SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Fábio Henrique Pfeilsticker de Knegt

"Análise da privação de fosfato em *Acidithiobacillus ferrooxidans*"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética de Microrganismos.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) FABIO HENRIQUE PFEILSTICKER DE KNEGT
Laura M. M. Ottoboni
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Campinas
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
Nº CHAMADA
T/UNICAMP
K734a
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 62999
PROC. 16.P00086.05
C ☐ D ☑
PREÇO 11,00
DATA 13/04/05
Nº CPD
BIBID - 345963

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

734a
K723a

Knegt, Fábio Henrique Pfeilsticker de
Análise da privação de fosfato em *Acidithiobacillus ferrooxidans* / Fábio Henrique Pfeilsticker de Knegt. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni
DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Instituto de Biologia.

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 2. Fosfato. 3. Morfologia (Biologia). 4. Bactérias – Microbiologia. 5. Bactérias – Metabolismo.

I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 20 de outubro de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Maria Inês Zanoli Sato

Assinatura

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Assinatura

Prof. Dr. Maricilda Palandi de Mello

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

À Dra. Laura por me acolher em seu laboratório, pela paciência, pela dedicação, pelos quitutes, pelas discussões e pelas conversas no fim de tarde.

Aos membros da banca: Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Dra. Maria Inês Zanoli Sato e Dra. Maricilda Palandi de Mello pela participação na banca.

Aos membros da pré-banca: Dr. Sérgio de Mendonça, Dr. Gílson Paulo Manfio e Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano pelos valiosos comentários e críticas.

Ao pessoal do laboratório: Wagner (Cidão), Tânia, Fernanda, Lúcio, Renato, Renata, Ricardo, Ana Paula e Bianca, pela amizade e discussões.

À Sandra, Tânia, Andressa e Paula, da secretaria do CBMEG por facilitar meu dia-a-dia.

Aos colegas do CBMEG pela camaradagem.

À Maria de Lourdes e pelo resto do pessoal da secretaria de pós-graduação, pela ajuda nos tramites burocráticos.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

À moçada da OGRE e ao pessoal da biologia pela força e amizade via modem.

Aos "Pfeilstickers" e aos "de Knegts", por existirem, pelas festas, pelas piadas, pelo carinho...

À Marisa pelo bate-papo, amizade e por achar meu apartamento.

Ao Leopoldo pelo mecenato, pelo vinho, discussões, conselhos e amizade. Valeu cara!!

À Dona Sêlva, por todo seu carinho.

Ao Daniel, Rafael, Leonardo e Bárbara por agüentarem meu mau humor, pelas risadas, pela convivência e por mais um monte de coisas...

À Cris, pelo amor, companheirismo, por me ajudar nas horas mais difíceis, e por tantas coisas que deixo de escrever por motivos de espaço.

Ao papai e a mamãe, por tudo.

ÍNDICE

RESUMO viii

ABSTRACT ix

INTRODUÇÃO 1

1- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Características Gerais 1

2- Aplicações Econômicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* 2

3- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Biologia Molecular e Resposta ao Estresse 5

3.1- Genética e molecular 5

3.2- Resistência a íons metálicos 7

3.3- Resposta ao estresse de pH e temperatura 9

3.4- Resposta ao estresse nutricional de privação de fosfato 9

OBJETIVOS 13

MATERIAL E MÉTODOS 14

1- Linhagem bacteriana 14

2- Meio de Cultura 14

3- Curvas de Crescimento 15

4- Condições de Crescimento Para Obtenção de Massa Celular 15

5- Isolamento de RNA 15

6- RAP-PCR **17**

6.1- Síntese de cDNA **17**

6.2- Separação dos cDNAs por eletroforese **17**

7- Isolamento e Reamplificação das Bandas Diferenciais **18**

8- *Slot Blot* de DNA **18**

8.1- Transferência das bandas diferenciais para membranas de nylon **18**

8.2- Hibridização das membranas **19**

8.3- Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot* **19**

9- Clonagem e Seqüenciamento dos cDNAs **19**

10- Análise de Seqüências e Anotação de Genes no Genoma não Anotado de *A. ferrooxidans* **20**

11- Amplificação do gene *ribBA* a Partir de DNA Genômico de *A. ferrooxidans* **21**

12- *Slot Blot* de RNA **22**

12.1- Transferência do RNA para membranas de nylon **22**

12.2- Hibridização das membranas **22**

12.3- Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot* **23**

13- Técnicas Padrão de Biologia Molecular **23**

14- Condições de Crescimento e Obtenção de Células para Análise por Microscopia de Força Atômica **24**

15- Microscopia de Força Atômica (AFM – *Atomic Force Microscopy*) **24**

RESULTADOS E DISCUSSÃO **26**

1- Curvas de Crescimento **26**

2- RAP-PCR **30**

3- *Slot blot* de DNA **32**

4- Clonagem e Seqüenciamento das Bandas Isoladas Através de RAP-PCR 37

4.1- Análise da seqüência dos cDNAs OPJ14 S7/S8/S24 39

4.2- Análise da seqüência do cDNA OPJ06 S11 45

5- Caracterização dos cDNAs e Gene Amplificado 52

5.1- *ribB* e *ribBA* 52

5.2- *hspA* 64

6- Análise das Alterações Morfológicas de *A. ferrooxidans* Submetida à Privação de Fosfato 71

6.1- Microscopia de força atômica (AFM) 71

6.2- Análise estatística dos dados obtidos com a AFM 78

6.3- Interpretação dos resultados obtidos 81

CONCLUSÃO GERAL 86

BIBLIOGRAFIA 87

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria Gram-negativa, de metabolismo diazotrófico, estritamente autotrófico e quimiolitotrófico que pode utilizar Fe^{2+} e S^0 como doadores de elétrons em sua respiração celular. *A. ferrooxidans* possui importância econômica, uma vez que um dos microrganismos envolvidos no processo de biolixiviação, processo em que metais existentes em minérios na forma de compostos insolúveis são solubilizados pela ação de comunidades de microrganismos. O fosfato é um nutriente que pode limitar o crescimento de *A. ferrooxidans* em ambientes de biolixiviação. A despeito disto, pouco se sabe a respeito das respostas molecular e morfológica desta bactéria ao estresse de privação deste nutriente. A linhagem brasileira *A. ferrooxidans* LR foi utilizada para o estudo de genes expressos diferencialmente e de alterações morfológicas de células cultivadas em condições de privação de fosfato. Foram feitos experimentos de curva de crescimento em várias concentrações de fosfato. Com base nestes experimentos foram escolhidas as condições para a realização de experimentos de RAP-PCR. A confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados foi realizada por *slot blot* de DNA. Os cDNAs com maiores coeficientes de expressão foram clonados e seqüenciados. A análise das seqüências mostrou que três cDNAS apresentaram similaridade significativa com a enzima 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase (DHBP sintase – RibB) e com o domínio DHBP sintase de enzimas bifuncionais que possuem um domínio DHBP sintase e outro GTP ciclohidrolase II (RibBA). Estas enzimas estão envolvidas na síntese de riboflavina. A análise da seqüência genômica de *A. ferrooxidans* revelou que esta bactéria possui genes para ambas enzimas e que o cDNA clonado correspondia ao gene *ribB*. O gene *ribBA*, amplificado a partir do DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR, foi clonado e seqüenciado. Outro cDNA apresentou similaridade significativa com proteínas *heat shock* da super-família α-HSP. A análise do genoma não anotado de *A. ferrooxidans* indicou a presença de outras duas prováveis ORFs que codificam α-HSPs. A expressão dos cDNAs e do gene *ribBA* foi analisada em várias condições de estresse através de *slot blot* de RNA. A morfologia de *A. ferrooxidans* LR foi analisada através de microscopia de força atômica (AFM). Células de *A. ferrooxidans* cultivadas em meio sem fosfato sofrem drásticas alterações em sua superfície. As células crescidas em condições controle possuíam superfícies lisas, ao passo que células submetidas à privação de fosfato apresentaram superfícies irregulares. As células cultivadas em meio sem fosfato são mais largas e em média três vezes maiores que células cultivadas nas condições controle.

SUMMARY

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative, diazotrophic, strictly, autotrophic and chemolithotrophic bacterium which can oxide Fe^{2+} and S^0 in its metabolism. *A. ferrooxidans* is an economically important bacterium, being a member of bacteria consortia involved in bioleaching, a process in which metals are solubilized from ores as a result of the action of microorganism's communities. Phosphate is a possible limiting factor for *A. ferrooxidans* growth in bioleaching environments, nonetheless, little is known about this bacterium molecular and morphological response to phosphate starvation. The Brazilian strain *A. ferrooxidans* LR was used in the study of differentially expressed genes and morphological alterations under phosphate starvation growth conditions. Growth curve experiments were used to determine experimental conditions to the RAP-PCR experiments. The obtained bands had their differential expression confirmed through DNA slot blot experiments. The most strongly induced phosphate stress expressed cDNAs were cloned and sequenced. Three of theses cDNAs were significantly similar to the enzyme 3,4-dihydroxi-2-butanone 4-phosphate synthase (DHBP synthase – RibB) and to the RibB domain of bifunctional DHBP synthase / GTP ciclohydrolase enzymes. These enzymes are part of the riboflavin synthesis pathway. The *ribBA* gene was sequenced and cloned. Another cDNA was significantly similar to heat shock proteins of the α-HSP super-family. The non-annotated *A. ferrooxidans* genome analysis resulted in the identification of two other ORFs coding for α-HSP proteins in this bacterium. The expression of the identified cDNAs and the *ribBA* gene on other stress conditions was studied with RNA slot blot. Atomic Force Microscopy (AFM) was used to study the morphological response of *A. ferrooxidans* LR to phosphate starvation. Phosphate starved cell showed drastically altered surfaces. Control cells had smooth surfaces, conversely, phosphate limited cells had highly irregular surfaces. Cells grown on the absence of phosphate were wider and, on average, three times larger than control cells.

INTRODUÇÃO

1- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Características Gerais

Filogeneticamente o gênero *Acidithiobacillus* está situado no Domínio *Bacteria*, filo Proteobacteria, subclasse *γ-proteobacteria* (Kelly & Wood, 2000); o mesmo subgrupo de famílias muito bem caracterizadas de bactérias heterotróficas como Enterobacteriaceae, Pseudomoniaceae, e Vibroniaceae. O gênero *Acidithiobacillus* compreende as espécies: *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus albertensis*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Este gênero foi criado em uma revisão filogenética do gênero *Thiobacillus*, que mostrou ser polifilético (Kelly & Wood, 2000). Estes autores, baseados em dados anteriores, alertaram para o fato de que espécie *A. ferrooxidans* possui considerável variabilidade genética, fato posteriormente confirmado em outros estudos (Paulino *et al.* 2001; Karavaiko *et al.*, 2003).

A. ferrooxidans (Kelly & Wood, 2000) são bacilos não patogênicos, Gram negativos com flagelos polares; mesofílicos, com temperatura ótima de crescimento de aproximadamente 30°C; acidofílicos, com pH ótimo variando em torno de 2,0. Seu metabolismo é diazotrófico, além de estritamente autotrófico e quimiolitotrófico, podendo crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings & Kusano, 1994). Entre as diversas linhagens, o conteúdo de GC varia de 55 a 65 % e o genoma possui de 2,2 a 2,9 Mb. *A. ferrooxidans* é isolado de ambientes inorgânicos e acidofílicos como depósitos minerais e efluente ácido de minas (Rawlings, 2002).

Todas as espécies do gênero *Acidithiobacillus* são capazes de obter energia através da oxidação de S^0 e compostos inorgânicos contendo formas reduzidas de enxofre, como sulfitos, sulfetos e tiosulfatos (Leduc & Ferroni, 1994). *A. ferrooxidans* é porém, a única espécie do gênero capaz de obter energia através da oxidação aeróbica de íons Fe^{2+} (Leduc & Ferroni, 1994). Drobner *et al.* (1990), relataram a capacidade de três linhagens de *A. ferrooxidans* (incluindo a tipo) de crescer oxidando H_2 em condições aeróbicas. Em um estudo utilizando seis linhagens de *A. ferrooxidans*, Ohumra *et al.* (2002) observaram que apenas uma delas crescia aerobicamente pela oxidação de hidrogênio. Curiosamente, neste mesmo estudo a linhagem tipo não foi capaz de crescer nestas condições. Há relatos da capacidade de *A.*

ferrooxidans crescer oxidando óxido de urânio (UO_2) (DiSpirito *et al.*, 1982), e sabe-se que *A. ferrooxidans* possui uma enzima capaz de oxidar molibdênio (Sugio *et al.*, 1992).

Não havendo disponibilidade de oxigênio, *A. ferrooxidans* é capaz de realizar respiração anaeróbica com diferentes substratos. Tradicionalmente se aceita que a respiração anaeróbica em *A. ferrooxidans* envolva a oxidação de S^0, utilizando Fe^{3+} como aceptor de elétrons (Pronk *et al.*, 1992 ; Das *et al.*, 1992; Ohmura *et al.*, 2002). Ohmura *et al.* (2002) relataram a capacidade de algumas linhagens crescerem oxidando anaerobicamente H_2 e utilizando S^0 ou Fe^{3+} como aceptor de elétrons. Sugio *et al.* (1988) mostraram que uma enzima envolvida na oxidação anaeróbica de enxofre e na redução de Fe^{3+}, foi também capaz de reduzir Mo^{6+}, Cu^{2+} e Co^{2+}.

2- Aplicações Econômicas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Além de interessante do ponto de vista acadêmico, com sua biologia peculiar, *A. ferrooxidans* possui considerável interesse econômico, ambiental e industrial. Esta bactéria está envolvida na biolixiviação (Leduc & Ferroni, 1994), processo em que metais existentes em minérios na forma de compostos insolúveis são solubilizados pela ação direta ou indireta de uma comunidade de microrganismos (Garcia Jr., 1997). Na biolixiviação direta, sulfetos metálicos são oxidados pelo contato direto das células bacterianas, ou por ação enzimática das mesmas, gerando sulfatos solúveis (Bosecker, 1997). Na biolixiviação indireta, o metabolismo microbiano produz substâncias lixiviantes que oxidam quimicamente os metais, solubilizando-os; no caso de *A. ferrooxidans* os lixiviantes produzidos são o H_2SO_4 e íons Fe^{3+} (Bosecker, 1997). Na prática os dois processos, direto e indireto, ocorrem concomitantemente, em uma série complexa de reações químicas. Todavia, há certa divergência sobre qual dos dois processos é mais importante para a biolixiviação (Liu *et al.*, 2003; Rohwerder *et al.*, 2003).

O processo de biolixiviação é especialmente atraente para a extração de metais de minérios pobres, cuja extração não é economicamente viável pelos métodos piro e hidrometalúrgicos convencionais (Bosecker, 1997; Garcia Jr., 1997). Este processo requer um baixo investimento inicial e de manutenção, não necessita de mão de obra especializada na sua operação e ao contrário do processo pirometalúrgico, não emite SO_2, o agente causador da chuva ácida (Garcia Jr., 1997).

Atualmente, a biolixiviação é utilizada para a obtenção de cobre e urânio (Bosecker, 1997; Rawlings, 1998; Brierley & Brierley, 2001), sendo este processo responsável por respectivamente, 15% e 13% da produção mundial destes metais. Há casos isolados de utilização do processo de biolixiviação para a obtenção de cobalto (Brierley & Brierley, 2001) e zinco (Rawlings *et al.*, 2003). A extração de níquel já foi demonstrada em escala piloto, e este metal deve ser o próximo a ser obtido, em escala industrial, por meio da biolixiviação (Brierley & Brierley, 2001; Olson *et al.*, 2003). Em escala laboratorial, já foi demonstrada a obtenção de molibdênio, gálio e chumbo (Brierley & Brierley, 2001). A biolixiviação é também utilizada industrialmente para o tratamento de minérios refratários de ouro, aumentando consideravelmente o rendimento do processo de obtenção deste metal. Cerca de 25% da produção mundial de ouro é obtida de minérios submetidos a este processo (Brierley & Brierley, 2001; Olson *et al.*, 2003). No Brasil, a mina de São Bento, em Minas Gerais, utiliza a biolixiviação para o tratamento de minerais refratários de ouro, sendo tratados cerca de 150 toneladas de minério por dia (Rawlings *et al.*, 2003).

A. ferrooxidans pode ser, ainda, útil na remoção de metais pesados freqüentemente presentes em esgotos. Isto pode permitir que os altos níveis de nitrogênio e fósforo presentes nos esgotos sejam utilizados na fertilização agrícola (Lombardi & Garcia Jr., 1999). Lombardi & Garcia Jr. (2002) relataram que a utilização de *A. ferrooxidans* no tratamento de esgotos municipais, aumentou a eficiência da extração de manganês, zinco, cobre e alumínio. Solisio *et al.* (2002) utilizaram, em escala laboratorial, *A. ferrooxidans* para lixiviar zinco e alumínio de rejeitos de indústrias metalúrgicas.

A. ferrooxidans pode ser utilizado também no processo de desulfurização do carvão. Durante a combustão do carvão, compostos sulfurosos são convertidos em SO_2, composto causador de chuva ácida. Oxidando pirita (FeS_2), *A. ferrooxidans* remove de 90 a 98% do enxofre presente em variedades de carvão mineral ricas neste sulfeto metálico (Hoffmann *et al.*, 1981).

Uma vez que resultam direta ou indiretamente do metabolismo de *A. ferrooxidans*, a qualidade e rapidez dos processos industriais em que esta bactéria é utilizada dependem de seu crescimento (Bosecker, 1997). Infelizmente *A. ferrooxidans* possui uma taxa de crescimento muito pequena de modo que, muitas vezes, isto representa uma séria limitação de seu uso em atividades industriais, que requerem processos continuamente mais eficientes, rápidos e baratos (Rawlings & Kusano, 1994). Além disto, os processos não podem sempre ser conduzidos nas

condições ótimas de crescimento de *A. ferrooxidans*, pois durante a biolixiviação, esta bactéria está sujeita a vários estresses (Varela *et al.*, 1998). Sabe-se que em ambientes de biolixiviação a disponibilidade de fosfato é um possível fator limitante ao crescimento bacteriano, pois este composto pode estar presente nos minérios em formas insolúveis e não disponíveis aos microrganismos (Varela *et al.*, 1998). O *status* nutricional de *A. ferrooxidans* em relação ao fosfato é particularmente importante em ambientes com altas concentrações de arsenato (Vera *et al.*, 2003). Isto ocorre porque o arsênio é um análogo estrutural do fosfato, podendo entrar nas células através dos sistemas de alta eficiência de captação de fosfato, potencializando o efeito tóxico deste elemento (Van Veen, 1997).

Bosecker (1997), enumerou fatores que afetam o processo de biolixiviação: a disponibilidade de nutrientes; suprimento de O_2 e CO_2; pH e temperatura; a constituição e superfície total de contato do substrato; a presença de metais pesados e por fim, a presença de surfactantes e compostos orgânicos, que inibem o crescimento de *A. ferrooxidans*. Estes fatores podem, em sua maioria, ser estendidos às outras utilizações de *A. ferrooxidans*, citadas acima. É interessante notar que, de uma maneira ou de outra, todos os parâmetros citados por Bosecker (1997) afetam o crescimento de *A. ferrooxidans*.

