significantly repressed at the transcript level during anaerobic growth (Fig. 2). Its role in the anaerobic mechanism of SO_4^{2-} formation may not be essential and the anaerobic SO_4^{2-} -forming mechanism still remains unclear. The depression of certain genes involved in RISC metabolism during later phases of anaerobic growth (Fig. 2) may mirror the concentration of Fe^{2+} , which gradually increases over time in cultures growing anaerobically (Fig. 1). This is indicative of regulation at the transcription level by the RegBA system, and more specifically, overexpression of some RISC metabolism genes at low redox potential [29].

After two days of anaerobic growth of Fe^{2+} -grown cells, the *p14.3*, *p21* and *tth* genes were also overexpressed (Fig. 2).



The rhodanese-like protein P21, a putative thiosulfate sulfur transferase, was upregulated more strongly in *A. ferrooxidans* ATCC 19859 cultures grown on different RISC and metal sulfides than in Fe²⁺-grown cells [30]. The *p21* and *p14.3* genes cluster into the *tqo* operon, which encodes the Tqo complex [28]. We did not detect any increase in expression of *tat* transcripts, encoding a protein that has thiosulfate-dehydrogenase activity [16] and is reportedly abundant in anaerobic cells [15]. Expression of another gene (*tdt*) of the *tqo* operon was reduced after half of the anaerobic growth period (Fig. 2). Moreover, the Tat pathway signal sequence domain protein encoded by the *tqo* operon was downregulated in cells unable to reduce Fe³⁺ under anaerobic conditions. Two other proteins encoded by the same operon, rhodanese-like protein P21 and periplasmic solute-binding protein (Psb), have not been found in these cells [13]. Therefore, we concluded that Tqo contributes to RISC metabolism under anaerobic conditions. The low level of *sat* gene RNA transcripts (for sulfite oxidation) and increased *tqo* gene transcripts could indicate that sulfite abiotically reacts with elemental sulfur to form thiosulfate, which is oxidized by Tqo.

Like HdrA, reductions in abundance of Tth in anaerobic cells have been previously reported [15], and the discrepancy may be due to increases in transcript levels at the beginning of the anaerobic process (Fig. 2), and anaerobic S⁰/Fe³⁺ respiration being less efficient than aerobic S⁰/O₂ respiration. Tetrathionate hydrolase (Tth), encoded by *tth*, disproportionately hydrolyzes tetrathionate to thiosulfate, S⁰ and SO₄²⁻ [31]. Tth was also proposed to be a candidate final electron donor to Fe³⁺ [32]. However, no direct connection of Tth to the respiratory chain has been demonstrated as yet. Therefore, Tth-mediated Fe³⁺ reduction is a relatively minor process compared to respiratory Fe³⁺ reduction. Moreover, since *tth* has a transcript profile similar to that of the other RISC metabolism genes (Fig. 2), Tth is more likely to be primarily involved in RISC metabolism than to serve as a terminal Fe³⁺ reductase.

Expression of the *sre* operon, which encodes a putative sulfur reductase, was significantly repressed during anaerobic growth (Fig. 2). Its transcript profiles suggest that little or no S⁰ disproportionation to H₂S and SO₄²⁻ occurred in Fe²⁺-grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells, in contrast to previously proposed S⁰ disproportionation mechanism via the action of Sre in S⁰-grown *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells [15]. Sulfur reductase reduces S⁰ with H₂ as electron donor in the presence of [NiFe] hydrogenase, with which it participates in a membrane-bound multi-enzyme complex in the sulfur-dependent hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens*

Fig. 2. Transcriptional profiles of energy metabolism genes during anaerobic oxidation of S⁰ with Fe³⁺ in growing *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells. Gene transcripts were monitored in the culture in Fig. 1. Predicted functions and names of the proteins encoded by the monitored genes are described in the text and summarized in Table S1 in Supplementary data. The color scale shows the logarithm of relative expression (log₂ ratio). All expression values are listed in Table S2 in Supplementary data.

