

## Abstract

Biological leaching is the dissolution of metal sulfides by acidophilic sulfur- and/or iron-oxidizing microorganisms. As the biological leaching activity can result in both negative and positive outcomes, both of these two contrary aspects are discussed below: I) The negative effect of bioleaching is known as acid mine drainage or acid rock drainage (AMD/ARD) and the concomitant pollution of soil and water with sulfuric acid and heavy metals. II) The positive option to use bioleaching microorganisms in biotechnological applications, for the recovery of metals from low-grade metal sulfide ores or waste materials. Attachment and biofilm formation on these ores and materials has a major impact on the leaching activity of these microorganisms. However, biofilm formation by bioleaching microorganisms on the metal-bearing sulfides is not thoroughly understood. The composition of the extracellular polymeric substances (EPS), which mediate adhesion to solid substrates, is fundamental for the biofilm lifestyle. The EPS consist of several different compounds such as polysaccharides, fatty acids, extracellular DNA (eDNA), proteins and others, which may vary between species, and also be dependent on the energy source and other environmental conditions prevailing during growth.

The objective of this study was to investigate the amounts and composition of the EPS, of the iron-oxidizing *Acidithiobacillus* species *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3 and *Acidithiobacillus ferridurans* ATCC 33020. Different solid substrates, such as pyrite, chalcopyrite and sphalerite as well as elemental sulfur were used as energy source, in order to test their influence on differences in the EPS composition and amounts.

For these experiments, the cultivation method was optimized, to improve the bacterial EPS production, in order to facilitate extraction and analysis of EPS. Different conditions were assayed, like addition of different supplements (e.g. glucuronate, iron(III) ions, citrate), exchange of cultivation media, different growth temperature. Phosphate (1 mM) and supply of glucuronate (1 mM) revealed as suitable for the cultivation of the microorganisms on metal sulfides. In contrast, phosphate (1 mM) together with an exchange of cultivation media every four days were chosen, when microorganisms were grown in the presence of sulfur.

For the extraction of the tightly-bound EPS (TB EPS), a cation exchange resin (CER) was used, whereas the loosely-bound EPS (LB EPS) was extracted by centrifugation. The EPS of cells from the planktonic cell sub-population (PP) and the biofilm cell sub-population (BP) were extracted and analyzed separately. Quantitative analysis of major EPS components (proteins, carbohydrates, lipids, uronic acids, eDNA) revealed main differences when the solid substrates were compared, whereas only minor inter-species differences were observed.

Finally, the EPS proteins were identified using a high-throughput shotgun proteomics approach. A cluster of orthologous group (COG) analysis revealed insights into various functions of the EPS proteins. A prediction of secretion sequences within the amino acid sequences revealed that several proteins could possibly be secreted, whereas many other proteins harbored none or no known secretion sequence and could be originated from lysed cells.

By a protein basic local alignment search tool (BLAST) uncharacterized proteins were compared to known functional domains. Proteins were found to have conserved domains, with functions related to DNA binding, metal tolerance, adhesion, protein folding, iron oxidation, electron transfer and others. Two proteins are of special interest, according to their predicted functions. These proteins, with the locus tag Lferr\_0115 and Lferr\_2308 of *At. ferrooxidans* ATCC 53993, may be interesting for further characterization studies. Lferr\_0115 harbored sequences which are described as related to chaperon function (YscW domain Bit Score 88.87), copper tolerance/efflux and adhesion to abiotic surfaces (NlpE Bit Score 80.88), a META domain (Bit Score 103.95), some proteins containing these domain are involved in motility, as well as HslJ sequence (Bit Score 68.61) a membrane associated heat shock protein. Lferr\_2308 has predicted functions in e.g. chemotaxis (Tar Bit Score 48.06) and cell surface adhesion (Yad A Bit Score 72.53).