Rawlings e Kusano (1994) citaram duas abordagens para lidar com as limitações do crescimento de *A. ferrooxidans*. A primeira seria otimizar, empiricamente, as condições de crescimento desta bactéria. Poderia-se, por exemplo, adicionar nutrientes ao tanque de biolixiviação, ou controlar o pH pela adição de compostos ácidos ou alcalinos. Outra abordagem, mais fundamental, consistiria em se obter um conjunto de informações básicas acerca de vários aspectos da biologia de *A. ferrooxidans*. Deste modo seria possível modificar e/ou selecionar determinadas linhagens, ou ainda, desenvolver tecnologias com o objetivo de otimizar os processos em que *A. ferrooxidans* está envolvida. O estudo dos mecanismos de resistência a metais pesados poderia, por exemplo, resultar na construção de linhagens mais resistentes; ou até transformar uma linhagem sensível em uma linhagem resistente. Neste contexto, o estudo dos mecanismos moleculares de resposta aos diversos tipos de estresse sofridos por *A. ferrooxidans* durante o processo de biolixiviação é de importância primária.

3- *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Biologia Molecular e Resposta ao Estresse

3.1- Genética e molecular

Há uma quantidade considerável de informações básicas sobre a genética molecular de *A. ferrooxidans*. Vários plasmídeos e transposons foram estudados (Rawlings & Kusano, 1994; Holmes *et al.*, 2001; Dominy *et al.*, 1997). Estes elementos são semelhantes a vários plasmídeos e transposons já conhecidos, mas, curiosamente, notou-se a ausência de marcadores selecionáveis como resistência a antibióticos (Rawlings & Kusano, 1994). Provavelmente devido a seu modo de vida único, *A. ferrooxidans* seja bastante recalcitrante a manipulações genéticas convencionais. Com considerável dificuldade e baixa eficiência, foram realizados experimentos de conjugação (Peng *et al.*, 1994) e transformação por eletroporação (Kusano *et al.*, 1992). Zhenying *et al.* (2000), conseguiram obter mutantes *recA* por meio de mutagênese de troca de marcadores. Seu crescimento lento e baixa produtividade celular dificultam a obtenção de massa celular necessária para vários experimentos, como a obtenção de enzimas para a realização de ensaios bioquímicos (Valdés *et al.*, 2003).

Uma seqüência de baixa redundância do genoma de *A. ferrooxidans* foi analisada e anotada por Selkov *et al.* (2000). Foram encontradas 2.712 ORFs (*open reading frames*),, sendo determinadas funções putativas para 80% destas. Estes números, assim como a densidade média de ORFs (1 ORF para cada 963 pares de base) são semelhantes aos encontrados nos projetos genoma de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Selkov *et al.*, 2000). Infelizmente esta seqüência e sua análise não estão disponíveis para a comunidade científica, sendo parte de um banco de dados vendido por uma empresa de capital privado, a *Integrated Genomics*. Por outro lado, o TIGR – *The Institute of Genomics Research*, http://www.tigr.org/ – disponibiliza, embora sem anotação, uma seqüência completa do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T. Esta seqüência serviu como base para alguns estudos recentes de caracterização de genes e operons em *A. ferrooxidans* (Yarzábal *et al.*, 2002; Ramirez *et al.*, 2002; Levicán *et al.*, 2002). Estes dados também têm sido utilizados como ponto de partida para o estudo de alguns aspectos mais complexos da biologia de *A. ferrooxidans*, tais como mecanismos de captação, assimilação e metabolismo de enxofre (Valdés *et al.*, 2003).

O operon que controla a assimilação de enxofre durante a produção de cisteína em *A. ferrooxidans* parece possuir uma organização semelhante ao de *Escherichia coli* (Rawlings & Kusano, 1994). Baseados em uma análise da seqüência não anotada do genoma de *A.*

ferrooxidans, Valdés *et al.* (2003) identificaram genes envolvidos na captação, assimilação e metabolismo geral de enxofre. Com os genes identificados, estes autores propuseram modelos para o metabolismo de enxofre neste microrganismo, sendo estes bastante semelhantes às vias bioquímicas do metabolismo de enxofre de outros microrganismos. Como seria esperado em um microrganismo com o hábitat de *A. ferrooxidans*, não foram encontrados transportadores envolvidos na captação de enxofre associado a compostos orgânicos como aminoácidos e sulfonatos, como ocorre em vários microrganismos. Contudo, foram encontrados dois transportadores de sulfatos, uma forma inorgânica de enxofre abundante nos hábitats de *A. ferrooxidans*.

Na falta de fontes imediatas de nitrogênio, *A. ferrooxidans* é capaz de assimilar N_2 atmosférico. Uma nitrogenase catalisa a redução de N_2 para amônia e em seguida, uma glutamina sintetase catalisa a incorporação da amônia na forma de L-glutamina (Rawlings & Kusano, 1994). A estrutura, organização e regulação dos genes e operons envolvidos na fixação de N_2 em *A. ferrooxidans* é semelhante à de outras proteobactérias (Pretorius *et al.*, 1986; Rawlings *et al.*, 1987).

A obtenção de carbono em *A. ferrooxidans* ocorre exclusivamente pela assimilação de CO_2, através da atividade da enzima ribulose bifosfato-carboxilase (RuBisCO), que incorpora o CO_2 ao ciclo de Calvin, de maneira bem semelhante a plantas, algas e outras bactérias autotróficas (Holuigue, 1987). Heinhorst *et al.* (2002), identificaram dois genes que codificam a enzima RuBisCO em *A. ferrooxidans*, sendo proposto por estes autores que as duas cópias são resultado da transferência horizontal de genes.

O metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans* tem sido alvo de intensa pesquisa, sendo este um organismo especialmente prolífico na produção de citocromos. Yarzábal *et al.* (2002a), demonstraram que um citocromo *c* de *A. ferrooxidans* localiza-se na membrana externa deste microrganismo, podendo ser o primeiro componente do sistema que oxida Fe^{2+}. Utilizando ferramentas de bioinformática e a seqüência genômica disponível no TIGR, Yarzábal *et al.* (2002), encontraram onze seqüências putativas de citocromos no genoma de *A. ferrooxidans*. A análise de géis SDS-PAGE, associada a métodos de detecção baseados na atividade peroxidase dos citocromos, permitiu que oito destas proteínas fossem diferenciadas, todas associadas às membranas externa ou interna de *A. ferrooxidans* (Yarzábal *et al.*, 2002). Neste mesmo estudo foi demonstrado que durante o crescimento em enxofre, *A. ferrooxidans* produz menor quantidade de citocromos em comparação com o crescimento em ferro. Um citocromo mostrou

ser específico para o crescimento em enxofre e outros três para o crescimento em ferro, o que sugere a existência de mecanismos (ainda desconhecidos), de regulação da expressão destas moléculas em resposta a diferentes condições ambientais. Como seria esperado para um microrganismo rico em citocromos e em substratos para respiração celular, *A. ferrooxidans* possui uma ampla gama de vias de fluxo de elétrons, havendo várias rotas respiratórias possíveis para um único aceptor de elétrons, como o O_2 (Brasseur *et al.*, 2004).

3.2- Resistência a íons metálicos

Devido a seu hábitat e modo de vida (em pHs baixos a solubilidade de metais é maior), *A. ferrooxidans* possui uma resistência natural a vários íons metálicos (Hutchins *et al.*, 1986). Esta resistência pode chegar a concentrações da ordem de 10^{-1} M para alumínio, manganês, cobalto, cobre, níquel, zinco e cromo; 10^{-2} M para urânio e cádmio; 10^{-3} M para molibdênio, selênio, telúrio e arsênio; 10^{-4} M para mercúrio e 10^{-5} M para prata (Hutchins *et al.*, 1986; Leduc & Ferroni, 1994). Entretanto, estes valores podem variar bastante entre as linhagens de *A. ferrooxidans* (Garcia Jr. & DaSilva, 1991).

A resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans* varia, também, em função da fonte de energia utilizada. Quando Fe^{2+} é utilizado para a obtenção de energia para o crescimento, *A. ferrooxidans* pode ser 2000 vezes mais resistente a íons como zinco, níquel e cobre do que células utilizando tiosulfato; células utilizando S^o apresentam valores intermediários de resistência (Tuovinen *et al.*, 1971). Silver & Torma (1974) confirmaram estes resultados testando a susceptibilidade de *A. ferrooxidans* a chumbo, níquel e cobre. Posteriormente, Iwahori *et al.* (2000) demonstraram que a membrana plasmática de algumas linhagens de *A. ferrooxidans* resistentes a mercúrio possuem uma atividade mercúrio-redutase ($Hg^{2+} \rightarrow Hg^0$) Fe^{2+} dependente. Aparentemente, componentes do sistema de oxidação de íons Fe^{2+}, as enzimas citocromo *c* oxidase e rusticianina, estão envolvidas no processo. Utilizando a técnica de RAP-PCR (RNA *arbitrarily primed polymerase chain reaction*), Paulino *et al.* (2002) identificaram alguns genes diferencialmente expressos em *A. ferrooxidans* em resposta a altas concentrações de sulfato de cobre. Entre os genes com expressão intensificada encontrava-se um citocromo *c*, reforçando as evidências de um possível papel desta molécula na resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans*, por um mecanismo ainda desconhecido.

Pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares de resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans*, os mecanismos conhecidos mais profundamente são os da resistência ao

mercúrio e ao arsênio. O operon de resistência ao mercúrio (operon *mer*) de *A. ferrooxidans* foi clonado, e a análise de sua seqüência indicou a presença de um gene que codifica uma proteína transmembrana citoplasmática capaz de transportar íons Hg^{2+} (*merC*) e uma mercúrio redutase citoplasmática NADPH dependente (*merA*), ambas homólogas às existentes em operons *mer* de outras bactérias Gram-negativas (Shiratori *et al.*, 1989). Entretanto, há diferenças entre o operon *mer* de *A. ferrooxidans* e o de outras bactérias: genes tipicamente presentes como *merT*, *merP* e *merD*, estão ausentes (Inoue *et al.*, 1990); há dois genes que codificam a proteína regulatória *merR* (Inoue *et al.*, 1990) e estes estão localizados em um *locus* distante dos genes *merC* e *merA* (Inoue *et al.*, 1991), o que não ocorre em outras bactérias. Por fim, outra grande diferença entre os mecanismos de resistência a mercúrio em *A. ferrooxidans* e os outros já descritos é que a atividade do operon *mer* soma-se a atividade mercúrio-redutase Fe^{2+} dependente da membrana citoplasmática, sendo esta propriedade, até o momento, encontrada exclusivamente em *A. ferrooxidans* (Iwahori *et al.*, 2000).

O operon de resistência a arsênio de *A. ferrooxidans* também diverge de outros conhecidos, tanto pela localização cromossomal quanto por sua estrutura singular, em que alguns dos genes do operon são transcritos em direções opostas (Butcher *et al.*, 2000).

Novo *et al.* (2000) utilizaram eletroforese de proteínas em duas dimensões para investigar a resistência de *A. ferrooxidans* a níquel, zinco, cobre e cádmio. Em geral, a presença destes metais no meio de cultura resultou em repressão na síntese de diversas proteínas. Entretanto, algumas proteínas foram especificamente induzidas por cádmio e cobre. Estes mesmos autores mostraram que o nível de fosforilação de proteínas aumentava na presença de cobre e que a maior parte das proteínas com síntese induzida por este metal localizava-se nas frações de membranas da célula, e não no citosol.

A resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans* possui ainda outra característica interessante: Natarajan *et al.* (1994) e Kondrat'eva *et al.* (1995) demonstraram que através de sucessivos repiques, em crescentes concentrações de íons, pode-se aumentar a resistência de *A. ferrooxidans* aos mesmos. A resistência era perdida com repiques sucessivos na ausência dos metais, sendo sua manutenção, portanto, estresse dependente (Natarajan *et al.*, 1994). Pela análise de padrões de restrição de DNA genômico em eletroforese de campo pulsado, foi detectado que nestas linhagens havia fragmentos de DNA duplicados, sendo sugerido que o aumento da resistência ocorria devido à duplicação de genes de resistência aos respectivos íons metálicos (Kondrat'eva *et al.*, 1995).

3.3- Resposta ao estresse de pH e temperatura

O pH e a temperatura têm grande influência nos processos de biolixiviação. Além de influir no crescimento (e sobrevivência) de *A. ferrooxidans*, o pH baixo é essencial para a solubilização (ionização) de metais (Bosecker, 1997; Lombardi & Garcia Jr., 1999). A temperatura, por outro lado, influi na velocidade das reações químicas que ocorrem durante o processo, particularmente na biolixiviação indireta, em que ocorrem reações químicas sem ação enzimática (Bosecker, 1997; Lombardi & Garcia Jr., 1999).

Hubert *et al.* (1995) demonstraram que após sofrer um choque de temperatura (um *heat shock*), as células de *A. ferrooxidans* sobreviventes adquiriam uma resistência temporária a altas temperaturas. Em *E. coli*, um *heat shock* induz a produção de proteínas denominadas *heat shock proteins* (HSPs) (Arsene *et al.*, 2000). Duas das mais importantes e bem estudadas HSPs são as chaperonas DnaK e GroEL. Homólogos destas proteínas foram encontrados em *A. ferrooxidans* por Varela e Jerez (1992). Estudos em eletroforese de duas dimensões mostraram modificações no padrão geral de proteínas de células de *A. ferrooxidans* durante crescimento em temperatura ótima (30°C) e estressante (41°C).

A eletroforese em géis de duas dimensões foi também utilizada no estudo das proteínas induzidas por modificações do pH do meio de crescimento de *A. ferrooxidans* (Amaro *et al.*, 1990). Foi identificada uma possível porina de 36-kDa cuja síntese era induzida quando as células sofriam um aumento no pH do meio e reprimida quando o pH diminuía (Amaro *et al.*, 1991).

3.4- Resposta ao estresse nutricional de privação de fosfato

Como já foi mencionado, a disponibilidade de fosfato é um possível estresse nutricional para *A. ferrooxidans* e outras bactérias nos ambientes de biolixiviação (Varela *et al.*, 1998). O fósforo é essencial para todos os organismos vivos, pois entra na constituição de ácidos nucléicos e de outros componentes celulares como fosfolípides (Wanner, 1990). A fosforilação de proteínas e a presença de moléculas sinalizadoras com fosfato em sua constituição como o cAMP, (p)ppGpp e polifosfato são importantíssimos nos mecanismos de transdução de sinais e regulação da expressão gênica.

Em 1992, Jerez *et al.* demonstraram que em condições de privação de fosfato o padrão geral de síntese das proteínas de membrana externa de *A. ferrooxidans* era modificado: uma provável porina de 36-kDa (Omp-36) tinha um aumento na síntese, ao passo que outra

provável porina, de 40-kDa (Omp-40) tinha a síntese diminuída em 3 ou 4 vezes. Mais tarde confirmou-se que esta proteína de 40-kDa é a porina majoritária de *A. ferrooxidans*, seu gene foi clonado, seqüenciado e expresso em *E. coli* (Guiliani & Jerez, 2000).

Foi desenvolvida uma metodologia para verificar o estado nutricional de *A. ferrooxidans* em relação à privação de fosfato durante o processo de biolixiviação. Esta é baseada em anticorpos fluorescentes produzidos contra proteínas de membrana externa expressas apenas em condições de privação de fosfato (Varela *et al.*, 1998). Segundo estes autores, a análise química dos minérios é insatisfatória para se verificar a disponibilidade de fosfato, uma vez que o mesmo pode estar presente em precipitados insolúveis. Esta tecnologia poderia ser utilizada para se tomar decisões quanto a adição (ou não) de fósforo aos tanques de biolixiviação.

Foi demonstrado que há um aumento de uma atividade fosfatase ácida em células de *A. ferrooxidans* em privação de fosfato, sendo esta atividade se localizada, provavelmente no periplasma (Seeger & Jerez, 1993). A função da fosfatase ácida é converter o fosfato associado a compostos orgânicos em fosfato inorgânico, uma vez que o fosfato associado a compostos orgânicos não pode ser metabolizado. Seeger & Jerez (1993a) mostraram que a privação de fosfato induz a síntese de pelo menos 25 proteínas em *A. ferrooxidans*. Estas proteínas foram detectadas em géis de eletroforese em duas dimensões. Foi postulado que estas proteínas devam fazer parte de um sistema de alta eficiência de captação de fosfato, como ocorre em várias bactérias heterotróficas (Seeger & Jerez, 1993a). Observou-se ainda, que a privação de fosfato reduz o crescimento, a capacidade de oxidar Fe^{2+} e de fixar CO_2 de *A. ferrooxidans* (Seeger & Jerez, 1993a). Segundo Seeger *et al.* (1996), o padrão geral de fosforilação de proteínas em *A. ferrooxidans* é modificado em condições de privação nutricional de fosfato. As chaperonas DnaK e GroEL, que apresentam maior atividade quando fosforiladas, encontram-se entre as proteínas fosforiladas em privação de fosfato.

Os mecanismos moleculares de resposta à privação de fosfato e ao estresse em geral já estão bem caracterizados, particularmente em *E. coli*. Diferentes estresses ambientais como temperaturas extremas, choque osmótico e privação nutricional (incluindo a de fosfato), geram uma resposta semelhante em *E. coli* (Hengge-Aronis, 1999). Um dos eventos chave desta resposta generalizada ao estresse é o aumento dos níveis da subunidade σ^S da RNA polimerase, e uma concomitante diminuição da concentração da subunidade vegetativa (σ^{70}) (Hengge-

Aronis, 1999). Um grande número de outras moléculas sinalizadoras e reguladores globais estão envolvidos na resposta generalizada ao estresse de *E. coli* (Vicente *et al.*, 1999).

Em *E. coli*, um ambiente com baixos níveis de fosfato inorgânico (na ordem de μM) resultam na indução do regulon fosfato (*regulon pho*), que é reprimido em concentrações mais altas de fosfato inorgânico (Wanner, 1990). Os principais componentes deste regulon são: um sistema regulatório de dois componentes (PhoR-PhoB), um sistema de alta eficiência de captação de fosfato (há um sistema de baixa eficiência, constitutivo); uma porina ânion-específica, PhoE; e um sistema de utilização e captação de fontes alternativas de fosfato, como glicerol 3-fosfato e fosfonatos (moléculas com ligações C-P). O regulon *pho* altera diretamente a expressão de cerca de 30 genes em *E. coli* (Rao *et al.*, 1998) e 20 em *Bacillus subtilis* (Antelmann *et al.*, 2000). Há evidências de que um dos transportadores de fosfato de baixa eficiência em *E. coli* (PitA), antes considerado constitutivo, é reprimido pelo regulon *pho*, fato que não ocorre com o outro transportador de baixa eficiência conhecido, PitB (Harris *et al.*, 2001).

O regulon *pho* parece interagir com o sistema de resposta generalizada ao estresse de *E. coli*: a privação de fosfato nesta bactéria induz a produção de (p)ppGpp, uma importante molécula sinalizadora desta resposta (Rao *et al.*, 1998). Mais recentemente, Ruiz e Silhavy (2003) relataram que em mutantes com expressão constitutiva do *regulon pho*, há aumento da expressão do gene *rpoS* (que codifica σ^S), por um mecanismo dependente de Hfq (outro regulador global de *E. coli*). Isto talvez explique o fato de que, apesar do *regulon pho* ter seu número de genes delimitado em aproximadamente 30 genes, VanBolegen *et al.* (1996) relataram a indução de 118 proteínas e repressão de outras 19 em células de *E. coli* submetidas à privação de fosfato. A análise, através de *microarrays*, dos genes induzidos pela privação de fosfato em *Corynebacterium glutamicum* mostraram a indução de um total de 92 genes, separados em cinco grupos (Ishige *et al.*, 2003). Quatro destes grupos não possuíam genes diretamente relacionados com o metabolismo de fosfato, sendo provavelmente induzidos pela queda das taxas de crescimento resultantes da privação de fosfato. Contudo, um dos grupos composto por 25 genes, apresentou genes claramente relacionados com o regulon *pho*.