Table 1

Gene transcript ratio between *petI* and *petII* operons (*petI* gene divided by *petII* gene) during anaerobic oxidation of S^0 with Fe^{3+} in growing *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells.

Gene	Cultivation time (d)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>petA</i>	1.05	1.10	1.26	1.32	1.13	1.01	1.03	1.13	1.13
<i>petB</i>	0.84	1.26	0.76	0.96	0.95	0.94	0.92	1.52	0.89
<i>petC</i>	1.00	1.35	0.95	1.17	1.26	1.35	1.20	1.38	1.34
<i>sdrA</i>	1.19	1.94	1.16	1.14	1.52	0.78	1.45	1.28	1.58
<i>cycA</i>	1.09	1.32	0.95	1.46	1.16	1.46	1.42	1.41	1.31

Note: Presented values are based on ratios of the C_T values normalized using normalization factors from the cultures used to obtain the transcription profiles shown in Fig. 2.

[33] and the bacterium *Aquifex aeolicus* [34]. Moreover, sulfur reductase cannot be reportedly separated from hydrogenase during purification without loss of activity [33]. Transcript levels of *hynD* and *hynS*, which encode membrane-bound respiratory [NiFe] hydrogenase [35], were reportedly reduced under anaerobic conditions in the *A. ferrooxidans* type strain [15]. Hence, the mechanism of H_2S formation from S^0 and the proposed role of Sre in *A. ferrooxidans* under anaerobic conditions require further investigation. Our qualitative test for the presence of H_2S using lead acetate yielded negative results. The maximum soluble sulfide concentrations determined in the cultures monitored in this study were consistently below the limit of detection (7.1 μM) and therefore taken to be zero or trace levels at most. In contrast to a previous study [15], we obtained no conclusive evidence of H_2S formation. Our results with *A. ferrooxidans* CCM 4253 did not confirm the model of the anaerobic sulfur-oxidizing system that includes S^0 disproportionation to form H_2S and SO_4^{2-} . They are more consistent with earlier observations and conclusions [8,11]. However, the reduction of S^0 cannot be completely excluded. We assume that the process will be minor in RISC metabolism of *A. ferrooxidans* CCM 4253 in the absence of H_2 as an electron donor under anaerobic conditions.

Various suggested mechanisms of anaerobic S^0 oxidation could essentially involve one of two key processes, reflecting the pathway variation across *A. ferrooxidans* strains or cellular phenotypes [12,15]. However, both mechanisms include Hdr mediating S^0 oxidation and passing electrons to the inner membrane quinone pool, which further transfers electrons to downstream components of the Fe^{3+} respiratory chain. Tqo also contributes to the delivery of electrons to the quinone pool.

3.2.2. Anaerobic respiratory pathway – dissimilatory Fe^{3+} reduction

The iron-oxidizing system contains several high-redox potential proteins. The proteins of the direct and reverse electron transport pathways are encoded by the *rus* and *petI* operons, respectively [36,37]. Moreover, a comparative analysis of whole genome sequences from various mesophilic acidophiles [38,39] has indicated that only *A. ferrooxidans*, *A. ferridurans*, and *A. ferrivorans* strains whose genome

sequences contain the iron-oxidizing system encoded by the *rus* and *petI* operons and an additional *petII* operon as a part of sulfur respiration are capable of anaerobic Fe^{3+} reduction using S^0 as an electron donor. Previous authors found that the *rus* operon was strongly expressed in aerobic Fe^{2+} -grown cells, but weakly transcribed (with correspondingly low abundance of its translation products) in active S^0 -grown cells [40]. We found that one of the *rus* operon genes, *cyc2*, was overexpressed throughout the anaerobic growth period (Fig. 2). This is interesting because *cyc2* encodes the *c*-type cytochrome Cyc2, which is located in the outer membrane and is the initial electron acceptor in Fe^{2+} oxidation. Another gene of the *rus* operon, *cyc1*, was significantly overexpressed during the first three days of anaerobic growth, and *coxBAC* genes were mildly induced, possibly as a result of the gene cluster's co-transcription (Fig. 2). Furthermore, Cyc2 was down-regulated and Rus has not been detected in cells unable to anaerobically reduce Fe^{3+} [13].