## Zusammenfassung

Biologische Laugung ist die Auflösung von Metallsulfiden durch acidophile Schwefel- und/oder Eisen-oxidierende Mikroorganismen. Da deren biologische Aktivität sowohl negative als auch positive Auswirkungen haben kann, werden im Folgenden beide gegensätzlichen Aspekte diskutiert: I) Der negative Effekt der biologischen Laugung ist bekannt als „Acid mine drainage“ oder „Acid rock drainage“ (AMD/ARD), dieser geht einher mit der Verschmutzung des Bodens und Wassers durch Schwefelsäure und Schwermetalle. II) Der positive Effekt ist die Möglichkeit der Verwendung von Biolaugungs-Mikroorganismen in der biotechnologischen Anwendung zur Gewinnung von Metallen aus minderwertigen metallsulfidischen Erzen und Abfallmaterialien. Anheftung und Biofilmbildung auf diesen Erzen und Materialien haben einen wesentlichen Einfluss auf die Laugungsaktivität dieser Mikroorganismen. Jedoch ist die Biofilmbildung durch die Biolaugungs-Mikroorganismen auf metallhaltigen Sulfiden bisher nicht vollständig erforscht. Die Zusammensetzung der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ist einer der grundlegenden Aspekte des Biofilmes, unter anderem vermitteln die EPS die Anheftung der Mikroorganismen an die Substrate. EPS bestehen aus unterschiedlichsten Substanzen wie Polysacchariden, Fettsäuren, extrazellulärer DNA (eDNA), Proteinen und anderen. Die Zusammensetzung der EPS kann variieren in Abhängigkeit zur Gattung, zur Energiequelle, aber auch zu anderen äußeren Umwelteinflüssen, die während des Wachstums vorherrschen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mengen und die Zusammensetzung der EPS der drei *Acidithiobacillus* Spezies *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993, *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3 und *Acidithiobacillus ferridurans* ATCC 33020 zu untersuchen. Verschiedene Substrate wie Pyrit, Chalcopyrit, Sphalerit und elementarer Schwefel wurden als Energiequellen für die Mikroorganismen genutzt, um deren Einfluss auf die EPS Zusammensetzungen und Mengen zu untersuchen.

Um die bakterielle EPS Produktion zu verbessern, wurden zunächst die Kultivierungsbedingungen optimiert, mit dem Ziel, die Extraktion und Analyse der EPS zu erleichtern. Unterschiedlichste Bedingungen wie verschiedene Zusätze (z.B. Glucuronat, Eisen(III) Ionen und Citrat), der Austausch des Mediums und verschiedene Kultivierungstemperaturen wurden getestet. Eine Phosphat

Konzentration von 1 mM und ein Zusatz von 1 mM Glucuronat zeigten sich als geeignet für die Kultivierung der Mikroorganismen auf Metallsulfiden. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine Phosphat Konzentration von 1 mM in Kombination mit einem Austausch des Mediums alle vier Tage als für die Kultivierung der Mikroorganismen mit elementarem Schwefel geeignet.

Die Extraktion der sogenannten „tightly-bound EPS“ (TB EPS) wurde mittels eines Kationen-Austausch-Harzes (CER) durchgeführt, während die „loosely-bound EPS“ (LB EPS) durch Zentrifugieren extrahiert wurden. Die planktonische Subpopulation (PP) und die Biofilm Subpopulation wurden in dieser Arbeit getrennt voneinander extrahiert und analysiert. Die quantitativen Analysen der wichtigsten EPS-Bestandteile (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Uronsäuren, eDNA) zeigten wesentliche Unterschiede bei einem Vergleich der eingesetzten Substrate, während die Unterschiede zwischen den Arten im Vergleich gering waren.

Die EPS Proteine wurden mittels einer Hoch-Durchsatz-Shotgun-Proteomik-Methode identifiziert. Eine sogenannte „cluster of orthologous group“ (COG) Analyse zeigte, dass Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen in den EPS detektiert werden konnten. Eine Vorhersage der Signalsequenzen für die Sekretion, die in den Aminosäuresequenzen codiert sind, zeigte wiederum, dass mehrere der gefundenen Proteine wahrscheinlich sekretiert werden, während andere gefundene Proteine keine Signalsequenzen oder aber keine bekannte Signalsequenzen besaßen. Speziell die beiden letzteren Proteingruppen können ihren Ursprung auch in der Lyse von Zellen haben.

Durch das sogenannte „protein basic local alignment search tool“ (BLAST) wurde die Aminosäuresequenz von uncharakterisierten Proteinen mit bekannten funktionellen Domänen verglichen. Konservierte funktionelle Domänen, die in Zusammenhang mit Funktionen wie DNA Bindung, Metalltoleranz, Adhäsion, Proteinfaltung, Eisenoxidation, Elektronentransfer und mehr stehen, konnten in unterschiedlichen Proteinen nachgewiesen werden. Besonders die Proteine mit der Kennung Lferr\_0115 und Lferr\_2308 des Mikroorganismus *At. ferrooxidans* ATCC 53993 könnten für weiterführende Charakterisierungsstudien von Interesse sein. In Lferr\_0115 wurden unterschiedliche funktionelle Domänen detektiert, die verbunden sind mit den Funktionen Chaperon Faltung (YscW domain Bit Score 88.87), Kupfertoleranz/Kupferefflux und Adhäsion an abiotische Oberflächen (NlpE Bit

---

Score 80.88), sowie eine META Domäne (Bit Score 103.95) und eine HSIJ Sequenz (Bit Score 68.61). Proteine mit META Domänen sind involviert in die Motilität. Bei dem HSIJ Protein handelt es sich um ein membranassoziiertes Hitzeschockprotein. In dem Protein Lferr\_2308 wurden funktionelle Domänen detektiert, die mit der Chemotaxis (Tar Bit Score 48.06) und der Zell-Oberflächen-Adhäsion (Yad A Bit Score 72.53) zusammenhängen.