Recentemente, Krol & Becker (2004) utilizaram *microarrays* para estudar a resposta de *Sinorhizobium meliloti* a privação de fosfato. Além da comparação entre crescimento em privação e presença de fosfato no meio, foi comparado o perfil de expressão de células selvagens e mutantes que expressam PhoB, fator de transcrição específico do *regulon pho*,

mesmo em condições de abundância de fosfato. Os genes diferencialmente expressos foram separados em três *clusters* diferentes. O primeiro era constituído por genes que mostraram ser regulados diretamente por PhoB, num total de 98 genes. Este *cluster* possuía genes reguladores pertencentes a diferentes famílias, e outros genes conhecidos do *regulon pho*. Genes envolvidos em outras funções como captação de ferro, resposta a estresse oxidativo e, possivelmente, *quorum sensing*, também se encontravam no primeiro *cluster*. O segundo *cluster* era composto de genes diferencialmente expressos na privação de fosfato, mas com regulação PhoB independente. Genes com repressão PhoB independente formavam o terceiro *cluster*. Estes genes (*cluster* 2 e 3), provavelmente têm sua expressão modificada devido a mudanças na taxa de crescimento que ocorrem durante a privação nutricional.

Vera *et al.* (2003), identificaram, através da análise *in silico* da seqüência genômica de *A. ferrooxidans*, ortólogos dos principais genes do regulon *pho* de *E. coli*. De maneira geral, os produtos putativos destas ORFs apresentaram peso molecular semelhante ao de seu ortólogo em *E. coli*. Contudo, foram encontradas variações no ponto isoelétrico teórico de algumas destas proteínas. A organização destes genes também é diferente nas duas espécies, o que possivelmente pode resultar em diferenças na regulação dos mesmos.

O estudo dos genes expressos diferencialmente em condições de privação nutricional de fosfato em *A. ferrooxidans* pode contribuir com a compreensão de alguns aspectos do mecanismo molecular de resposta desta bactéria à privação deste macronutriente. Visto que *A. ferrooxidans* encontra este tipo de situação estressante durante o processo de biolixiviação, o estudo dos mecanismos de resposta ao estresse em *A. ferrooxidans* poderá ajudar a desenvolver bactérias e/ou condições de biolixiviação mais eficientes no futuro. Dada a escassez de estudos morfológicos em *A. ferrooxidans* submetida a condições estressantes, a análise da morfologia desta bactéria frente à privação de fosfato através da microscopia de força atômica (AFM) é de grande interesse, uma vez que investiga um aspecto pouco estudado das adaptações bacterianas a condições estressantes.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

O estudo tem como objetivo a identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente e o estudo das alterações morfológicas em células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* submetidas ao estresse causado pela deficiência de fosfato.

Objetivos Específicos:

- Avaliação do crescimento de *A. ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de fosfato;
- Detecção e isolamento, através de RAP-PCR, de genes expressos diferencialmente em diferentes concentrações de fosfato;
- Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados através de *slot blot* de DNA;
- Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais;
- Análise das seqüências obtidas;
- Caracterização, por *slot blot* de RNA, da expressão dos cDNAs na presença de outros fatores de estresse;
- Análise da morfologia de células de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato, através de microscopia de força atômica (AFM).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Linhagem Bacteriana

A linhagem de *A. ferrooxidans* utilizada nos experimentos foi a LR, isolada de efluente ácido de coluna de lixiviação de minério de urânio em Lagoa Real, Bahia, pelo Dr. Oswaldo Garcia Jr., UNESP – Araraquara.

2- Meio de Cultura

Para o crescimento de *A. ferrooxidans* foi utilizado o meio T&K (Tuovinen & Kelly, 1972), com pequenas modificações. Este meio foi preparado como se segue:

Solução A:

$K_2HPO_4.3H_2O$	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	1,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Água Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado, e em seguida, a solução foi autoclavada a 120°C por 20 min.

Solução B:

$FeSO_4.7H_2O$	167 g
Água Milli-Q	q.s.p. 500 mL

O pH foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado e a solução foi filtrada em membrana (Millipore - 0,45 μm).

Após o resfriamento da solução A, as soluções A e B foram diluídas 1:1 e misturadas na proporção de 4 : 1. Deste modo, as concentrações finais de cada componente foram: 1,75 mM de K_2HPO_4; 1,89 mM de $MgSO_4$; 3,0 mM de $(NH_4)_2SO_4$ e 120 mM de $FeSO_4$.

Para o preparo do meio em condições de estresse nutricional, a fonte de fosfato (K_2HPO_4) foi adicionada em menores quantidades ou omitida.

3- Curvas de Crescimento

Para determinar em quais concentrações de fosfato (K_2HPO_4) seriam realizados os experimentos de RAP-PCR, curvas de crescimento foram realizadas em diferentes concentrações de fosfato. As concentrações de K_2HPO_4 testadas foram: 1,75 mM, 0,875 mM, 0,437 mM, 0,219 mM e 0 mM. A concentração normal do meio T&K (1,75 mM) foi utilizada como controle dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a realização das curvas de crescimento, 0,75 x 10^9células de *A. ferrooxidans* LR, quantificadas por espectrofotometria como descrito por Barron & Lueking (1990), foram inoculadas em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio T&K nas diversas concentrações de fosfato testadas. As culturas foram incubadas em um agitador a 250 rpm a 30°C. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 12 h através da titulação de ferro com dicromato de potássio (Garcia Jr. *et al.*, 1995).

4- Condições de Crescimento Para Obtenção de Massa Celular

Um pré-inóculo de *A. ferrooxidans* LR foi cultivado sob agitação (250 rpm), 30°C, em 600 mL de meio T&K contendo 1,75 mM de K_2HPO_4, até que aproximadamente 90% do ferro do meio de cultura estivesse oxidado. Para obtenção de massa celular suficiente para o isolamento de RNA, um décimo de volume deste pré-inóculo foi inoculado em meio T&K contendo 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4, nas mesmas condições anteriores.

Após o crescimento, as culturas foram filtradas em papel de filtro comum para eliminar os precipitados formados durante o crescimento. A seguir, as células foram coletadas através de filtração em membrana Millipore (0,45 μM), lavadas com água Milli-Q pH 1,8 e estocadas a -70°C.

5- Isolamento de RNA

Todas as soluções utilizadas nesta processo, foram tratadas com dietil pirocarbonato (DEPC), um composto que inibe a ação de RNases. As soluções que contêm Tris não podem ser tratadas diretamente com DEPC e, portanto, estas foram preparadas utilizando-se água previamente tratada com DEPC.

O RNA foi isolado, segundo método descrito por Winderickx & Castro (1994), de células cultivadas em condições controle (1,75 mM) e em privação de fosfato (0 mM). As células obtidas a partir de 600 mL de meio de cultura foram lavadas por 10 vezes com TE (10 mM de Tris, 1mM de EDTA) pH 8,0, e posteriormente suspendidas em aproximadamente 700 µL de tampão de extração: EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M; pH 7,5. Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo SDS 1% e as amostras foram submetidas à agitação por 2 min em um agitador de tubos. Procedeu-se uma centrifugação de 5 min, a 10000 rpm, 6°C; a fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf limpo e extraída novamente com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v). A extração com fenol foi repetida até que não fosse mais possível visualizar a interface.

O RNA foi precipitado através da adição do 1/20 de volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto gelado e em seguida deixado a -70°C por pelo menos 2 horas. As amostras foram centrifugadas por 30 min, a 10000 rpm, 6°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, deixado para secar a temperatura ambiente e solubilizado em 80 µl de água tratada com (DEPC).

Para o tratamento com DNAse, a 80 µl de RNA foram adicionados 19 U de inibidor de RNAse (RNA guard – Amersham Biosciences), 16 U de DNAse (Amersham Biosciences), e tampão de DNAse (concentração final: 7,5 mM de Tris-HCl pH 8,3; 38 mM de KCl e 1,25 mM de $MgCl_2$). As amostras foram incubadas a 37°C por 2 h. Em seguida, foram acrescentados 200 µl de água e efetuada uma extração com 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (75:24:1, v/v/v). O RNA foi precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. O RNA foi mantido a -70°C por no mínimo 2 h. Após centrifugação e lavagem com etanol 70%, as amostras foram ressuspendidas em aproximadamente 20 µl de água tratada com DEPC.

A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas através de eletroforese em gel de de agarose 1% / formaldeído 6% em tampão MOPS 1X (Tampão MOPS 10X: 41,8 g de MOPS; 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; água q.s.p. 1000 mL; pH 7,0).

6- RAP-PCR

Os experimentos de RAP-PCR (RNA *arbitrarily primed polymerase chain reaction*) foram realizados segundo metodologia descrita por Welsh *et al.* (1992) e Wong & McClelland (1994). Foram utilzados os seguintes *primers* (Operon Technologies): OPF01 (ACCGATCCTG), OPJ06 (TCGTTCCGCA) e OPJ14 (CACCCGGATG).

6.1- Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o *kit ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham Biosciences). As *beads* foram ressuspendidas em água DEPC, de modo a deixar a reação com um volume final de 50µl. Em seguida, foram adicionados 1 µg de RNA e o *primer* arbitrário, em quantidade suficiente para uma concentração final de 1 µM. A reação foi incubada por 30 min a 42°C. A transcriptase reversa foi inativada através de incubação a 95°C por 5 min e o cDNA estocado a -20°C.

Dois µl da reação da primeira fita foram utilizados para a síntese da segunda fita de cDNA. Para isto, foi realizada uma amplificação em um volume de reação de 20 µl contendo: 2 µM do *primer* arbitrário utilizado na síntese da primeira fita; tampão da *Taq* polimerase 1X; 1 µM de cada dNTP; aproximadamente 0,1 µM de [α-^{33}P]dATP; 2,75 mM de $MgCl_2$ e 1,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As amplificações foram realizadas em duplicata em um termociclador Perkin Elmer 2400, com 40 ciclos de amplificação em condições de baixa estringência: 94°C por 30 s, 40°C por 2 min, 72°C por 30 s seguidos de uma extensão final a 72°C por 20 minutos.

6.2- Separação dos cDNAs por eletroforese

Os produtos da amplificação (7 µL) foram submetidos a eletroforese em gel de 5% de acrilamida e 50% de uréia. Para isto, as amostras foram misturadas com 5 µl de tampão de carga (60% formamida, EDTA 6,7 mM, 0,025% azul de bromofenol e 0,025% de xileno cianol) e desnaturadas a 80°C por 4 min. Dez µl foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 1320 V e 35 mA, até que se passassem 30 minutos após a saída do corante xileno cianol do gel. Após a eletroforese, o gel foi seco a vácuo sobre uma folha de papel *Whatman* 3 MM e os *fingerprintings* de RNA foram visualizados através de exposição a filme de raios-X.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

7- Isolamento e Reamplificação das Bandas Diferenciais

Os géis secos foram alinhados com as auto-radiografias e as bandas de interesse foram cortadas com um bisturi estéril e colocadas em tubos tipo eppendorf. O DNA foi eluído através de incubação por 20 min a 95°C em 200 µl de água Milli-Q, e precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. O DNA permaneceu a -20°C durante a noite, foi lavado com etanol 70%, deixado para secar a temperatura ambiente e suspendido em 10 µl de água.

Quatro µl do DNA eluído foram amplificados novamente em uma reação com volume final de 40 µl contendo: 1 µM do *primer* arbitrário; tampão da *Taq* polimerase 1X; 0,2 mM de cada dNTP; 2,75 µl de $MgCl_2$; 2,5 U de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As amplificações foram realizadas através de 40 ciclos de amplificação em baixa estringência (94°C por 30 s, 40°C por 2 min, 72°C por 30 s), seguidos de uma extensão final de 30 minutos a 72°C. As amostras reamplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação do tamanho e quantificação através de comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi$174/*Hae* III (Invitrogen). As bandas que apresentaram contaminação com fragmentos de tamanho diferente do esperado foram purificadas com o *kit Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL).

8- *Slot Blot* de DNA

A expressão diferencial das bandas isoladas por RAP-PCR foi confirmada por *slot blot* de DNA (Xu *et al.*, 1997).

8.1- Transferência das bandas diferenciais para membranas de nylon

Dez ng de DNA de cada banda diferencial foram diluídos em TE (volume final de 200 µl) e desnaturados a 95°C por 10 min e colocados em gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µl de SSC 20 X e as amostras foram transferidas, com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL), para membranas de *nylon* (Hybond-N, Amersham Biosciences) previamente umedecidas em SSC 10 X. Após a transferência das amostras para a membrana, os *slots* foram lavados com 500 µl de SSC 10 X. A membrana foi seca à temperatura ambiente e o DNA fixado a 80°C por 2 h. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

8.2- Hibridização das membranas

As membranas foram hibridizadas utilizando-se como sonda os cDNAs obtidos a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas na condição controle (1,75 mM de K_2HPO_4) e em privação de fosfato (0 mM de fosfato). As sondas foram quantificadas em gel de 2% de agarose, através de comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi174$/*Hae*III (Invitrogen). Aproximadamente 30 ng das sondas foram marcadas com [α-^{32}P]dCTP utilizando-se o *kit Megaprime DNA labelling system* (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. Para remoção dos nucleotídeos não incorporados foi utilizado o *kit Probe Quant*^{TM} G-50 (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por aproximadamente 6 h em solução contendo: formamida deionizada 50%, SSC 5 X, Denhardt's 10 X, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL. As membranas foram hibridizadas a 42°C durante a noite em: formamida deionizada 50%, SSC 5 X, Denhardt's 2 X, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, sulfato de dextrano 5%, DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL e 10^7-10^8 cpm/mL da sonda desnaturada. Após a hibridização, as membranas foram lavadas a temperatura ambiente por duas vezes, 15 minutos cada vez, em solução contendo SSC 2 X e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas duas vezes (30 minutos cada vez), a 60°C, em solução contendo SSC 0,1 X e SDS 0,1%. As membranas foram expostas pelo tempo necessário a filmes de raios-X (Amersham Biosciences ou Fujifilm), a -70°C.

8.3- Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot*

Os sinais de hibridização obtidos foram digitalizados e quantificados com o auxílio do programa *Kodak Digital Science 1D* v.2.0.3. Todo o experimento foi realizado em duplicata. O coeficiente de expressão (CE) (Paulino *et al.* (2002) de cada banda foi obtido dividindo-se a média do valor do sinal de hibridização em privação de fosfato pela média do valor obtido em condições controle. Deste modo, as bandas com CE acima de 1 representam genes induzidos pelo estresse de privação de fosfato, ao passo que as bandas com CE abaixo de 1 representam genes com expressão reprimida pela privação de fosfato.

9- Clonagem e Seqüenciamento dos cDNAs

Entre as bandas cuja expressão diferencial foi confirmada por *slot blot* de DNA, foram selecionadas para clonagem as que apresentaram os maiores coeficientes de expressão (CE). Os cDNAs foram amplificados e clonados no vetor pGEM-T *Easy* (Promega), seguindo-se as especificações do fabricante. Células de *E. coli* DH5α foram transformadas com estes vetores.

Os clones obtidos foram avaliados através de extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), seguida de digestão com *Eco*RI. Os produtos destas digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, para confirmação do tamanho dos insertos.

Três clones de cada cDNA foram selecionados para seqüenciamento. O DNA plasmidial destes clones foi isolado utilizando-se os *kits* *Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) ou *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações de cada fabricante. Foram preparadas reações de seqüenciamento com o *kit Sequencing Big Dye*™ (Perkin Elmer). O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer).

10- Análise de Seqüências e Anotação de Genes no Genoma não Anotado de *A. ferrooxidans*

As seqüências dos produtos de RAP-PCR obtidas foram submetidas a análise de similaridade com o banco de dados de seqüências do GenBank e com o genoma não anotado de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270^T fornecido pelo TIGR – Unfinished Microbial Genomes (http://www.tigr.org/tdb/ufmg/). As análises foram realizadas através dos algoritmos BLAST v.2.2.8 (Altschul *et al.*, 1997). As seqüências que apresentaram similaridade significativa com o genoma de *A. ferrooxidans* e com alguma seqüência do GenBank foram anotadas provisoriamente como genes de *A. ferrooxidans*.

Seqüências protéicas derivadas dos genes de interesse foram obtidas no banco de dados COG (*Cluster of orthologou groups*; Tatusov *et al.*, 2001). Em seguida, estas seqüências foram comparadas com o genoma de *A. ferrooxidans* 23270^T através do algoritmo TBLASTN.

As seqüências das regiões genômicas constituídas pelos *loci* com maior similaridade com os COGs ou com os produtos de RAP-PCR, acrescidas de 500 pb nas regiões 3'e 5', foram obtidas. Em seguida, estas seqüências foram submetidas à análise nos programas ORF Finder (http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html) e FGENESB (http://www.softberry.com /berry.phtml?topic=fgenesb). As seqüências de proteínas derivadas das OFRs previstas por estes programas foram submetidas a um BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) e à análise do programa COGnitor (Tatusov *et al.*, 2001), e foram comparadas com o banco de dados de famílias e domínios protéicos PROSITE (Hulo *et al.*, 2004) e PFAM (Bateman *et al.*, 2004). As ORFs cujos produtos apresentaram similaridade significativa com o banco de dados do GenBank e cujo resultado foi confirmado pela análise no PROSITE/PFAM foram anotadas como genes em *A. ferrooxidans*.

Parâmetros físico-químicos das seqüências proteícas derivadas das ORFs foram calculados com o programa ProtParam (http://au.expasy.org/tools/protparam.html). O programa PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) foi utilizado para predição de estrutura secundária das seqüências obtidas. Alinhamentos múltiplos de seqüências foram realizados com o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Para a construção de alinhamentos par-a-par foi utilizado o programa Jalview (http://www.jalview.org/).

11- Amplificação do gene *ribBA* a Partir de DNA Genômico de *A. ferrooxidans*

Os desenho de *primers* para a amplificação do gene *ribBA* à partir de DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR foi realizado com o auxílio do programa Web Primer (http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer). Foram desenhados *primers* que amplificassem os genes de interesse exatamente do primeiro ao último códon. A análise de parâmetros como conteúdo de GC, Tm, e da existência de possíveis estruturas secundárias e/ou formação de dímeros foi realizada com o programa Gene Runner (http://www.gennerunner.com). A especificidade dos *primers* foi avaliada através de um BLASTN (*Word Size* = 7) contra a seqüência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen Brasil.

Para a amplificação do gene *ribBA* de *A. ferrooxidans,* foram utilizados os *primers* ribBA_f, com 23 pb (5´-ATGAGCAGTGCCAGTATAAGTTC-3´) e ribBA_r, com 20 pb (5´-

TCATGACTCATCCTCGGGAA-3´). Foi utilizado o seguinte ciclo de amplificação: Denaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; 30 minutos de extensão final a 72°C. A cada reação, com um volume final de 20 µl, foram adicionados aproximadamente 50 ou 100 ng de DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR e 2,5 U da *Taq* polimerase (Amersham Biosciences). As concentrações finais de $MgCl_2$, de cada dNTP e de cada *primer* foram respectivamente 1,5 mM, 20 µM e 4 pM.

12- *Slot Blot* de RNA

Os experimentos de s*lot blot* de RNA foram realizados segundo metodologia descrita por Fleming *et al.* (1998), com modificações.