We hypothesize that the terminal Fe^{3+} reductase might be outer membrane cytochrome Cyc2, operating in reverse mode and reducing Fe^{3+} to Fe^{2+} under anaerobic conditions. Electrons required for this reduction are probably delivered from periplasmic Rus. Increases in protein levels of Rus and cytochrome Cyc1 have been previously observed in anaerobic resting cells [12], and Rus has been detected during anaerobic Fe^{3+} reduction with H_2 as the electron donor [14]. Rusticyanin is a stable and highly abundant protein in Fe^{2+} -grown cells, in which it represents about 5% of soluble protein [41], and will probably still be able to fulfill the role of an electron transporter in the respiratory chain, even after strong reduction of its content in a cell. Apparently, there is no need for its further overexpression at the transcript level during anaerobic growth (Fig. 2). However, upregulation of Rus at the protein level has been observed in anaerobic resting cells [12] relative to aerobic S^0 -grown cells, which exhibit only transient overexpression of the *rus* operon during the early exponential phase (and even then, its level is weaker than in Fe^{2+} -grown cells) [40]. A direct interaction between Rus and Cyc2 has been previously demonstrated, but no interaction has been detected between Cyc2 and Cyc1 or CycA1 [42]. This may explain the need for Rus in the anaerobic electron transport pathway. Whether or not cytochrome Cyc1 also participates in the process is unclear, since increases in its transcript and protein levels under anaerobic conditions could be due to *rus* operon co-transcription and/or the relatively slow turnover of both this and other iron respiratory proteins. On the other hand, roles of Cyc2 and Rus in the anaerobic respiratory pathway have been substantially supported by our recent study on cells that lost their Fe^{3+} -reducing activity [13] and results presented here.

The cytochrome *bc₁* complex plays an important role in the anaerobic respiratory pathway connecting S^0 oxidation and dissimilatory Fe^{3+} reduction under anaerobic conditions, according to the first proposed model based on studies using respiratory chain inhibitors [8,11]. Two operons encoding different inner-membrane cytochrome *bc₁* complexes have been found in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome

sequence. Both bc_1 complexes consist of a c_1 -type cytochrome encoded by *petC*, a b -type cytochrome encoded by *petB* and a Rieske protein encoded by *petA* [43]. The cytochrome bc_1 complex I (PetA1B1C1) has been shown to be activated only in Fe^{2+} -grown cells and to participate in reverse electron flow during Fe^{2+} respiration, delivering electrons to the NADH complex (NDH-1) via the quinone pool [44]. The cytochrome bc_1 complex II (PetA2B2C2), which is induced mainly in S^0 -grown cells and temporarily, to a lesser extent, in Fe^{2+} -grown cells, is part of the sulfur respiration system, transmitting electrons from the quinone pool to the terminal oxidase via periplasmic transporters such as the high potential iron-sulfur protein (Hip) and cytochrome CycA2 [44].

In anaerobic conditions, the situation appears to be more complicated, and both types of bc_1 complex seem to be present. During anaerobic oxidation of S^0 with Fe^{3+} , reduction in abundance of the SdrA2 protein has been observed in Fe^{2+} -grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells [12], and increases in *petA2*, *petB2*, and *cycA2* transcript levels in S^0 -grown *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells [15]. SdrA2, like SdrA1 may promote electron transfer from the quinone pool to the NADH complex [28]. In this study, we observed significant over-expression of *petA1*, *petC1*, *sdrA1*, *petC2*, *petB2*, and *hip* during anaerobic growth (Fig. 2). Under anaerobic growth conditions, the *petI* operon was expressed much more strongly than the *petII* operon (Table 1), in accordance with previous observations of Fe^{2+} -grown cells under aerobic conditions [44]. Thus, bc_1 complex I seems to play a more dominant role during anaerobic electron transport pathway than bc_1 complex II in Fe^{2+} -grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells. In the anaerobic Fe^{3+} respiratory chain, the bc_1 complex I would operate in a direct energetically favorable exergonic mode, in contrast to the reverse endergonic mode required in the aerobic Fe^{2+} respiratory chain. In anaerobic mode, H^+ translocation by the cytochrome bc_1 complex I would be directed from the cytoplasm to the periplasm, thereby generating the proton motive force required for ATPase activity.