12.1- Transferência do RNA para membranas de nylon

Três µg de RNA isolado de *A. ferrooxidans* LR, crescidas nas condições de estresse a serem estudadas, foram transferidos para membranas de *nylon* (Hybond-N – Amersham Biosciences). Para isto, o RNA foi diluído em TE, em um volume final de 12,5 µL. Em seguida, foram adicionados 3 volumes de tampão, recém preparado (500 µL de formamida, 100 µL de MOPS e 162 µL de formaldeído 37%). As amostras foram deixadas por cinco minutos em um banho a 65°C e em seguida, foram adicionados 50 µL (1 volume) de SSC 20 X. As amostras foram transferidas, com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL), para membranas de *nylon* (Hybond-N, Amersham Biosciences) previamente umedecidas em SSC 10 X. Após a transferência das amostras para a membrana, os *slots* foram lavados com 100 µl de SSC 10 X. A membrana foi seca a temperatura ambiente. Após a secagem completa, o RNA foi fixado a 80°C por 2 h.

12.2- Hibridização das membranas

As membranas foram hidridizadas com sondas radioativas obtidas a partir dos cDNAs ou genes amplificados de interesse. As sondas foram quantificadas em gel de 2% de agarose, através de comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi174$/*Hae*III (Invitrogen). Aproximadamente 30 ng das sondas foram marcadas com [α-^{32}P]dCTP utilizando-se o *kit Megaprime DNA labelling system* (Amersham Biosciences) ou o *kit Random Primers DNA Labelling System* (Invitrogen), de acordo com as especificações dos fabricantes. Para

remoção dos nucleotídeos não incorporados foi utilizado o *kit Probe Quant*^{TM} G-50 (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por aproximadamente 6 h em solução contendo: formamida deionizada 50%, SSC 5 X, Denhardt's 10 X, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL. As membranas foram hibridizadas a 42°C durante a noite em: formamida deionizada 50%, SSC 5 X, Denhardt's 2 X, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, sulfato de dextrano 5%, DNA de esperma de salmão desnaturado 100 µg/mL e 10^7-10^8 cpm/mL da sonda desnaturada. Após a hibridização, as membranas foram lavadas a temperatura ambiente por duas vezes, 15 minutos cada vez, em solução contendo SSC 2 X e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas pelo menos duas vezes (30 minutos cada vez), a 60°C, em solução contendo SSC 0,1 X e SDS 0,1%. As membranas foram expostas pelo tempo necessário a filmes de raios-X *Hyperfilm MP* (Amersham Biosciences), a -70°C.

12.3- Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *slot blot*

O sinal de hibridização de cada banda foi quantificado utilizando-se o programa *Kodak digital science 1D* v.2.0.3. Em seguida, a sonda foi removida das membranas através de lavagem com solução fervente de SDS 0,1%. As membranas lavadas foram hibridizadas com o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. Os dados foram normalizados através da divisão dos sinais de hibridização pelos respectivos sinais de hibridização do 16S. Para análise dos resultados, o valor normalizado do sinal de hibridização no controle foi arbitrariamente considerado igual a um. A expressão nas outras condições foi descrita com o valor relativo de expressão, obtido pela divisão do sinal de hibridização normalizado pelo valor normalizado no controle.

13- Técnicas Padrão de Biologia Molecular

As técnicas padrão de biologia molecular como eletroforese de DNA e RNA, digestão enzimática de DNA, foram realizadas como descrito em Sambrook *et al.* (1989).

14- Condições de Crescimento e Obtenção de Células para Análise por Microscopia de Força Atômica

Para microscopia de força atômica, 0,75 x 10^9células de *A. ferrooxidans* LR foram inoculadas em 600 mL de meio T&K. As células foram cultivadas a 30°C sob agitação de 250 rpm. Como controle, foram utilizadas células crescidas em meio T&K contendo 1,75 mM de K_2HPO_4. Para a privação de fosfato, foram utilizadas células crescidas em meio T&K sem fosfato. Neste caso, foram utilizados dois tipos de pré-inóculo: células crescidas em meio T&K normal e células repicadas por quatro vezes em meio T&K sem fosfato.

O crescimento das células foi monitorado de 12 em 12 horas, através de titulação de ferro com dicromato de potássio. As células foram coletadas durante o meio da fase log, quando aproximadamente 75% do ferro do meio estava oxidado. As culturas foram filtradas em papel de filtro comum e, em seguida, em papel *Whatman* 42 para eliminar precipitados formados durante o crescimento. A seguir, as células foram coletadas através de filtração em membrana Millipore (0,45 µm), lavadas três vezes com água pH 1,8 e em seguida, ressuspendidas em aproximadamente 10 mL de água pH 1,8. Cinco µL desta suspensão celular foram aplicados em *wafers* de silício opticamente polidos ou em mica recém-clivada e deixados para secar a temperatura ambiente.

15- Microscopia de Força Atômica (AFM – Atomic Force Microscopy)

Os experimentos de microscopia de força atômica foram coordenados pelo Prof. Dr. Omar Teschke do departamento de Nanoestruturas e Interfaces do Instituto de Física "Gleb Wataghin", UNICAMP.

Para a obtenção de imagens por microscopia de força atômica, foi utilizado um microscópio TopoMetrix TMX2000. As imagens foram realizadas em ar, no modo de contato. Foram utilizados *cantilevers* de nitreto de silício (Microlever™, tipo B, ThermoMicroscopes) com uma constante de mola k = 0,03 N/m.

As imagens produzidas pela microscopia de força atômica foram visualizadas e analisadas com o programa QTopoMetrix SPMLab v.4.0. Com o auxílio deste programa, foram realizadas medidas das dimensões celulares (comprimento, largura e altura) de aproximadamente trinta células por tratamento. Sempre que possível foram utilizadas células obtidas em mais de um campo de visão (de diferentes regiões da amostra). As medidas foram

realizadas utilizando imagens com o mesmo *scan range*: 20 µm. Foram realizados dois experimentos independentes.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo Dr. Paulo Inácio de Knegt Lopéz de Prado, do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais (NEPAM) da UNICAMP.

A diferença nas médias de cada medida entre as condições de cultivo e os dois experimentos independentes foram testadas com análise de variância de dois fatores. O fator condição de cultivo possuía três estados: controle, cultivo em meio sem fosfato e quatro repiques em meio sem fosfato. O fator réplica possuía duas categorias: experimento um e experimento dois.

Quando a análise de variância indicou diferenças entre as categorias do fator "condições de cultivo", foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey para identificar quais médias eram diferentes. No caso de diferenças entre as réplicas dos experimentos, testes *a posteriori* não foram necessários, pois este fator só tem dois estados. Interações entre os dois fatores não foram significativas para nenhuma das medidas, e, por isto, não foram incluídas no modelo final da ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas com o objetivo de verificar o comportamento de *A. ferrooxidans* LR em diferentes concentrações de fosfato. Mais precisamente, o objetivo era determinar em quais concentrações de fosfato (K_2HPO_4, no meio T&K) esta linhagem teria seu crescimento limitado ou impossibilitado, indicando que a mesma estaria sofrendo um estresse nutricional. A partir destes dados foram escolhidas as condições em que seriam realizados os experimentos de RAP-PCR. O meio T&K possui em sua constituição 1,75 mM de K_2HPO_4, sendo esta concentração utilizada como controle nos experimentos. Para que a bactéria fosse submetida a várias situações diferentes no que concerne à disponibilidade de fosfato, foi analisado seu comportamento durante crescimento em diferentes concentrações deste nutriente: 1,75 mM (controle), 0,875 mM, 0,438 mM, 0,219 mM e 0 mM de K_2HPO_4.

Para monitorar o crescimento bacteriano, o Fe^{2+} presente no meio de cultura foi quantificado através de titulação com dicromato de potássio (Garcia Jr. *et al.*, 1995). Tal método, tradicionalmente utilizado para mensurar o crescimento de *A. ferrooxidans*, foi escolhido porque outros métodos convencionais são de difícil utilização neste microrganismo. *A. ferrooxidans* dificilmente cresce em meio sólido, seu crescimento é inibido pelo ágar comum, sendo necessária a utilização de ágar altamente purificado. Ainda assim, nem todas as linhagens crescem em meio sólido e o crescimento de colônias pode levar até quatro semanas. Mesmo havendo crescimento, as colônias de *A. ferrooxidans* são extremamente pequenas (0,5 mm de diâmetro) o que torna sua contagem muito difícil a olho nu (Harrison, 1984). A utilização de medidas espectrofotométricas também não é viável. Durante o crescimento de *A. ferrooxidans*, o ferro oxidado reage com elementos como oxigênio e fosfato, formando substâncias que interferem nas medidas espectrofotométricas. O método de Barron & Lueking (1990), que consiste em concentrar e lavar as células antes de quantificá-las no espectrofotômetro, exige que volumes consideráveis de cultura sejam utilizados. Além disto, este método, assim como a contagem de células em microscópio e a quantificação de proteínas, é muito laborioso, sendo pouco viável para as condições experimentais propostas: cinco condições de crescimento, analisadas em triplicata.

A figura 1 mostra os resultados do primeiro experimento. Como se pode notar, houve pouquíssima diferença na taxa de oxidação de ferro quando a concentração de fosfato variou de 1,75 a 0,219 mM. A única diferença ocorreu quando nenhuma fonte de fosfato foi adicionada ao meio. Nesta situação, foi necessário quase o dobro do tempo para que houvesse a oxidação completa do ferro (fig. 1).

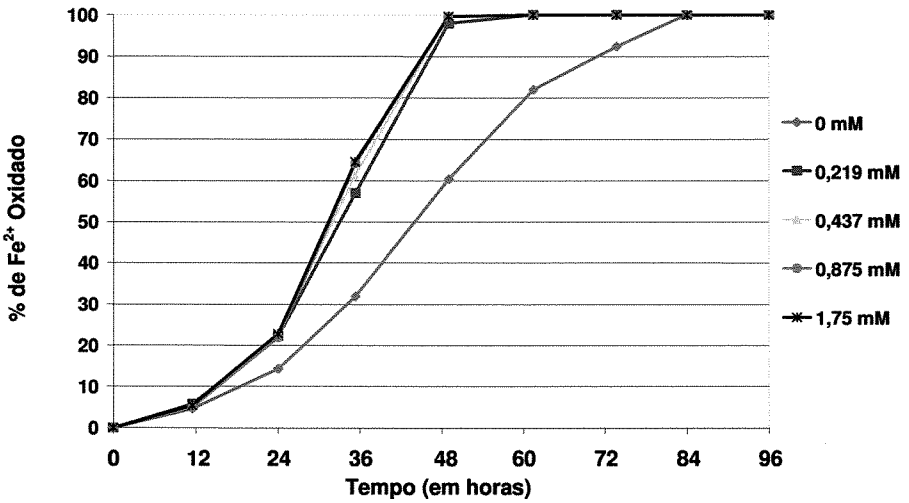

Figura 1: Curvas de crescimento de *A. ferrooxidans* LR na presença de diferentes concentrações de K_2HPO_4 (1,75, 0,875, 0,437, 0,219 e 0 mM).

Como um tempo maior foi necessário para a oxidação completa do ferro do meio de cultura na ausência de fosfato indica, nesta condição, que as células estão sofrendo estresse nutricional por privação de fosfato. Contudo, esperava-se que houvesse pouquíssimo ou até mesmo nenhum crescimento no meio de cultura com 0 mM de K_2HPO_4. Células cultivadas em meio contendo 0 mM de K_2HPO_4 foram capazes de oxidar o ferro, indicando que *A. ferrooxidans* possui alguma forma de reserva de fosfato.

Diversos organismos utilizam polifosfatos como reserva de fosfato. Estas moléculas são compostas por dezenas ou até milhares de resíduos de Pi (fosfato inorgânico) ligados por ligações fosfoanidrido, sendo encontradas em quase todos os organismos vivos em que foram procuradas (Kornberg *et al.*, 1999). Alvarez *et al.* (2001) confirmaram a existência de moléculas de polifosfato em *A. ferrooxidans*, relatando que esta bactéria possui grande capacidade de acumular estas moléculas. Anteriormente, Seeger e Jerez (1993) apresentaram evidências de que *A. ferrooxidans* possuia reservas de fosfato. Neste estudo, o crescimento de *A. ferrooxidans* em meio sem fosfato, resultou em um decréscimo de apenas quatro vezes no

número de células, em comparação com células cultivadas na presença de fosfato. Após um novo repique em meio sem fosfato, foram observadas diferenças significativas entre a capacidade de oxidar ferro e o número de células (duas ordens de grandeza) quando se comparava células cultivadas na presença e na ausência deste nutriente (Seeger & Jerez, 1993). Isto mostra que nestas condições tais células estavam sofrendo um maior efeito dà privação nutricional de fosfato, provavelmente devido a depleção de reservas resultante do cultivo prévio na ausência de fosfato.

Uma vez que para se obter células para o primeiro experimento foi utilizado um pré-inóculo em meio T&K contendo a concentração de 1,75 mM de K_2HPO_4, existia a possibilidade de que estas células tivessem armazenado fosfato durante seu crescimento nestas condições favoráveis. Com o objetivo de tentar minimizar o efeito de quaisquer reservas de fosfato no crescimento das células de *A. ferrooxidans*, foram realizadas novas curvas de crescimento. Inicialmente foi utilizado um pré-inóculo crescido em meio T&K sem fosfato. Células do pré-inóculo foram inoculadas em meio T&K nas mesmas concentrações de fosfato presentes na primeira curva de crescimento: 0, 0,219, 0,437, 0,875 e 1,75 mM. O resultado da curva foi idêntico ao do primeiro experimento. Deste modo, foi realizada uma curva de crescimento utilizando um pré-inóculo repicado duas vezes em meio sem fosfato. Mais uma vez, não foi possível constatar diferenças no crescimento entre as várias concentrações de fosfato testadas e o crescimento na ausência de fosfato foi praticamente idêntico ao dos outros experimentos.

Assim, foi realizado um último experimento de curva de crescimento. Desta vez com pré-inóculo constituído por células repicadas três vezes em meio sem fosfato. O resultado da curva obtida após este tratamento é mostrado na figura 2.

Pode-se observar um *lag* de doze horas sem oxidação de ferro, indicando que após vários repiques em meio sem fosfato as reservas deste nutriente estavam severamente comprometidas. Após o *lag*, em todas as condições testadas, houve um período (entre 12 e 24 horas) de oxidação lenta do ferro. Todavia, decorridas 24 horas de crescimento, a oxidação de ferro ocorreu de maneira bem semelhante à observada nos experimentos anteriores: 80% do ferro foi oxidado em apenas 36 horas (na presença de fosfato) e em 60 horas (na ausência de fosfato). Em 0 mM de fosfato a oxidação total do ferro ocorre após 108 horas de crescimento (não mostrado no gráfico).

Inicialmente, esperava-se que fosse possível diferenciar o crescimento da bactéria nas diferentes concentrações de fosfato utilizadas. Contudo, nos diversos experimentos realizados não houve diferenças na oxidação de ferro entre as células crescidas em 0,219, 0,437, 0,875 e 1,75 mM de fosfato (figs. 1 e 2). Logo, é razoável concluir que, nestas concentrações, o fosfato não é um fator limitante ao crescimento bacteriano. De fato, outro meio tradicionalmente usado no crescimento de *A. ferrooxidans*, o meio 9K, possui apenas um décimo da concentração de fosfato presente no meio T&K. Em um dos primeiros estudos sobre o crescimento de *A. ferrooxidans*, Beck & Shafia (1964) relataram que suspensões celulares de *A. ferrooxidans* apresentaram capacidade crescente de oxidar ferro quando a concentração de fosfato na suspensão aumentou de 10 para 80 μM. Sabe-se que em *E. coli* o *regulon pho* é induzido quando a concentração de fosfato inorgânico é da ordem de μM. Neste contexto, a ausência de diferenças na oxidação de ferro entre células crescidas entre 0,219 e 1,75 mM é perfeitamente compreensível.

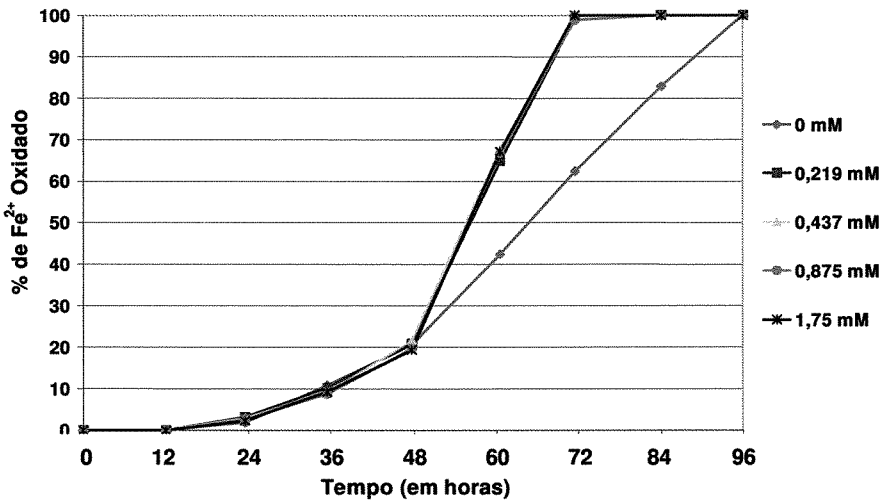

Figura 2: Curvas de crescimento de *A. ferrooxidans* LR na presença de diferentes concentrações de K_2HPO_4 (1,75, 0,875, 0,437, 0,219 e 0 mM). Antes do inóculo das curvas foram feitos três repiques da bactéria em meio T&K com 0 mM de K_2HPO_4. Em 0 mM de fosfato chega-se a 100% de ferro oxidado em 108 horas.

Uma vez que em nenhuma das condições estudadas houve grandes diferenças entre o crescimento (oxidação de ferro) em meio contendo fosfato (0,219, 0,437, 0,875 ou 1,75 mM de K_2HPO_4), foram escolhidas as concentrações de 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4 para a obtenção de células para a realização dos experimentos de RAP-PCR. Para otimizar a obtenção de massa

celular, optou-se pelo o pré–inoculo realizado em meio T&K contendo a concentração normalmente utilizada de fosfato (1,75 mM).

2- RAP-PCR

O RAP-PCR vem sendo utilizado com sucesso em um grande número de organismos procarióticos. Shepard & Gilmore (1999) utilizaram RAP-PCR para detectar genes diferencialmente expressos em *Enterococcus faecalis* crescidas em aerobiose e anaerobiose. A maioria dos genes diferencialmente expressos identificados possuía relação com metabolismo de oxigênio. Chia *et al.* (2001) utilizaram a técnica de RAP-PCR para estudar a resposta de *Streptococcus mutans* frente a estresse provocado por baixo pH. Alguns dos genes identificados mostraram-se específicos para este estresse ao passo que outros foram expressos diferencialmente em mais de um tipo de estresse. Bidle & Bartlett (2001) utilizaram RAP-PCR para identificar genes regulados por ToxR (um fator de transcrição) em *Photobacterium profundum*. Para isto foram comparados o padrão de expressão de mutantes *toxR* e células selvagens. Paulino *et al.* (2002) estudaram a resposta de *A. ferrooxidans* LR cultivada em concentrações estressantes de sulfato de cobre. Produtos de RAP-PCR com similaridade significativa com citocromo *c* e com uma enzima envolvida na síntese de tiamina foram induzidos pelo sulfato de cobre. Um cDNA correspondente a enzima RuBisCo e outro similar a uma proteína de membrana foram reprimidos nas mesmas condições. O RAP-PCR já foi empregado também no estudo da expressão diferencial de *Haloferax volcannii*, uma *Archaea* halofílica. Foi estudada a expressão gênica deste microrganismo em resposta a concentrações salinas altas até mesmo para um organismo halofílico (Bidle, 2003). Um dos cDNAs, induzido em alta salinidade, apresentou similaridade com uma *sensor kinase* eucariótica, envolvida na resposta a desnaturação de proteínas, como a que pode ocorrer em altas concentrações salinas.