During anaerobic growth, *resB* and *hyp* were induced (Fig. 2). The *res* operon is located next to the *petI* operon in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence, and the proteins it encodes are involved in maturation of *petI* operon products [45,46]. Increased levels of the *res* operon transcripts under anaerobic conditions support involvement of the *petI* operon in anaerobic Fe^{3+} respiration. Therefore, we assume that the cytochrome bc_1 complex I is part of the main anaerobic respiratory pathway in Fe^{2+} -grown cells that accepts electrons from S^0 oxidation via the inner-membrane quinone pool and passes them to the c_4 -type cytochrome.

One of two possible respiratory c_4 -type cytochromes, Cyc1, interacts with Rus and cupredoxin “acidophile cytochrome *c* oxidase partner” (AcoP), and also binds to an integral inner-membrane terminal oxidase in a process facilitated by physical interaction [47]. No evidence of interaction between Cyc1 and the cytochrome bc_1 complex I has been found thus far. Therefore, Cyc1 probably does not participate in electron transport between the bc_1 complex I and Rus. The other candidate, CycA1, interacts with and is reduced by Rus [47].

Since CycA1 and cytochrome bc_1 complex I are both encoded by the *petI* operon, they are generally assumed to interact, although no clear evidence for this interaction has been presented yet. Based on the gene transcript profiles, we assume that electrons delivered to cytochrome bc_1 complex I from sulfur oxidation via the quinone pool are further transported to Rus (which functions as a periplasmic electron shuttle) via cytochrome CycA1 to outer membrane cytochrome Cyc2, which catalyzes the extracellular reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} .

However, our results do not exclude participation of cytochrome bc_1 complex II in an alternative respiratory chain, as previously suggested to occur in the *A. ferrooxidans* type strain [15,44]. Two proteins encoded by the *petII* operon could mediate electron transport from cytochrome bc_1 complex II to an unknown terminal Fe^{3+} reductase. One is CycA2, which has been recently proposed for inclusion in the anaerobic electron transport pathway based on its transcript level over-expression in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 [15]. Nevertheless, its induction was not demonstrated in *A. ferrooxidans* CCM 4253 in this study (Fig. 2). The other is periplasmic Hip, but its gene expression only significantly increased ($P < 0.05$) at the end of the anaerobic culture (Fig. 2). In addition, Hip contains an O_2 -labile [4Fe–4S] cluster with ideal properties for participation in anaerobic electron transport.

3.2.3. Regulation of the anaerobic respiratory pathway

Four potential genes encoding members of the one-component regulator Fnr family, which is required for the switch from aerobic to anaerobic metabolism [48], have been found in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence [49]. Transcript levels of *fnrACD* genes were increased after two days of anaerobic growth (Fig. 2), suggesting that they might participate in regulation of the transition between aerobic and anaerobic states. In contrast, *fnrB* was underexpressed during anaerobic growth (Fig. 2), and we obtained no confirmatory indications of its involvement in the switch. In facultative anaerobic bacteria, expression of genes involved in the anaerobic respiratory pathway and related functions in the absence of O_2 are controlled by the reversible activation of Fnr [50]. In addition, under the same conditions, Fnr represses some genes of the aerobic respiratory pathway [51]. In *A. ferrooxidans*, Fnr probably has quite modest effects on activation of genes involved in the anaerobic respiratory pathway, because most of them also participate in the aerobic respiratory pathway. Transcript levels of *regA*, part of the two-component regulatory system RegBA, increased both at the beginning of anaerobic cultivation (when small quantities of Fe^{2+} were present), and at the end of the cultivation, when almost all of the Fe^{3+} had been reduced to Fe^{2+} (Figs. 1 and 2). The transcript levels of *regA* mirror the concentration of iron in the environment [23]. This system positively regulates *rus* operon expression [29] and could therefore enhance induction of respiratory genes as the local concentration of Fe^{2+} increases. Changes in transcript levels of other genes in late stages of anaerobic growth with elevated concentrations of Fe^{2+} could also contribute to different results in end-point analyses.