Os experimentos de RAP-PCR foram realizados com os *primers* OPF01, OPJ06 e OPJ14. Estes *primers* foram escolhidos já que haviam sido utilizados com sucesso no laboratório em outros experimentos de RAP-PCR com *A. ferrooxidans*. Um *primer* adequado para experimentos de RAP-PCR deve, não só produzir bandas diferenciais entre as condições testadas, mas também produzir um padrão de bandas (*fingerprint*) semelhante entre duplicatas do mesmo tratamento, ou seja, deve dar origem a resultados reprodutíveis. A figura 3 mostra os padrões de bandas obtidos nos experimentos de RAP-PCR com os *primers* OPF01 (fig. 3A),

OPJ06 (fig. 3B) e OPJ14 (fig. 3C). Como era esperado, todos os *primers* testados apresentaram bons resultados. Só foram cortadas dos géis as bandas que possuíam intensidade semelhante nas duplicatas dos experimentos de RAP-PCR.

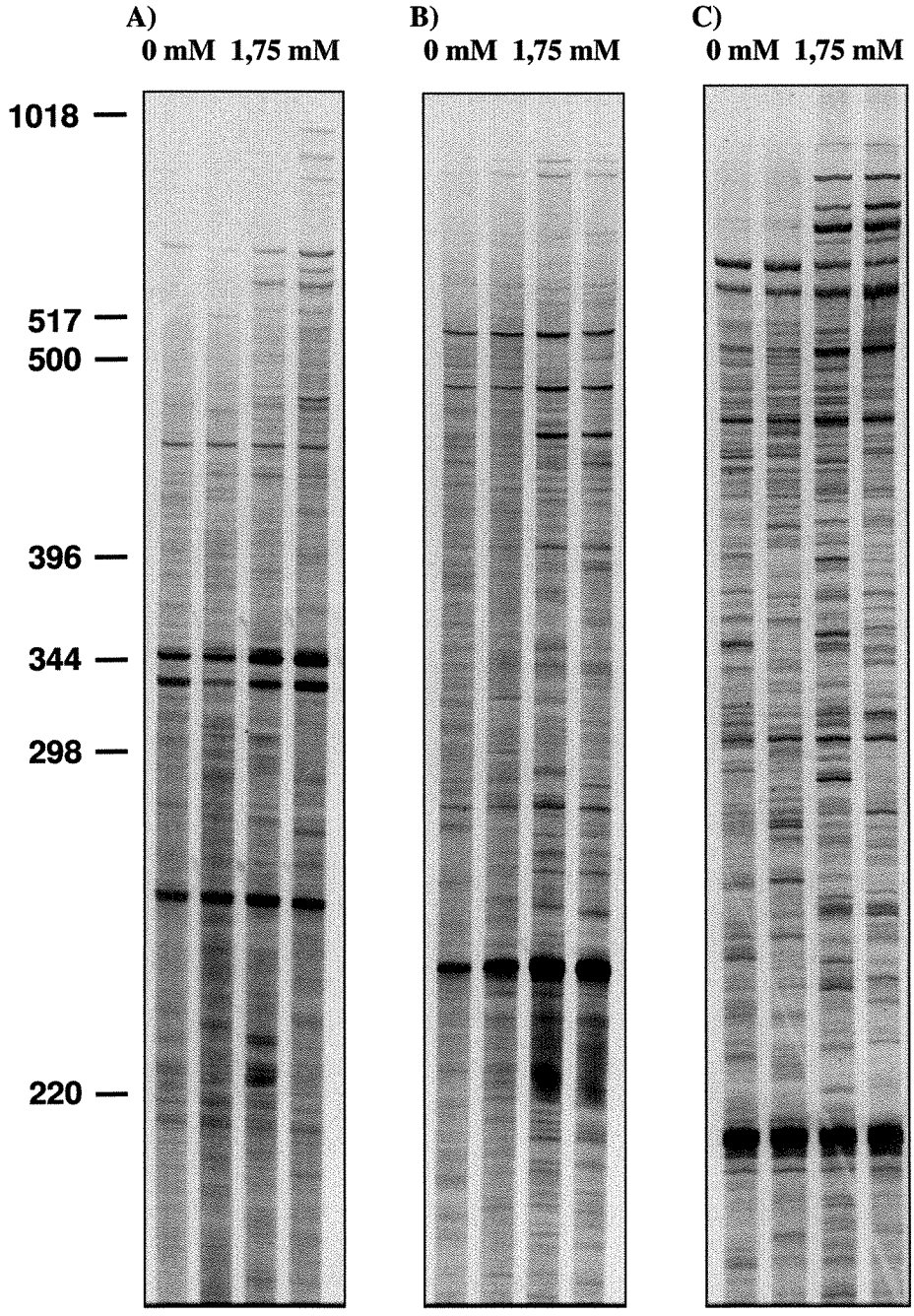

Figura 3: RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* LR cultivadas na presença de 1,75 e 0 mM de K_2HPO_4. Em A foi utilizado o *primer* OPF01; em B, OPJ06 e em C, OPJ14.

Um total de 103 bandas diferenciais, correspondendo a diferentes produtos de PCR foram identificadas. Destas, 21 bandas foram identificadas com o *primer* OPF01, sendo 20 induzidas e 1 reprimida pelà privação de fosfato. O *primer* OPJ06 permitiu a identificação de 42 bandas diferenciais: 38 induzidas e 8 reprimidas pelà privação de fosfato. Quarenta bandas foram identificadas com o *primer* OPJ14, sendo 15 reprimidas e 25 induzidas pelà privação de fosfato.

3- *Slot blot* de DNA

Uma vez que a técnica de RAP-PCR produz um considerável número de falso-positivos, foram realizados experimentos de *slot blot* de DNA para confirmar a expressão diferencial das bandas isoladas. Nem todas as bandas diferenciais isoladas dos géis puderam ser analisadas uma vez que não foi possível reamplificar algumas das bandas. A tabela 1 mostra o número de bandas isoladas com cada *primer* e o número de bandas que tiveram expressão diferencial confirmada nos experimentos de *slot blot* de DNA. Considerou-se como confirmada a expressão de diferencial: bandas induzidas no RAP-PCR que apresentaram CE maior que 1 nos experimentos de *slot* blot de DNA, bandas reprimidas com CE menor que 1 no *slot blot* de DNA.

Tabela 01: Bandas isoladas em experimentos de RAP-PCR e sua confirmação por *slot blot* de DNA.

Primer	**Bandas Isoladas**		**Reamplificadas**		**Expressão diferencial confirmada**	
	Reprimidas	**Induzidas**	**Reprimidas**	**Induzidas**	**Reprimidas**	**Induzidas**
OPF01	01	20	01	13	00	11
OPJ06	04	38	03	28	01	22
OPJ14	15	25	14	16	13	08
Total	20	83	18	57	14	41

Como pode ser observado na tabela 1, aproximadamente 77% das bandas consideradas reprimidas tiveram a expressão diferencial confirmada. Quanto às bandas induzidas pelo

estresse, 72% tiveram a expressão confirmada. Considerando os dados como um todo, aproximadamente 73% das bandas tiveram a expressão diferencial confirmada.

As figuras 4, 5 e 6 mostram os resultados obtidos nos experimentos de *slot blot* de DNA. Nas figuras, as bandas reprimidas pelà privação de fosfato (bandas com expressão mais acentuada no controle) possuem a letra C em sua identificação. As bandas induzidas pelo estresse de privação de fosfato são identificadas pela letra S.

Nas figuras 4B, 5B e 6B, as bandas que tiveram a expressão diferencial não confirmada são mostradas em barras vermelhas e as que tiveram a expressão confirmada são mostradas em barras verdes. Assim, estão em verde as barras com valor maior que um para bandas induzidas e menor que um para bandas reprimidas. Bandas induzidas com CE menor que um e bandas reprimidas com CE maior que um são mostradas em vermelho (bandas cuja expressão diferencial não foi confirmada).

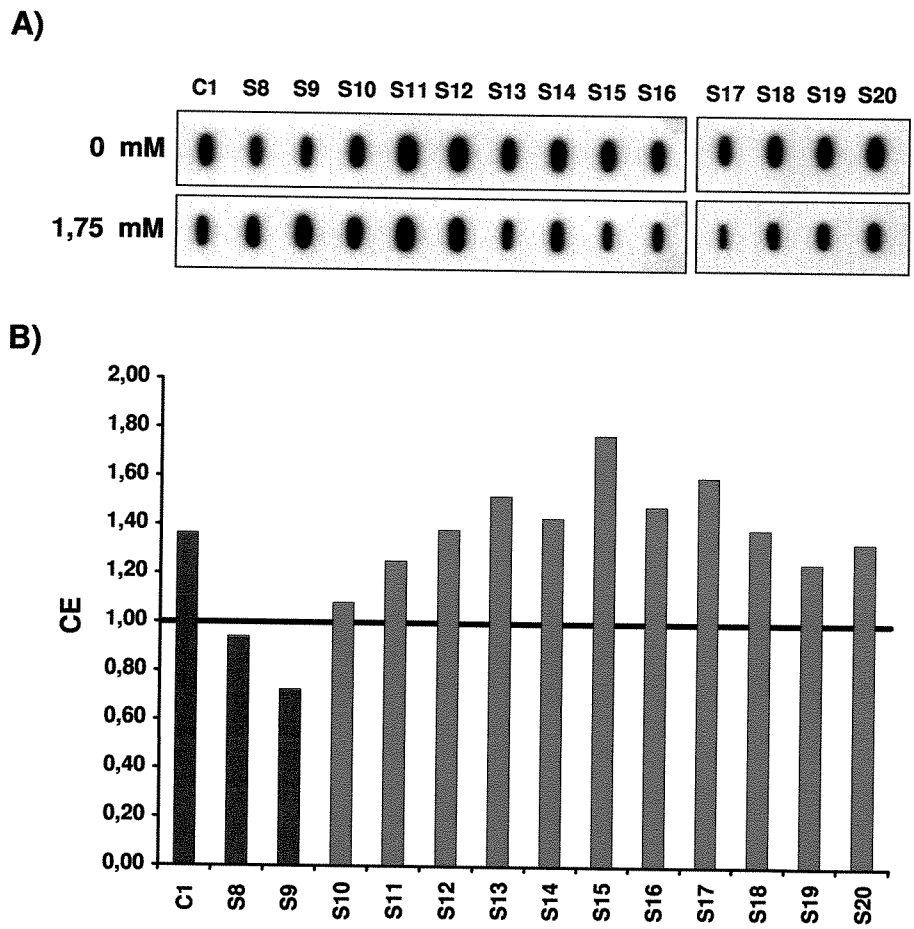

Figura 4: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot* de DNA, das bandas reamplificadas com o *primer* OPF01. A) *slot blot* de DNA hibridizado com sondas de cDNAs obtidos a partir de RNA de células cultivadas em condições de estresse (0 mM de K_2HPO_4) e controle (1,75 mM de K_2HPO_4). B) Coeficientes de expressão (CE), as barras em vermelho indicam bandas que não tiveram a expressão diferencial confirmada e as barras em verde indicam bandas que tiveram a expressão diferencial confirmada.

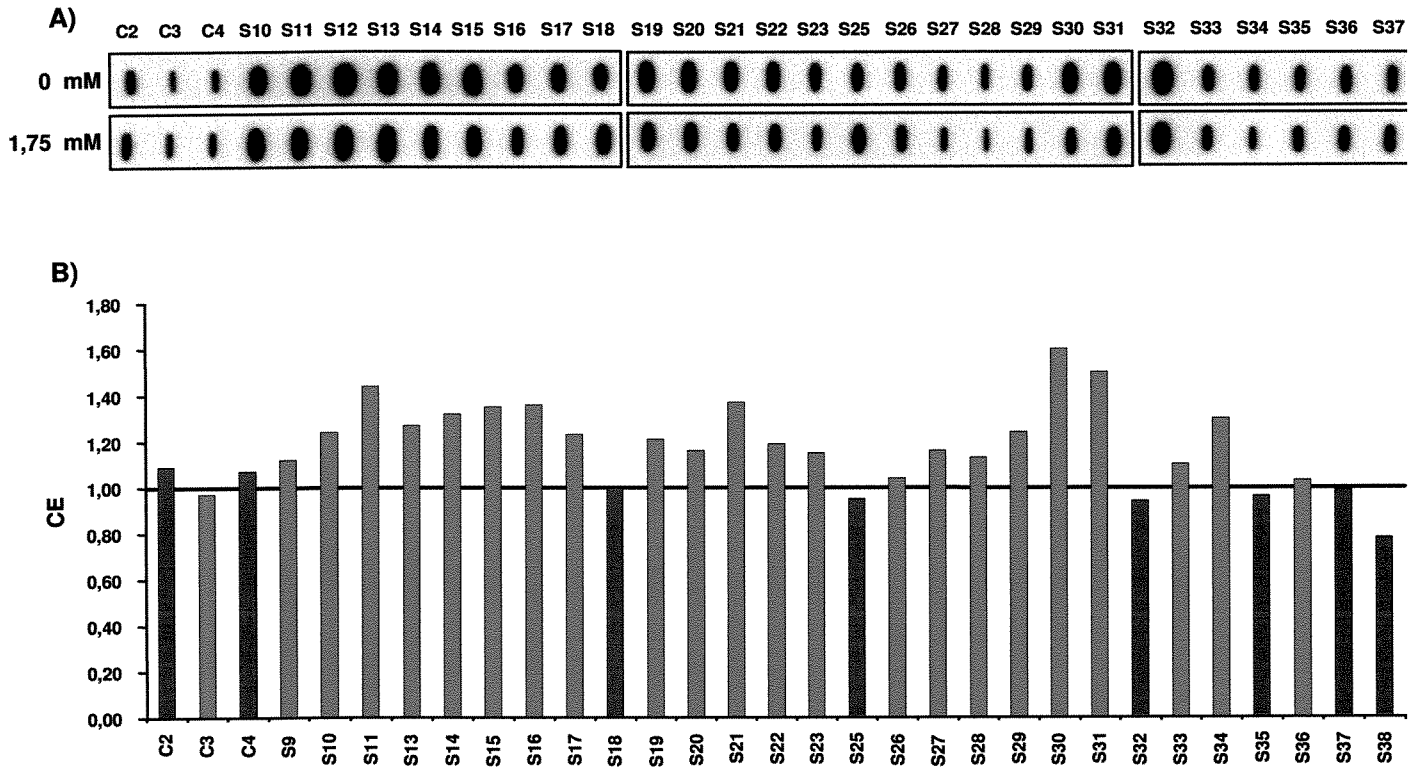

Figura 5: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot* de DNA, das bandas reamplificadas com o *primer* OPJ06. A) *slot blot* de DNA hibridizado com sondas de cDNAs obtidos a partir de RNA de células cultivadas em condições de estresse (0 mM de K_2HPO_4) e controle (1,75 mM de K_2HPO_4). B) Coeficientes de expressão (CE), as barras em vermelho indicam bandas que não tiveram a expressão diferencial confirmada e as barras em verde indicam bandas que tiveram a expressão diferencial confirmada.

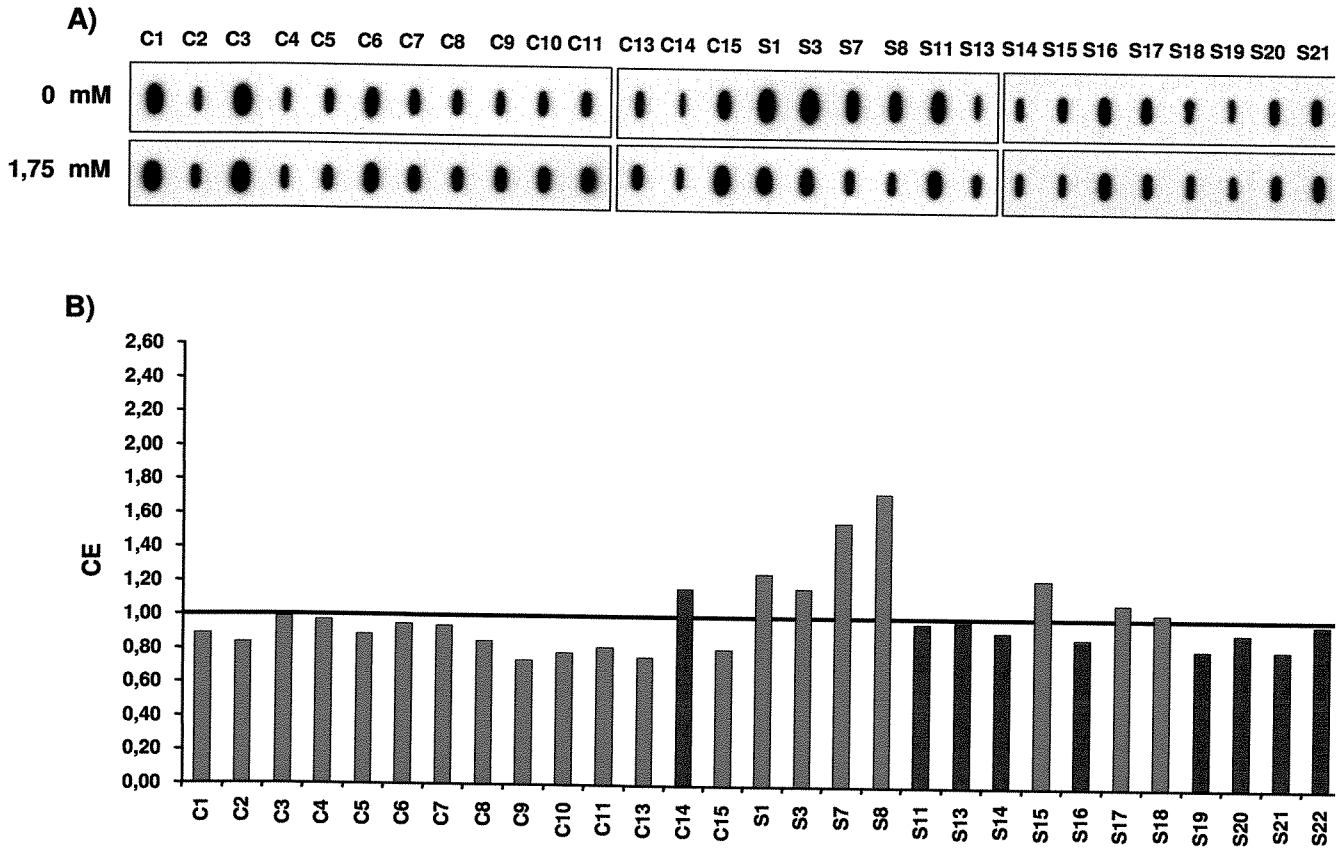

Figura 6: Confirmação da expressão diferencial, por *slot blot* de DNA, das bandas reamplificadas com o *primer* OPJ14. A) *slot blot* de DNA hibridizado com sondas de cDNAs obtidos a partir de RNA de células cultivadas em condições de estresse (0 mM de K_2HPO_4) e controle (1,75 mM de K_2HPO_4). B) Coeficientes de expressão (CE), as barras em vermelho indicam bandas que não tiveram a expressão diferencial confirmada e as barras em verde indicam bandas que tiveram a expressão diferencial confirmada.

O maior coeficiente de expressão (CE) encontrado foi de 2,30, sendo este o CE da banda S24, obtida com o *primer* OPJ14 (fig. 6B). O menor CE foi de 0,74, da banda C9, também obtida com o *primer* OPJ14 (fig. 4B). Com o *primer* OPJ14, foram identificadas e confirmadas a maioria das bandas reprimidas pelo estresse de privação de fosfato, mais precisamente, isto ocorreu com treze das quinze bandas reprimidas (tabela 1, fig. 6B). O *primer* OPJ06 permitiu a identificação da maior parte das bandas confirmadas como induzidas pelà privação de fosfato, 22 bandas (tabela 1, fig. 5B)

4- Clonagem e Seqüenciamento das Bandas Isoladas Através de RAP-PCR

Foram selecionados para clonagem e seqüenciamento os produtos de RAP-PCR com os maiores coeficientes de expressão. Todos os produtos de RAP-PCR selecionados foram clonados e seqüenciados. A tabela 2 mostra características dos cDNAs seqüenciados e os resultados das análises de similaridade obtidas com o programa BLASTX v. 2.2.8 (Altschul *et al.*, 1997).