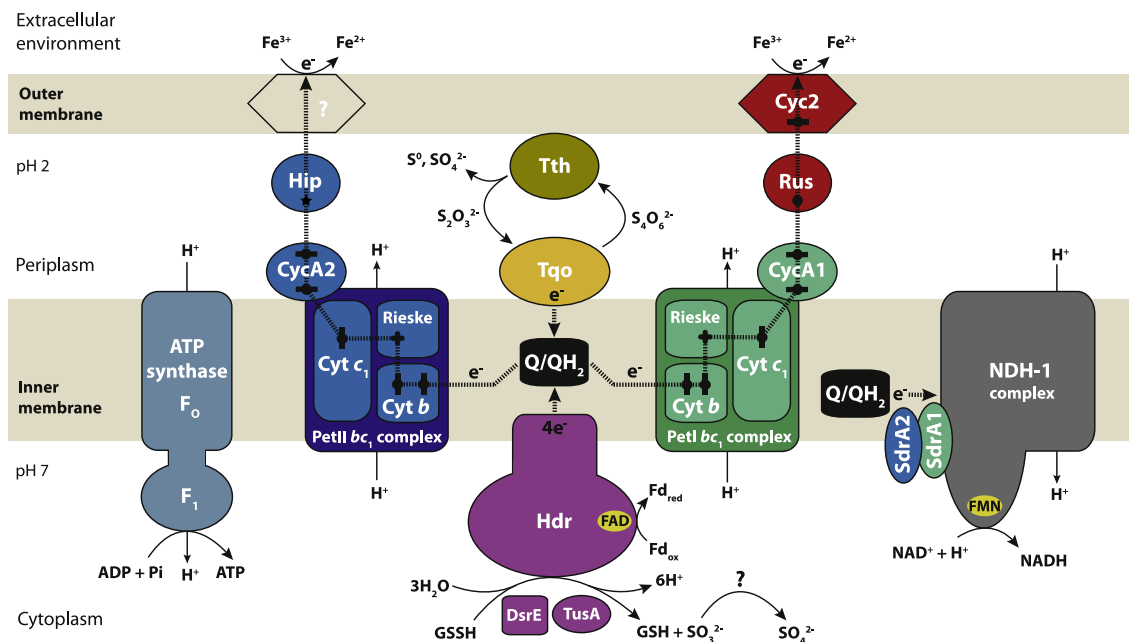


Fig. 3. Model of anaerobic oxidation of S^0 coupled with dissimilatory Fe^{3+} reduction in *A. ferrooxidans* CCM 4253. The electron transport pathways from S^0 to Fe^{3+} are based on findings in this and previously published corroborative studies [9–16]. Electrons derived from S^0 oxidation catalyzed by heterodisulfide reductase (Hdr) and other RISC metabolism processes mediated by tetrathionate hydrolase (Tth) and thiosulfate:quinone oxidoreductase (Tqo) are collected by the quinone pool (Q/QH₂). The cytochrome bc_1 complex I (PetA1B1C1) probably passes most of the electrons to the c_4 -type cytochrome (CycA1) that may interact with rusticyanin (Rus) and transfer the electrons to the outer membrane c -type cytochrome (Cyc2), where Fe^{3+} is reduced outside the cells. Alternatively, the cytochrome bc_1 complex II (PetA2B2C2) may pass the electrons to the c_4 -type cytochrome (CycA2), which might interact with the high potential iron-sulfur protein (Hip) and transfer the electrons to an unknown outer membrane Fe^{3+} reductase. Some of the electrons cross the quinone pool to the NADH complex (NDH-1) and reduce NAD^+ . ATP synthase phosphorylates ADP using the proton motive force generated by the electron transport chain. Proteins encoded by genes of the same operon are shown in the same color. Dashed arrows indicate electron transfer, and solid arrows indicate H^+ transport. Black circles represent the copper center, circles within bars represent the heme center, crosses represent the [2Fe–2S] cluster and star shapes represent the [4Fe–4S] cluster. See text for more details.

It has been proposed that anaerobic sulfur respiration is one of the earliest mechanisms of microbial energy conservation [52]. It is possible that the anaerobic sulfur respiratory system was the original system in *A. ferrooxidans* from which the aerobic system (which uses O_2 as a much more efficient electron acceptor than Fe^{3+}) subsequently evolved. The ability to facultatively utilize energy under anaerobic conditions may have been retained, since bacteria frequently exist under O_2 -limited conditions.

4. Conclusion

In conclusion, rapid adaptation of Fe^{2+} -grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells to anaerobic S^0 oxidation, coupled with dissimilatory Fe^{3+} reduction, caused notable induction of genes with functions in iron and sulfur metabolism and regulation of associated processes. In addition, none of the genes encoding components of the iron-oxidizing system were repressed during anaerobic growth, and some were even induced. Clearly, relatively low-fold induction of monitored genes may indicate that Fe^{2+} -grown cells use most of the respiratory components that are present in and used by cells under aerobic conditions to produce energy by anaerobic Fe^{3+} respiration. Apart from a few sulfur metabolism genes induced anaerobically, some of them that are probably also involved in

both aerobic and anaerobic sulfur oxidation were expressed at basal levels in anaerobic cells, corresponding to levels observed in Fe^{2+} -grown cells. This suggests that the sulfur metabolism enzymes are temporarily expressed in Fe^{2+} -grown cells, but to a lesser extent than in S^0 -grown cells. It might also explain the smooth (lag-free) adaptation of Fe^{2+} -grown *A. ferrooxidans* CCM 4253 cells to S^0 oxidation, whereas S^0 -grown cells lacking a complete iron-oxidizing system only oxidize Fe^{2+} after a 4- to 7-day lag phase [23].

Findings of this and previous studies [8,11,12,15] suggest possible mechanisms of anaerobic S^0 oxidation coupled with dissimilatory Fe^{3+} reduction in *A. ferrooxidans* CCM 4253 (Fig. 3). The main mechanism involves the outer membrane Cyc2 acting as a terminal Fe^{3+} reductase; rusticyanin acting as a periplasmic electron shuttle; and c_4 -type cytochrome CycA1, the inner-membrane cytochrome bc_1 complex I and the inner-membrane quinone pool providing electron transfer connections to key components of the sulfur metabolism machinery (heterodisulfide reductase, thiosulfate:quinone oxidoreductase and tetrathionate hydrolase). Additionally, an alternative mechanism involving the inner membrane cytochrome bc_1 complex II together with c_4 -type cytochrome CycA2, as previously reported [15], Hip and an unknown terminal Fe^{3+} reductase, cannot be excluded. However, our conclusions differ from the model presented in the cited study on the type

strain [15], which includes H₂S formation and participation of different genes. Thus, the findings indicate strain- or phenotype-dependent variations in the anaerobic respiratory pathway.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grant no. GP14-27075P from the Czech Science Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.02.004>.