Os cDNAs que não apresentaram similaridade significativa com as seqüências do GenBank também não apresentaram similaridade significativa com a seqüência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T. Estes cDNAs podem representar seqüências exclusivas da linhagem LR, ou ainda, algum tipo de artefato da técnica de RAP-PCR.

Tabela 2: Análise de similaridade das seqüências dos cDNAs obtidos por RAP-PCR.

cDNA	CE[1]	Tamanho (pb)	Proteína (N° Acesso)	Identidade (%)	Similaridade (%)	V
OPF01 – S13	1,52	510	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPF01 – S14	1,43	501	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPF01 – S15	1,77	478	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPF01 – S16	1,48	457	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPF01 – S17	1,60	439	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPJ06 – S11	1,44	684	Proteína *heat shock* de baixo peso molecular de *Thermotoga maritima* (AAD35461)	40%	65%	3
OPJ06 – S30	1,60	243	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPJ06 – S31	1,50	238	Nenhuma similaridade significativa	-----	-----	
OPJ14 – S07	1,56	862	3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase de *Rasltonia solanacearum* (ZP_00023650)	67%	76%	7
OPJ14 – S08	1,73	862	3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase de *Rasltonia solanacearum* (ZP_00023650)	67%	76%	7
OPJ14 – S24	2,30	1600	3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase de *Rasltonia solanacearum* (ZP_00023650)	67%	76%	7

1- O coeficiente de expressão foi obtido no *slot blot* de DNA pela divisão da média dos sinais de hibridização de uma determinada banda nà privação de fosfato, pela média dos sinais desta banda no controle.

4.1- Análise da seqüência dos cDNAs OPJ14 S7/S8/S24

As bandas S7/S8/S24 apresentaram similaridade com genes relacionados com a síntese de riboflavina: pontuações maiores foram obtidas para o gene que codifica a enzima 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintase (DHBP sintase); pontuações menores, mas ainda significativas, foram obtidas para genes que codificam uma enzima bifuncional contendo um domínio com atividade DHBP sintase e outro com atividade GTP ciclohidrolase II (fig. 7). Contudo os cDNAs seqüenciados apresentaram similaridade somente com o domínio DHBP sintase das enzimas bifuncionais.

A)

```
 Score =  265 bits (677), Expect = 7e-70
 Identities = 138/204 (67%), Positives = 157/204 (76%)
 Frame = -3

Query: 707 DVAVARPEWQRALEAIRAGRPVILLDDSDRENEGDLIVAAERLTVATMAMLIRECSGIVC 528
           D A        AL+A+R G PV++LDD+DRENE DLI+AA+RLT A MAMLIRECSGIVC
Sbjct: 16  DPAAMPARMAAALDAMRLGIPVVVLDDADRENEADLIIAADRLTHAGMAMLIRECSGIVC 75

Query: 527 LCLTPEHVARLDLPPMVQQNESRFGTAFTVSIEAREGVTTGVSAADRVTTIRAAIASGAR 348
           LCLT E  A L L PMV+ N S++GTAFTVSIEAR GV+TGVSAADR+TTIRAA+A  A
Sbjct: 76  LCLTAEKAAVLGLRPMVEHNRSQYGTAFTVSIEARVGVSTGVSAADRITTIRAAVAPDAD 135

Query: 347 PWDIARPGHIFPLCAHPEGVLGRRGHTEGSVDLARLAGLEPAAVLCELMNPDGSMAKGDD 168
              +  PGH+FPL A   GVL RRGHTEGSVDLARLAGL PA VLCELM PDG+MA+ DD
Sbjct: 136 AQSVVSPGHVFPLVAQAGGVLARRGHTEGSVDLARLAGLSPAGVLCELMLPDGTMARRDD 195
Query: 167 IVRFAVRHDLPVITIEDIVALRLQ 96
            VRFA +H LPV+TIEDI   R Q
Sbjct: 196 AVRFADQHGLPVLTIEDIARYREQ 219
```

B)

```
 Score =  210 bits (535), Expect = 2e-53
 Identities = 106/196 (54%), Positives = 136/196 (69%)
 Frame = -3

Query: 671 LEAIRAGRPVILLDDSDRENEGDLIVAAERLTVATMAMLIRECSGIVCLCLTPEHVARLD 492
           +E IR G+ VIL+DD DRENEGDLI+AAE +    +  +++   G+VC+ +T E   RL
Sbjct: 10  IEDIRQGKMVILMDDEDRENEGDLIMAAECVRTEDINFMVKHARGLVCMPMTRERCERLG 69

Query: 491 LPPMVQQNESRFGTAFTVSIEAREGVTTGVSAADRVTTIRAAIASGARPWDIARPGHIFP 312
           LP MVQ+N S FGT FTVSIEA EGVTTG+SAADR  T++AA A  A   DI  PGHIFP
Sbjct: 70  LPLMVQRNGSGFGTKFTVSIEAAEGVTTGISAADRARTVQAAAAKNAVAADIVSPGHIFP 129

Query: 311 LCAHPEGVLGRRGHTEGSVDLARLAGLEPAAVLCELMNPDGSMAKGDDIVRFAVRHDLPV 132
           L A P G L R GHTE + DLAR+AG EP+ V+CE+MN DGSMA+  ++  FA  H + +
Sbjct: 130 LMAQPGGTLARAGHTEAACDLARMAGFEPSGVICEVMNDDGSMARRPELEAFAAEHGIKI 189

Query: 131 ITIEDIVALRLQEKKT 84
            TI D++  RL  ++T
Sbjct: 190 GTIADLIHYRLIHERT 205
```

Figura 7: Alinhamentos produzidos pelo BLASTX tendo a seqüência dos cDNAs S7/S8/S24 como *query*. A- Melhor *hit* com uma DHBP sintase, de *Ralstonia solanacearum*. B- Melhor *hit* com uma enzima bifuncional DHBP sintase/GTP ciclohidrolase II de *Pseudomonas aeruginosa*.

A riboflavina (vitamina B_2) é a molécula precussora de duas importantes coenzimas, essenciais para o metabolismo celular: FMN e FAD. Estes compostos, chamados coletivamente de flavinas, são constituintes das chamadas flavoproteínas. O papel biológico mais significativo das flavoproteínas é sua participação nas cadeias transportadoras de elétrons. A DHBP sintase e a GTP ciclohidrolase II são responsáveis pelos primeiros passos na via de síntese de riboflavina. Há variações na nomenclatura dos genes da via bioquímica de síntese de riboflavinas, em bactérias Gram-negativas é utilizada a nomenclatura originalmente utilizada em *E. coli*. Nesta espécie as enzimas RibA (GTP ciclohidrolase II) e RibB (DHBP sintase) são codificadas por dois genes diferentes, *ribA* e *ribB*. Entretanto há espécies que produzem uma enzima bifuncional GTP ciclohidrolase/DHBP sintase, nestas a enzima é chamada RibBA e o gene *ribBA*. As enzimas RibC (riboflavina sintase), RibD (pirimidina deaminase/redutase) e RibE (limazina sintase) são responsáveis pelas outras etapas via de síntese de riboflavina.

Não há na literatura qualquer relato ligando diretamente a riboflavina, seus derivados metabólicos, enzimas envolvidas em sua síntese e o estresse nutricional de privação de fosfato, ou qualquer outro nutriente. Contudo, tanto a molécula de riboflavina quanto algumas das enzimas de sua via bioquímica possuem outros papéis biológicos além dos tradicionalmente reconhecidos. Por exemplo, a síntese de riboflavinas está intimamente ligada ao fenômeno da bioluminescência bacteriana (Kasai & Subimoto, 2002). Estes autores encontraram um operon *rib* completo em *Photobacterium phosphoreum* e mostraram que, nesta bactéria, a síntese de riboflavina é estritamente controlada, sendo estimulada com a ativação do operon *lux* (que codifica os genes responsáveis pela bioluminescência). Em *Helicobacter pylori*, a transcrição do gene *ribBA* é regulada pela concentração de ferro no meio externo. Neste organismo, a riboflavina parece estar associada à aquisição de ferro, pela redução de Fe^{3+}, funcionando então como um sideróforo (Worst *et al.*, 1998). Barquera *et al.* (2002) demonstraram pela primeira vez que a riboflavina (e não seus derivados – FAD e FMN) pode funcionar como um cofator de algumas enzimas, neste caso uma bomba de sódio em *Vibrio cholerae*.

Raina *et al.* (1991), isolaram um gene cuja inativação provocava a inabilidade de formação de colônias em *E. coli* crescidas em temperaturas maiores que 37°C e crescimento lento a 30°C. Tal gene foi denominado *htrP*, sendo considerado, na época, um homólogo do gene *luxH*, presente em operons evolvidos no fenômeno de bioluminescência bacteriana. Este mesmo estudo mostrou que, apesar de necessário para o crescimento em temperaturas superiores a 37°C, o nível de transcrito do *htrP* diminuía com o aumento da temperatura. Pouco

depois, Richter *et al.* (1992) mostraram que os genes *htrP* e *luxH* codificavam a DHBP sintase, logo, *htrP* e *luxH* são sinônimos de *ribB*. Em *E. coli*, RibB encontra-se entre as proteínas com síntese aumentada em pH baixo, por um motivo desconhecido (Stancik *et al.*, 2002). Jin *et al.* (2003), mostraram que a DHBP sintase de *Saccharomyces cerevisiae*, além de participar da síntese de riboflavina, possui alguma função, ainda desconhecida, relacionada com a respiração mitocondrial. Estes mesmos autores mostraram que além de localizada no citosol, uma pequena fração da DHBP sintase celular de *S. cereviseiae* encontrava-se no espaço intermembranas das mitocôndrias. De acordo com Schlösser *et al.* (2001), a regulação transcricional do gene que codifica a DHBP sintase é o principal ponto de regulação da síntese de riboflavina no fungo *Ashbya gossypii*, sendo sua expressão mais acentuada em baixas taxas de crescimento ou em fase estacionária.

Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório (dados não publicados), um cDNA expresso diferencialmente durante o crescimento de *A. ferrooxidans* em sulfato de zinco apresentou similaridade significativa com as enzimas bifuncionais DBHP sintase/GTP ciclohidrolase II (RibBA). A seqüência deste cDNA foi comparada ao banco de dados do GenBank com o BLASTX o que mostrou que este cDNA também possuía similaridade com RibB. Neste caso a situação era a inversa àquela observada no caso dos fragmentos OPJ14 S7/S8/S24: os melhores *hits* ocorriam com as enzimas bifuncionais, havendo *hits* menores com a DHBP sintase.

Estes resultados sugeriam que *A. ferrooxidans* poderia possuir uma cópia do gene *ribBA* e outra do gene *ribB*. Isto foi confirmado utilizando-se os COGs (*Cluster of orthologous groups*) para DHBP sintase (COG 0108) e para GTP ciclohidrolase II (COG 0807) como base para a anotação destes genes no genoma não anotado de *A. ferrooxidans*. Assim as ORFs correspondentes aos genes *ribB* e *ribBA* foram anotados no genoma de *A. ferrooxidans*, estando separadas por mais de 1500 kb.

A comparação entre a seqüência dos cDNAs S7/S8/S24 isolados em *A. ferrooxidans* LR e o gene *ribB* anotado no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270^T, mostrou que estes cDNAs, continham toda a seqüência do gene *ribB*. Uma vez que o fragmento do gene *ribBA* isolado anteriormente em outro estudo de nosso laboratório era muito pequeno (214 pb), decidiu-se amplificar o gene completo por meio de PCR para realizar a caracterização de *ribB* e *ribBA*. Para isto, foram desenhados *primers* específicos para *ribBA*, conforme descrito em Material e Métodos e a ORF completa foi amplificada, clonada e seqüenciada. A seqüência de

ribBA de *A. ferrooxidans* LR é idêntica à encontrada no genoma não anotado de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T.

De acordo com a anotação realizada, a ORF correspondente ao gene *ribB* de *A. ferrooxidans* possui 672 pb, produzindo uma proteína com 223 resíduos. A ORF do gene *ribBA* possui 1134 pb, codificando uma proteína de 377 resíduos. Como em outras enzimas bifuncionais, o domínio DHBP sintase se localiza aproximadamente nos primeiros 200 resíduos da porção N – terminal de RibBA, e o domínio com atividade GTP ciclohidrolase localiza-se na porção C – terminal. Um resumo das características dos produtos protéicos putativos das ORFs anotadas está na tabela 3. A análise da região genômica em que se encontrava a ORF *ribBA* revelou que neste sítio se encontram um operon *rib* completo (fig. 8). Não foi encontrada nenhuma outra ORF 500 pb acima ou abaixo de *ribB*.

Ao contrário do esperado, *ribB* e a porção DHBP sintase de *ribBA* apresentaram somente 57% de identidade em suas seqüências nucleotídicas. Um alinhamento realizado com as seqüências protéicas deduzidas das ORFs correspondentes a *ribB* e *ribBA* mostrou que há também uma baixa identidade entre as duas seqüências: 54% (tabela 3), um número semelhante ao encontrado por Fassbinder *et al.* (2000), ao comparar a porção *RibB* da enzima *RibBA* de *B. subtillis* e *RibB* de *E. coli*. As duas cópias de RibBA de *P. phosphoreum* são 77% idênticas e, entre *Vibrio fischeri* e *V. cholerae* a identidade é de 81% (Kasai & Subimoto, 2002). De acordo com estes autores, a identidade das RibBA dos vários membros da família vibroniaceae, é de no mínimo 64 %. Estes dados sugerem que um dos dois genes integrou-se ao genoma de *A. ferrooxidans* através transferência gênica horizontal. Provavelmente este gene é *ribB*, uma vez que em *A. ferrooxidans ribBA* faz parte de um operon completo de síntese de riboflavina (fig. 8). Entretanto a resposta para tal questão deve envolver uma análise filogenética detalhada e comparação de *codon usage* entre *ribB*, *ribBA* e outros genes de *A. ferrooxidans*.

Tabela 3: Características dos produtos protéicos putativos de *ribB* e *ribBA*.

ORF	**Número de A.A**	**Peso molecular (Da)**	**pI teórico**	**Identidade/similaridade com RibB**	**Identidade/similaridade com RibBA**
ribB	223	24115	5,42	—	54/70%
ribBA	377	40451	4,98	54/70%	—

Figura 8: Arranjo dos genes envolvidos na síntese de riboflavina em *A. ferrooxidans*. Cada ORF é representada por um trapézio, apontando para o sentido da transcrição. Os trapézios unidos representam um operon. A linha pontilhada representa uma distância de 1500 kb. A linha contínua representa curtas distâncias. O tamanho dos trapézios não é proporcional ao tamanho das ORFs.

O arranjo das ORFs *nusB* e *thiL* e o operon *rib* é conservado entre várias famílias de γ proteobactérias: vibroniaceae, pseudomoniaceae e grupo *Xanthomonas*. Em *P. phosphoreum* e *Vibrio fischeri* (vibroniaceae) o gene *glyA* também precede o operon *rib*. Em outras espécies de bactérias, há variação da ORF presente nesta posição. Em bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtillis* e *Staphylococcus aureus* apenas o gene *ribX* não está associado aos outros genes *rib*; a função exata deste gene é desconhecida. Na família enterobacteriaceae os genes de síntese de riboflavinas estão espalhados pelo genoma e *ribBA* é representado por dois genes diferentes *ribA* e *ribB* (Kasai & Sumimoto, 2002).

Em *Helicobacter pylori* (uma ε-proteobactéria) os genes responsáveis pela síntese de riboflavina também encontram-se dispersos, contudo, esta bactéria possui uma cópia de *ribA* e outra de *ribBA* (Fassbinder *et al.*, 2000). Há certo conflito na literatura quanto a funcionalidade de *ribBA* de *H. pylori*. Worst *et al.* (1998) relataram que o gene *ribBA* de *H. pylori* NCTC 11638 foi capaz de complementar funcionalmente mutantes *ribB* e *ribA* em *E. coli*. Em um estudo com outra linhagem de *H. pylori*, Fassbinder *et al.* (2000) relataram que *ribBA* não foi capaz de complementar a mutação *ribA* em *E. coli*, o que justificaria a presença de uma cópia adicional de *ribA*. Várias bactérias luminescentes da família vibroniaceae possuem cópias adicionais de genes *rib*, formando operons incompletos ligados ao operon *lux* (Lin *et al.*, 2001). Em *P. phosphoreum*, genes da síntese de riboflavina – *ribA*, *ribBA*, *ribC* e *ribE* – estão ligados ao operon *lux* (Lee *et al.* 1994). Kasai & Subimoto (2002) mostraram que este operon – incompleto devido a falta do gene *ribD* – possuía apenas um papel auxiliar na síntese de riboflavinas de *P. phosphoreum*, que possui um operon *rib* completo, como mencionado anteriormente. O arranjo dos genes *rib* em *A. ferrooxidans*, apresentando um operon *rib* completo com enzima bifuncional *ribBA*, e um gene *ribB* monocistrônico, só foi encontrada anteriormente em *V. fischeri*. Esta bactéria, ao contrário de outros membros de sua família, não possui genes *rib* dentro do operon *lux* (Lin *et al.*, 2001). Callahan & Dunlap (2000),

demonstraram que em *V. fischeri*, *ribB*, juntamente com o operon *lux*, são parte de um mesmo regulon.

A literatura é conflitante no tocante a regulação dos genes *rib*. Segundo Kasai & Sumimoto (2002), a síntese de riboflavina em bactérias em que os genes *rib* não estão organizados em operons seria constitutiva, não havendo síntese estimulada deste composto. Tal suposição se confirma no caso de *E. coli* (Bacher *et al.*, 1996). De acordo com Kasai & Sumimoto (2002), em bactérias em que os genes *rib* estão organizados em operons, a síntese de riboflavina é regulada por estimulos ambientais. Tal fato se confirma em *B. subtilis* e *P. phosphoreum* (Kasai & Sumimoto, 2002). Entretanto em *H. pylori* NCTC 11638, de acordo com Worst (1998), a transcrição de *ribBA*, assim como a produção e excreção de riboflavina são reguladas pela presença ou ausência de ferro no meio de cultura. Contudo tais resultados não foram confirmados em um estudo posterior, realizado por Fassbinder *et al.* (2000) em outra linhagem de *H. pylori*.

A presença de cópias adicionais de genes do operon *rib* parece ocorrer em bactérias que necessitam de grandes quantidades de riboflavina, como é o caso das bactérias luminescentes (Kasai & Subimoto, 2002). A cópia extra de *ribB* em *A. ferrooxidans* pode ter função de acelerar a síntese de riboflavina neste organismo. Com exceção do (controverso) caso de *H. pylori*, *ribB* sempre se encontra entre os genes duplicados do operon *rib*. A presença de uma cópia extra deste gene é essencial para acelerar a produção de riboflavina, uma vez que para a síntese desta molécula são necessárias duas moléculas de 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (produto de RibB) para cada molécula de 2,5-diamino-6-ribosilamino-4(3)-pirimidinona-5-fosfato (o produto de RibA).

A indução de *ribB* durante o cultivo de *A. ferrooxidans* em meio sem fosfato sugere que, nestas condições, ocorra um aumento da síntese de riboflavina. O possível papel desta molécula na resposta à privação de fosfato é ainda desconhecido. Alternativamente, a enzima RibB pode ter um papel, também desconhecido, na resposta à privação de fosfato de *A. ferrooxidans*. Não há na literatura qualquer relato ligando diretamente a riboflavina, seus derivados metabólicos, enzimas envolvidas em sua síntese e o estresse nutricional de privação de fosfato, ou qualquer outro nutriente.

4.2- Análise da seqüência do cDNA OPJ06 S11

O cDNA correspondente a banda de RAP-PCR S11, isolada com o *primer* OPJ06 apresentou similaridade com proteínas de choque térmico (*heat shock*), da super-família α-HSP. O melhor *hit* ocorreu com uma α-HSP da bactéria *Thermotoga marítima* (fig. 9). As α-HSPs possuem uma abrangente distribuição filogenética, sendo encontradas em todos os domínios da vida – *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Estas proteínas são comumente chamadas de sHSPs (*small heat shock proteins*). Contudo, uma vez que outras proteínas de choque térmico de baixo peso molecular não possuem qualquer homologia com o domínio α-cristalino, de Jong *et al.* (1998) propuseram a denominação *α-crystallin–sHSPs*, resumidamente, α-HSPs, para este grupo de proteínas.

```
 Score =  111 bits (278), Expect = 2e-24
 Identities = 55/136 (40%), Positives = 89/136 (65%), Gaps = 7/136 (5%)

Query: 10  REIDDMFDRYVMSMGWPSRRQELITAGDWSPRVDISETDNEFLIKAEIPEVKKEDVKVSV 69
           REID +FD +  +   P++          ++P +D+ ETD+E +I+ EIP + ++DVK++V
Sbjct: 18  REIDRLFDDFFRTEVRPAKEF--------FAPDMDVYETDDEVVIEVEIPGIDRKDVKITV 70

Query: 70  DKGVLTIQGERKQEKEEKGKKFHRIERYYGSFIRSFTLPDNVDESNIKATFKDGMLNLQV 129
           ++ +L I GE+K E+E+KGK ++ +ER  G F R+  LPD VD   IKA +K+G+L ++V
Sbjct: 71  EENILKISGEKKLEREQKGKNYYYVERSAGKFERAIRLPDYVDVEKIKAEYKNGVLTIRV 130

Query: 130 PKSARAKHNAIEVKVE 145
           PK    K   IEV+V+
Sbjct: 131 PKKEERKKKVIEVEVQ 146
```

Figura 9: Alinhamento produzido pelo BLASTX tendo o cDNA S11 como *query*.

As α-HSPs possuem uma atividade semelhante a chaperonas (*chaperone like*), protegendo outras proteínas contra desnaturação e agregação, não sendo capazes de, sozinhas, promover renaturação de proteínas. Acredita-se que esta proteção de proteínas, facilite a posterior renaturação, por chaperonas como DnaK ou sua degradação por proteases (Laskowska *et al.*, 1996; Veinger *et al.*, 1998; Narberhaus, 2002). Recentemente, Basha *et al.* (2004) demonstraram que durante estresse térmico as α-HSPs protegem proteínas com uma ampla gama de funções: transcrição, tradução, sinalização celular e metabolismo secundário. As α-HSPs formam os maiores complexos multiméricos entre todas as chaperonas (2 MDa em *E. coli*, por exemplo), sendo seu tamanho e organização extremamente variáveis em vários organismos (Narberhaus, 2002).

Os membros da família das α-HSPs estão envolvidos em um grande número de atividades celulares tais como: manutenção da transparência do cristalino (Brady *et al.*, 1997);

doenças humanas (Clark & Muchowski, 2000); processos de desenvolvimento em plantas (Waters *et al.*, 1996), animais (Linder *et al.*, 1996); esporulação de bactérias (Heidelbach *et al.*, 1993a); termotolerância em vários organismos (Landry *et al.*, 1989; Lavoie *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2000); proteção contra estresse oxidativo em plantas (Harndahl *et al.*, 1999) e animais (Rogalla *et al.*, 1999); resposta a choque ácido em bactérias (González-Márquez *et al.*, 1997; Guzzo *et al.*, 1997); proteção do aparato fotosintético de cloroplastos (Heckathorn *et al.*, 1998) e cianobactérias (Nakamoto *et al.*, 2000); patogenicidade de bactérias (Nerland *et al.*, 1988; Abu Kwaik *et al.*, 1994; Yuan *et al.*, 1998).

Em bactérias, as α-HSPs foram identificadas pela primeira vez em 1992, por Allen *et al.* Duas proteínas com similaridade com α-HSPs eucarióticas foram encontradas intimamente associadas a proteínas de corpos de inclusão, produzidos pela expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, sendo estas denominadas IbpA e IbpB (*Inclusion Body Associated Protein*). Estes mesmos autores demonstraram que os genes codificantes destas duas proteínas encontravam-se em uma mesma unidade trascricional e que a subunidade δ^{32} (principal regulador da síntese de proteínas *heat shock*) da RNA polimerase estava envolvida na regulação destes genes.

Já foi demonstrado que outras HSPs bacterianas estão envolvidas na adaptação celular a vários estresses, além do choque térmico. Em *E. coli*, a chaperonas DnaK, por exemplo, tem sua síntese aumentada em diversos estresses: oxidativo (Morgan *et al.*, 1986), osmótico (Meury, 1991) e privação nutricional (Groat *et al.*, 1986). Esta proteína está, de algum modo, envolvida na regulação da tradução e estabilidade da subunidade δ^{S} de *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002). Uma vez que esta subunidade da RNA polimerase é o principal regulador da resposta de *E. coli* a vários tipos de estresses, é de se esperar que DnaK tenha um papel prolífico na resposta ao estresse em *E. coli*. Sabe-se que em *A. ferrooxidans*, as chaperonas DnaK e GroEL são fosforiladas (e tem sua atividade aumentada) em resposta à privação de fosfato (Seeger *et al.* 1996). Não há, ainda, nenhum estudo relacionando as α-HSPs e o estresse de privação nutricional de fosfato em *A. ferrooxidans* ou qualquer outra bactéria.

Na banda S11 está incluída uma ORF completa de uma α-HSP, codificando uma proteína com aproximadamente 16 kDa (tabela 4). Uma análise da seqüência genômica não anotada de *A. ferrooxidans* mostrou que esta ORF não faz parte de nenhum operon, sendo esta anotada como o gene *hspA* (nome comumente dado a genes que codificam α-HSPs). Um tBLASTN do cDNA S11, realizado contra a seqüência genômica não anotada de *A.*

ferrooxidans revelou a presença de 2 outros *loci*, com similaridade significativa com o cDNA S11. Resultado confirmado por uma análise semelhante com as seqüências do COG 0071 (*Molecular chaperone – small heat shock protein*). Um destes *locus* mostrou possuir uma ORF completa, cujo produto possui similaridade significativa com α-HSPs. Esta ORF foi anotada como *hspB*. Assim como *hspA*, *hspB* encontra-se em uma unidade trascricional exclusiva e sem ORFs próximas. O outro *locus*, *hsp*C, também mostrou ser uma ORF cujo produto tem similaridade α-HSPs. Esta ORF entretanto, parece fazer parte de um operon, constituído por *hsp*C e o gene *lon* que codifica a protease Lon. Esta enzima possui uma atividade de protease ATP dependente, e também atividade de chaperona, sendo uma das HSPs mais conhecidas e estudadas (Narberhaus, 2002). Um resumo das características dos produtos protéicos putativos das ORFs de α-HSPs anotadas em *A. ferrooxidans* está na tabela 4.

Tabela 4: Características das α-HSPs de *A. ferrooxidans*

ORF	**Número de A.A**	**Peso molecular (Da)**	**pI teórico**	**Identidade/similaridade com *hsp*A**	**Identidade/similaridade com *hsp*B**	**Identidade/similaridade com *hsp*C**
hspA	145	16934	6,20	—	29/58%	26/47%
hspB	148	16680	5,43	29/58%	—	22/53%
hspC	143	16401	5,60	26/47%	22/53%	—

A super-família de proteínas α-HSP caracteriza-se por possuir massa molecular variando de 12 a 43 kDa e por possuir baixa similaridade entre as seqüências de seus membros, exceto por um domínio C-terminal conservado que contém de 80 a 100 resíduos, que constituem o domínio α-cristalino, assim chamado por ter sido originalmente identificado em proteínas (α-HSPs) existentes no cristalino de olhos de mamíferos (de Jong *et al.*, 1998). O domínio α-cristalino é flanqueado por regiões C e N-terminais com similaridade consideravelmente menor. Após a análise da seqüência primária de várias α-HSPs, Münchbach *et al.* (1999), propuseram a separação destas em duas classes, A e B. As α-HSPs de classe A são representadas apenas por proteínas bacterianas, relacionadas com IbpA e IbpB de *E. coli*. Nestas, a similaridade não se limita a apenas o domínio α-cristalino. Na classe B são encontradas proteínas de eucariotos e bactérias. Nesta classe há uma maior divergência nas seqüências das extremidades amino e carboxi-terminais. Em comparação com as α-HSPs de classe A, as de classe B possuem regiões N-terminais maiores, porém com as extensões C-

terminais mais curtas. A identidade entre α-HSPs de classes diferentes é de aproximadamente 20%, sendo maior entre proteínas de uma mesma classe (Münchbach *et al.*, 1999). Ainda de acordo com este estudo, a identidade das α-HSPs pertencentes a classe A varia de 34 a 73%. O grau de similaridade dentro da classe B é menor, variando de 30 a 60%, mas ficando na grande maioria dos casos entre 30 e 35%.

A maior parte dos genes conhecidos de α-HSPs são ORFs únicas, não fazendo parte de nenhum operon (Tomoyasu *et al.*, 2003; Jobin *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999; Yuan *at al.*,1996; Servant & Mazodier, 1995; Heidelbach *et al.*, 1993; Sauer & Dürre, 1993). Todavia, algumas exceções são conhecidas. Em *E. coli*, por exemplo, um único operon *ibp*AB codifica as duas α-HSPs – IbpA e IbpB – encontradas nesta espécie (Allen *et al.*, 1992; Kuczynska-Wisńik *et al.* 2001). *Vibrio harveyi*, um organismo filogeneticamente próximo, apresenta uma organização idêntica a *E. coli* (Klein *et al.* 2001). O gene que codifica a α-HSP de *Thermotoga maritima* faz parte de um operon constituído do qual faz parte também o gene que codifica a chaperona DnaK (Hsp70), uma das proteínas de choque térmico mais estudadas (Michelini & Flynn, 1999). O cenário mais diverso é encontrado em *Bradyrhizobium japonicum*. Nesta espécie, algumas ORFs de α-HSPs são solitárias ao passo que outras encontram-se em diversos operons (Münchbach *et al.*, 1999). Um destes operons é constituído pelo gene *hspA* e *rpoH*, que codifica a subunidade sigma especializada em resposta a choque térmico em bactérias (Narberhaus *et al.*, 1998).

A situação da ORF *hspC* de *A. ferrooxidans* é única, não há nenhum caso conhecido em que uma α-HSP encontra-se na mesma unidade trascricional que uma protease. A associação entre genes de α-HSPs e os de chaperonas como DnaK é de certo modo esperado, uma vez que há fortes evidências que as α-HSPs trabalhem em conjunto com DnaK (Thomas & Baneyx, 1998), havendo inclusive a formação, *in vivo*, de agregados contendo estas duas proteínas (Smýkal *et al.*, 2000). O fato de que em *A. ferrooxidans* uma α-HSP foi encontrada no mesmo operon que a protease Lon não é surpreendente, uma vez que as duas proteínas fazem parte da rede de chaperonas/HSPs existentes nas células bacterianas (Narbehaus, 2002). Em agregados de proteínas ricos em α-HSPs, são encontradas tanto chaperonas como DnaK e DnaJ quanto proteases, que tem o papel de destruir proteínas irreversivelmente desnaturadas (Rosen *et al.*, 2002; Laskowska *et al.*, 2004).

Na maioria das espécies em que foram encontradas α-HSPs, existe apenas um gene que codifica estas proteínas (Laksanalamai & Robb, 2004; Narberhaus, 2002). Contudo, a

existência de múltiplas cópias de α-HSPs em um mesmo genoma não é incomum. O exemplo mais extremo em bactérias ocorre na família Rhizobiaceae: *B. japonicum*. Nesta família, pelo menos dez genes codificam α-HSPs (Münchbach *et al.*, 1999). Em geral, quando há múltiplas α-HSPs em um organismo, estas normalmente pertencem à mesma classe, as *Rhizobiaceae* representam uma exceção a esta regra (Münchbach *et al.*, 1999). Em um estudo das α-HSPs de vários organismos extremófilos, Laksanalamai & Robb (2004) relataram que a identidade entre as α-HSPs de vários extremófilos que possuem apenas uma α-HSP foi de 75%; entre as α-HSPs de um mesmo organismo, que possui mais de uma destas proteínas, a identidade foi de 20 a 50%. Contudo, dentro de uma mesma classe de α-HSPs de um mesmo organismo estes números são geralmente maiores: IbpA e IbpB, de *E. coli* são 52,2% idênticas; HspA e HspB de *B. japonicum* (α-HSPs de classe A) são 74% idênticas, ao passo que HspC e HspF (classe B) a identidade é de 61% (Narberhaus, 2002). Dentro deste contexto, a baixa identidade exibida pelas três α-HSPs de *A. ferrooxidans* quando comparadas entre si é intrigante (tabela 4).

A figura 10 mostra um alinhamento realizado com as seqüências protéicas das α-HSPs identificadas em *A. ferrooxidans* a as seqüências de várias α-HSPs. Foram utilizadas para comparação α-HSPs bem caracterizadas na literatura: HspA (P70917), HspB (P70918), HspD (O69241), HspE (O69242), HspH (O69242) de *B. japonicum*; IbpA (D38256) e IbpB (G65170) de *E. coli* como representantes das proteínas de classe A; HspC (AAC44757) e HspF (CAA05837) de *B. japonicum*; GspA (S49042) de *Legionella pneumophilla*; α-HSP de *Methanococcus jannaschii* (1SME) e α-HSP de *Triticum aestivum* (1GME) como representantes da classe B.

No alinhamento da figura 10, pode-se notar claramente a divisão entre as α-HSPs da classe A e B. É possível notar a presença da região N-terminal , pouco conservada nas proteínas de classe B, e mais conservada nas de classe A. Como é característico das α-HSPs de classe B, sua porção N-terminal é mais longa. Em seguida há de uma região com maior similaridade – o domínio α-cristalino – localizado, aproximadamente, entre os resíduos 40 e 130. Pode-se notar que, como é característica deste grupo de proteínas, esta é a região mais conservada, mesmo comparando-se proteínas de organismos filogeneticamente muito distantes. Pode-se observar que, com exceção da α-HSP de *L. pneumophilla*, as porções C-terminais das proteínas de classe B são mais curtas, como é característico desta classe.

As proteínas de HspA e HspB de *A. ferrooxidans*, quando comparadas às proteínas selecionadas para o alinhamento múltiplo, apresentaram valores de identidade variando entre 15 e 25% com proteínas de classe A, e identidade superior a 30% com a as proteínas de classe B. A seqüência de HspC foi, de modo geral, igualmente idêntica às proteínas das classes A e B, apresentando valores de identidade entre 18 e 25% com proteínas de ambos grupos.

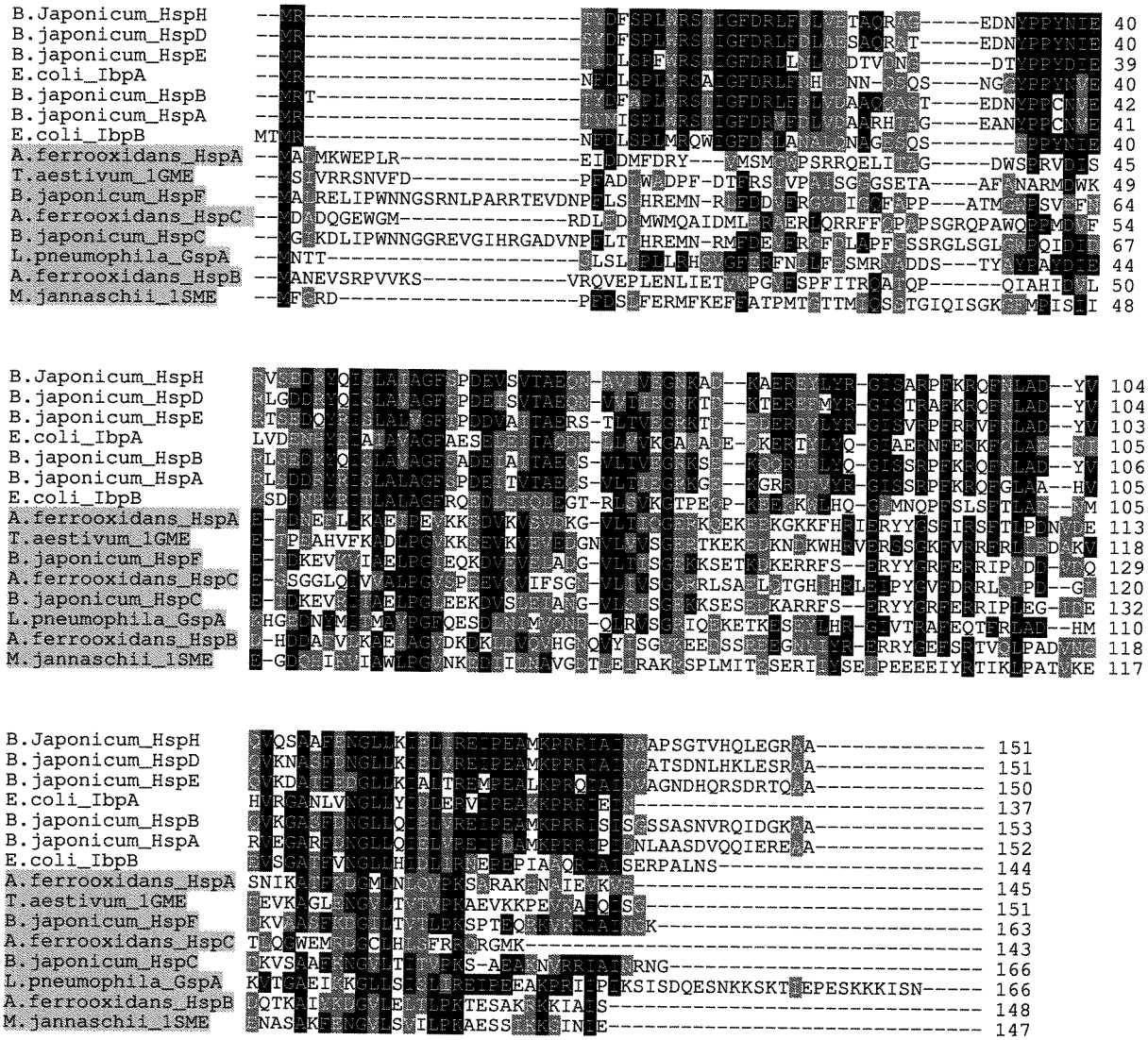

Figura 10: Alinhamento das seqüências protéicas das α-HSPs encontradas no genoma de *A. ferrooxidans* e outras α-HSPs. As α-HSPs de classe B estão indicadas em cinza.