References

- [1] Johnson DB. The biogeochemistry of biomining. In: Barton LL, Mandl M, Loy A, editors. Geomicrobiology: molecular and environmental perspective. The Netherlands: Springer; 2010. p. 401–26.
- [2] Johnson DB, Hallberg KB. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 2009;54:201–55.
- [3] Bird LJ, Bonnefoy V, Newman DK. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol* 2011;19:330–40.
- [4] Johnson DB, Kanao T, Hedrich S. Redox transformations of iron at extremely low pH: fundamental and applied aspects. *Front Microbiol* 2012;3:96.
- [5] Hedrich S, Johnson DB. Aerobic and anaerobic oxidation of hydrogen by acidophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2013;349:40–5.
- [6] Kucera J, Zeman J, Mandl M, Cerna H. Stoichiometry of bacterial anaerobic oxidation of elemental sulfur by ferric iron. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012;101:919–22.
- [7] Brock TD, Gustafson J. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1976;32:567–71.
- [8] Pronk JT, Liem K, Bos P, Kuenen JG. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:2063–8.
- [9] Pronk JT, De Bruyn aC, Bos P, Kuenen JG. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2227–30.
- [10] Das A. Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;97:167–72.
- [11] Corbett CM, Ingledew WJ. Is Fe^{3+/2+} cycling an intermediate in sulphur oxidation by Fe²⁺-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 1987;41:1–6.
- [12] Kucera J, Bouchal P, Cerna H, Potesil D, Janiczek O, Zdrahal Z, et al. Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012;101:561–73.
- [13] Kucera J, Pakostova E, Janiczek O, Mandl M. Changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ability to reduce ferric iron by elemental sulfur. *Adv Mater Res* 2015;1130:97–100.
- [14] Ohmura N, Sasaki K, Matsumoto N, Saiki H. Anaerobic respiration using Fe³⁺, S⁰, and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 2002;184:2081–7.
- [15] Osorio H, Mangold S, Denis Y, Nancucueo I, Esparza M, Johnson DB, et al. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:2172–81.
- [16] Kikumoto M, Nogami S, Kanao T, Takada J, Kamimura K. Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:113–20.
- [17] Pokorna B, Mandl M, Borilova S, Ceskova P, Markova R, Janiczek O. Kinetic constant variability in bacterial oxidation of elemental sulfur. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3752–4.
- [18] Silverman MP, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J Bacteriol* 1959;77:642–7.
- [19] Pakostova E, Mandl M, Pokorna BO, Diviskova E, Lojek A. Cellular ATP changes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures oxidizing ferrous iron and elemental sulfur. *Geomicrobiol J* 2013;30:1–7.
- [20] Tamura H, Goto K, Yotsuyanagi T, Nagayama M. Spectrophotometric determination of iron(II) with 1,10-phenanthroline in the presence of large amounts of iron(III). *Talanta* 1974;21:314–8.
- [21] Fahey RC, Newton GL. Determination of low-molecular-weight thiols using monobromobimane fluorescent labeling and high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1987;143:85–96.
- [22] Doerffel K. Statistik in der analytischen Chemie. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie; 1966.
- [23] Kucera J, Bouchal P, Lochman J, Potesil D, Janiczek O, Zdrahal Z, et al. Ferrous iron oxidation by sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* and analysis of the process at the levels of transcription and protein synthesis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013;103:905–19.
- [24] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:16–21.
- [25] Nieto PA, Covarubias PC, Jedlicki E, Holmes DS, Quatrini R. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Mol Biol* 2009;10:63.
- [26] Holmes DS, Bonnefoy V. Genetic and bioinformatic insights into iron and sulfur oxidation mechanisms of bioleaching organisms. In: Rawlings DE, Johnson DB, editors. Biomining. Berlin, Heidelberg: Springer; 2007. p. 281–307.
- [27] Ehrenfeld N, Levicán G, Parada P. Heterodisulfide reductase from *Acidithiobacilli* is a key component involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Adv Mater Res* 2013;825:194–7.
- [28] Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Jedlicki E, Holmes DS, Bonnefoy V. Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics* 2009;10:394.
- [29] Ponce JS, Moinier D, Byrne D, Amouric A, Bonnefoy V. *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizes ferrous iron before sulfur likely through transcriptional regulation by the global redox responding RegBA signal transducing system. *Hydrometallurgy* 2012;127–128:187–94.
- [30] Ramírez P, Toledo H, Guiliani N, Jerez CA. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1837–45.
- [31] Kanao T, Kamimura K, Sugio T. Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biotechnol* 2007;132:16–22.
- [32] Sugio T, Taha TM, Takeuchi F. Ferrous iron production mediated by tetrathionate hydrolase in tetrathionate-, sulfur-, and iron-grown *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:1381–6.
- [33] Laska S, Lottspeich F, Kletzin A. Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology* 2003;149:2357–71.
- [34] Guiral M, Tron P, Aubert C, Gloter A, Iobbi-Nivol C, Giudici-Ortoni MT. A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem* 2005;280:42004–15.
- [35] Valdés J, Pedrosa I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R, et al. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 2008;9:597.

- [36] Appia-ayme C, Guiliani N, Ratouchniak J, Bonnefoy V. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes, an *aa₃*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4781–7.
- [37] Brasseur G, Levican G, Bonnefoy V, Holmes D, Jedlicki E, Lemesle-Meunier D. Apparent redundancy of electron transfer pathways via *bc₁* complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim Biophys Acta* 2004;1656:114–26.
- [38] Valdés J, Pedrosa I, Quatrini R, Holmes DS. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 2008;94:180–4.
- [39] Talla E, Hedrich S, Mangenot S, Ji B, Johnson DB, Barbe V, et al. Insights into the pathways of iron- and sulfur-oxidation, and biofilm formation from the chemolithotrophic acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans* CF27. *Res Microbiol* 2014;165:753–60.
- [40] Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* 2004;150:2113–23.
- [41] Cox JC, Boxer DH. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochem J* 1978;174:497–502.
- [42] Castelle C, Guiral M, Malarte G, Ledgham F, Leroy G, Brugna M, et al. A new iron-oxidizing/O₂-reducing supercomplex spanning both inner and outer membranes, isolated from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biol Chem* 2008;283:25803–11.
- [43] Brasseur G, Bruscella P, Bonnefoy V, Lemesle-Meunier D. The *bc₁* complex of the iron-grown acidophilic chemolithotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* functions in the reverse but not in the forward direction: Is there a second *bc₁* complex? *Biochim Biophys Acta* 2002;1555:37–43.
- [44] Bruscella P, Appia-Ayme C, Levicán G, Ratouchniak J, Jedlicki E, Holmes DS, et al. Differential expression of two *bc₁* complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology* 2007;153:102–10.
- [45] Cabrejos ME, Zhao HL, Guacucano M, Bueno S, Levican G, Garcia E, et al. IST1 insertional inactivation of the *resB* gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett* 1999;175:223–9.
- [46] Levicán G, Bruscella P, Guacucano M, Inostroza C, Bonnefoy V, Holmes DS, et al. Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 2002;184:1498–501.
- [47] Malarte G, Leroy G, Lojou E, Abergel C, Bruschi M, Giudici-Ortoni MT. Insight into molecular stability and physiological properties of the diheme cytochrome CYC 41 from the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochemistry* 2005;44:6471–81.
- [48] Lefimil C, Osorio H, Quatrini R, Holmes DS, Jedlicki E. Regulation of expression of the *petI* operon involved in iron oxidation in the biomining bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv Mater Res* 2009;71–73: 199–202.
- [49] Osorio H, Cárdenas JP, Valdés JH, Holmes DS. Prediction of FNR regulated genes and metabolic pathways potentially involved in anaerobic growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv Mater Res* 2009; 71–73:195–8.
- [50] Uden G, Becker S, Bongaerts J, Holighaus G, Schirawski J, Six S. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 1995;164:81–90.
- [51] Uden G, Trageser M. Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1991;59:65–76.
- [52] Schauder R, Kröger A. Bacterial sulphur respiration. *Arch Microbiol* 1993;159:491–7.