A predição da estrutura secundária das α-HSPs de *A. ferroxidans*, realizadas com o progrma PSI-pred, apresentou resultados quase idênticos, a despeito da baixa identidade encontrada entre estas três proteínas. O resultado da predição para HspA está mostrado na

figura 11. A predição está de acordo com as estruturas tridimensionais conhecidas de α-HSPs de trigo e *M. jannaschii* (Kim *et al.*, 1998; van Montfort *et al.*, 2001). Estas mostram que o domínio α-cristalino, compreendido pelos resíduos 40 a 130, é dominado por folhas beta. A estrutura secundária das α-HSPs de *A. ferroxidans* mostraram maior semelhança com a estrutura secundária de uma α-HSP de *T. aestivum* (trigo). Assim como previsto para as α-HSPs de *A. ferrooxidans*, a estrutura da α-HSP de trigo apresenta alfa-hélices no domínio N-terminal e uma folha beta extra na extremidade C-terminal (van Montfort *et al.*, 2001). Na α-HSP de *M. jannaschii* a região N-terminal é desordenada e além de uma folha beta, há uma alfa-hélice na extremidade C-terminal (Kim *et al.*, 1998).

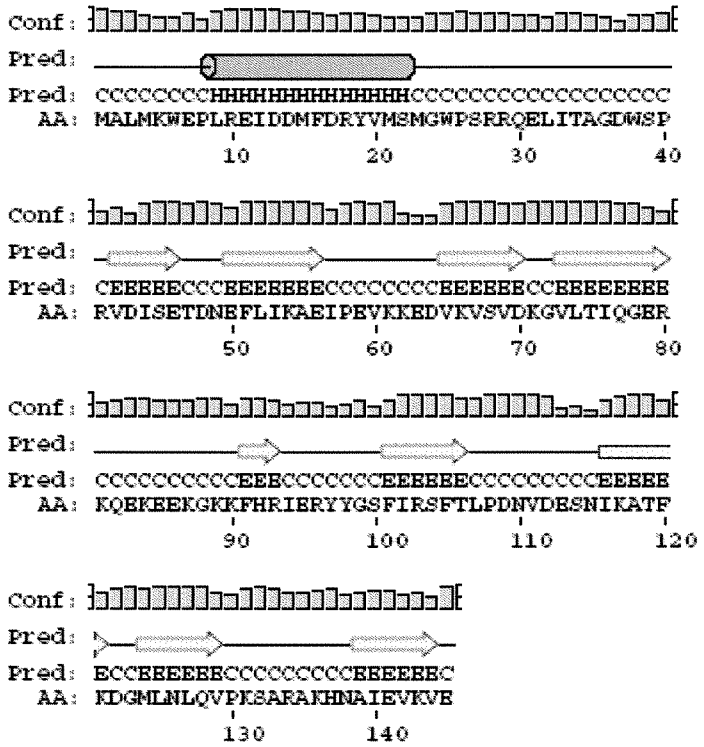

Figura 11: Predição da estrutura secundária de HspA, obtida com o programa PSIPRED. As setas a letra "E" representam folhas beta; cilindros e letra "H", alfa-hélices, "C" e as linhas pretas representam alças. Os histogramas são uma representação da confiabilidade da predição.

5- Caracterização dos cDNAs e Gene Amplificado

A expressão dos cDNAs OPJ06 S11 (*hspA*), OPJ14 S8 (*ribB*) e do gene amplificado *ribBA* de *A. ferrooxidans* LR foi caracterizada em diversas condições de cultivo, através de experimentos de *slot blot* de RNA. Foram testadas condições que representam possíveis estresses, como: presença de íons metálicos como zinco e cobre; cultivo em pHs estressantes, e em alta temperatura (37°C). Além disto foi analisado padrão temporal da expressão destes genes durante cultivo em meio com e sem fosfato.

5.1- *ribB* e *ribBA*

Um experimento prévio de *slot blot* de DNA mostrou que não há hibridização cruzada entre *ribB* e *ribBA*, nem mesmo quando apenas a porção DHBP sintase (*ribB*) de *ribBA* foi hibridizada com *ribB* (não mostrado). Assim, foi possível comparar a expressão de *ribB* e *ribBA* nas diversas situações testadas.

Tanto *ribB* quanto *ribBA* foram induzidos nas diversas concentrações de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) testadas (figs. 12 e 13), sendo a expressão destes genes maior em concentrações mais altas de sulfato de zinco. O padrão de expressão dos dois genes é muito semelhante, embora *ribBA* tenha apresentado valores relativos de expressão menores. O aumento da concentração de sulfato de zinco (de 0 mM para 100 mM e desta para 300 mM) resultou em grande aumento da expressão dos genes testados. Entre 100 mM e 300 mM, o aumento da expressão foi proporcional ao aumento das concentrações de zinco. Contudo, o cultivo de *A. ferrooxidans* LR em concentrações maiores de sulfato de zinco (600 mM) resultou em aumentos modestos da expressão de *ribB* e *ribBA* (figs. 12 e 13).

Sabe-se que algumas proteínas envolvidas na respiração de *A. ferrooxidans* tais como citocromo *c* oxidase, rusticianina (Iwahori *et al.*, 2000) e citocromo *c* (Paulino *et al.*, 2002) estão envolvidas na resistência a outros cátions divalentes como mercúrio e cobre. Uma vez que a riboflavina é um composto precursor de coenzimas de enzimas respiratórias, pode-se especular que o aumento observado da expressão de genes ligados a síntese deste composto, estaria possivelmente ligado à necessidade de fornecer coenzimas para um provável aumento dos níveis das enzimas citadas acima.

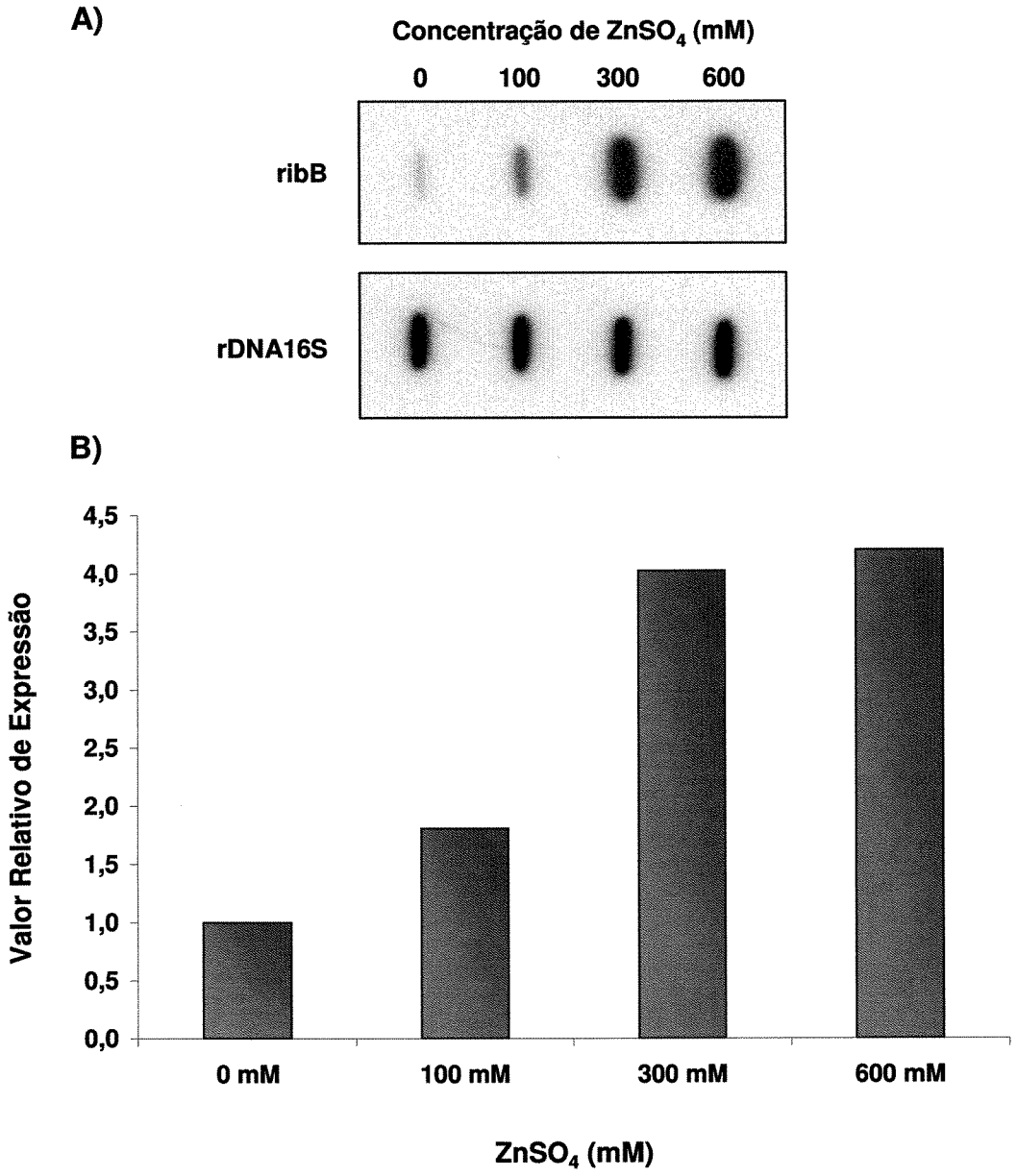

Figura 12: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversas concentrações de sulfato de zinco. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ14 S8 (*ribB*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada situação.

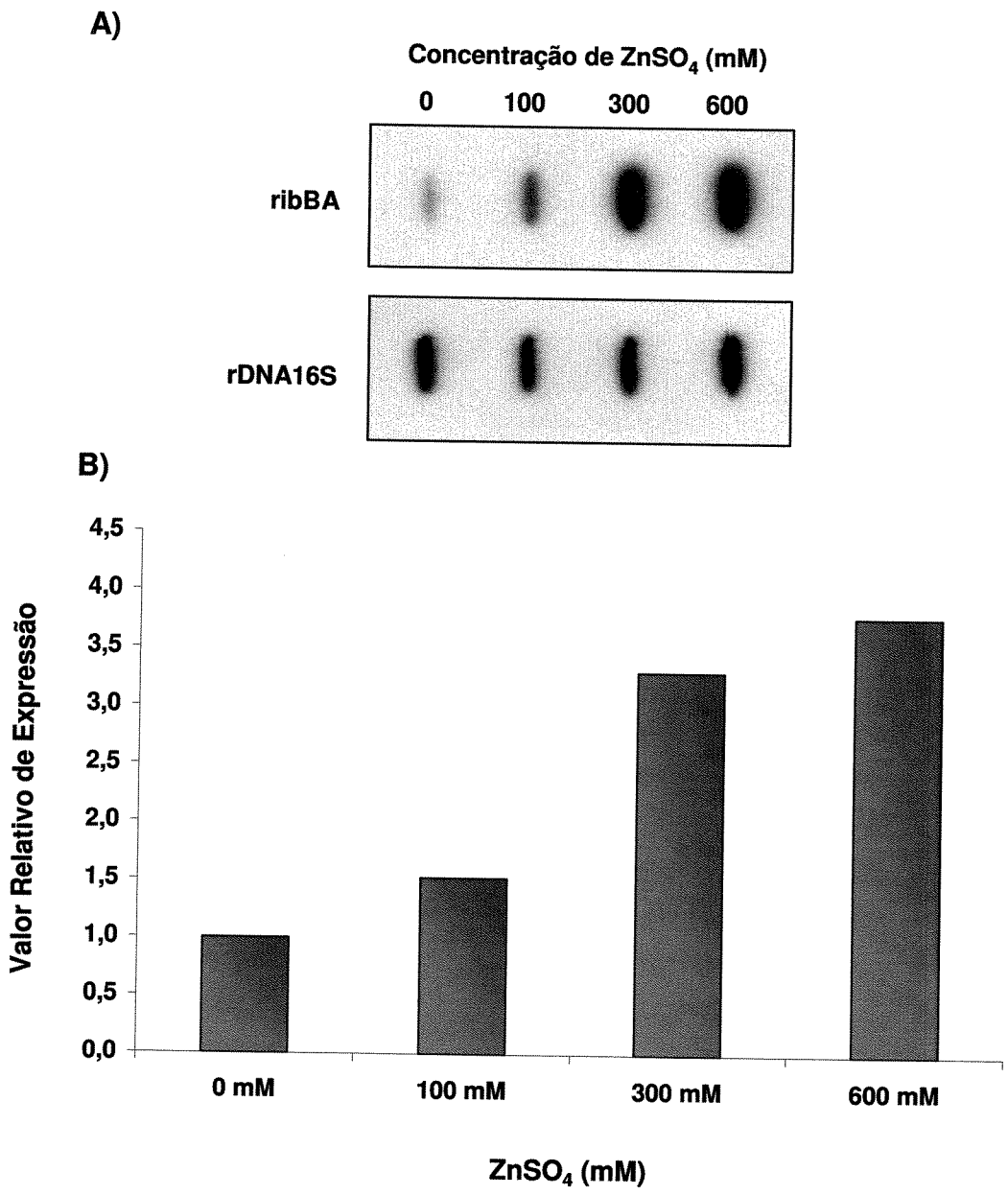

Figura 13: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversas concentrações de sulfato de zinco. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o gene *ribBA* e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada situação.

Sabe-se que a riboflavina possui um importante papel na redução de Fe^{3+} em *H. pylori* (Worst *et al.*, 1998). Além disto, a enzima mercúrio redutase (catalisa a reação $Hg^{2+} \rightarrow Hg^0$), presente no operon *mer* de *A. ferrooxidans* e várias outras bactérias (Shiratori *et al.*, 1989), é uma flavoproteína, tendo o FAD como cofator (Fox & Walsh, 1982). Estes fatos tornam mais convincente o vínculo entre a síntese de riboflavina e a resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans*.

A expressão de *ribB* e *ribBA* foi posteriormente testada durante o cultivo de *A. ferrooxidans* a 37°C e na presença de 50 mM de sulfato de cobre ($CuSO_4$) (figs. 14 e 15). O padrão de expressão dos dois genes é o mesmo: ambos são induzidos durante o cultivo em sulfato de cobre e reprimidos em 37°C.

O aumento da expressão dos genes *rib* em 50 mM de sulfato de cobre fornece suporte adicional para afirmar que a síntese de riboflavina pode estar associada a resistência a íons metálicos em *A. ferrooxidans*. Neste experimento o aumento da expressão de *ribBA* (aproximadamente 3x) foi muito menor que o de *ribB* (11x) (figs. 14 e 15). A razão para a ocorrência deste fato ainda é desconhecida.

A repressão de *ribB* e *ribBA* durante o cultivo em 37°C está de acordo com dados de curva de crescimento obtidos no laboratório; estes mostram que o cultivo de *A. ferrooxidans* é bastante limitado nestas condições. A repressão destes genes, provavelmente está ligada a uma queda geral no metabolismo de *A. ferrooxidans* nesta temperatura.

O pH ótimo de cultivo de *A. ferrooxidans* é de aproximadamente 2,0 (Kelly & Wood, 2000). Uma vez que um dos principais estresses sofridos por *A. ferrooxidans* no ambiente de lixiviação é a variação de pH, foi analisada a expressão de *ribB* e *ribBA* durante o cultivo de *A. ferrooxidans* LR nos pHs 1,2; 1,5; 1,8 (controle); 2,5 e 3,0 (figs. 16 e 17). O crescimento bacteriano em pH 1,5 e 2,5 foi bem semelhantes ao que ocorre em pH 1,8. Contudo, nos pHs 1,2 e 3,0 o crescimento de *A. ferrooxidans* LR é consideravelmente mais lento que em pH 1,8, particularmente em pH 1,2.

Como foi observado nos outros experimentos, o padrão de expressão de *ribB* e *ribBA* foi semelhante (figs. 16 e 17). Estes genes foram significativamente induzidos durante o cultivo em pHs maiores que 1,8. Por outro lado, o comportamento dos genes em pHs menores que 1,8 não foi homogêneo. Ambos foram induzidos em pH 1,5; e reprimidos durante o cultivo em pH 1,2.

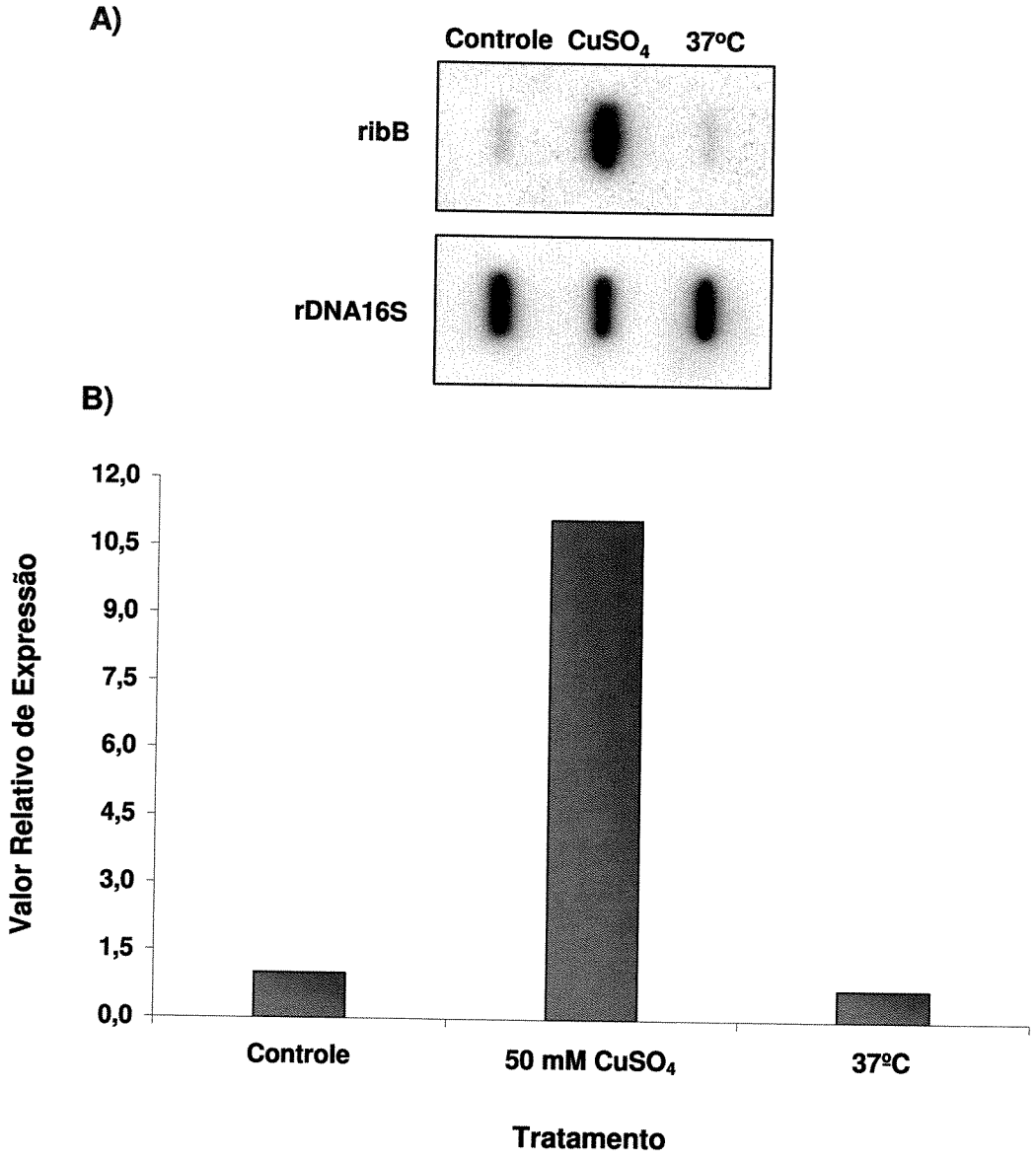

Figura 14: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em 50 mM de $CuSO_4$ e a 37°C. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ14 S8 (*ribB*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

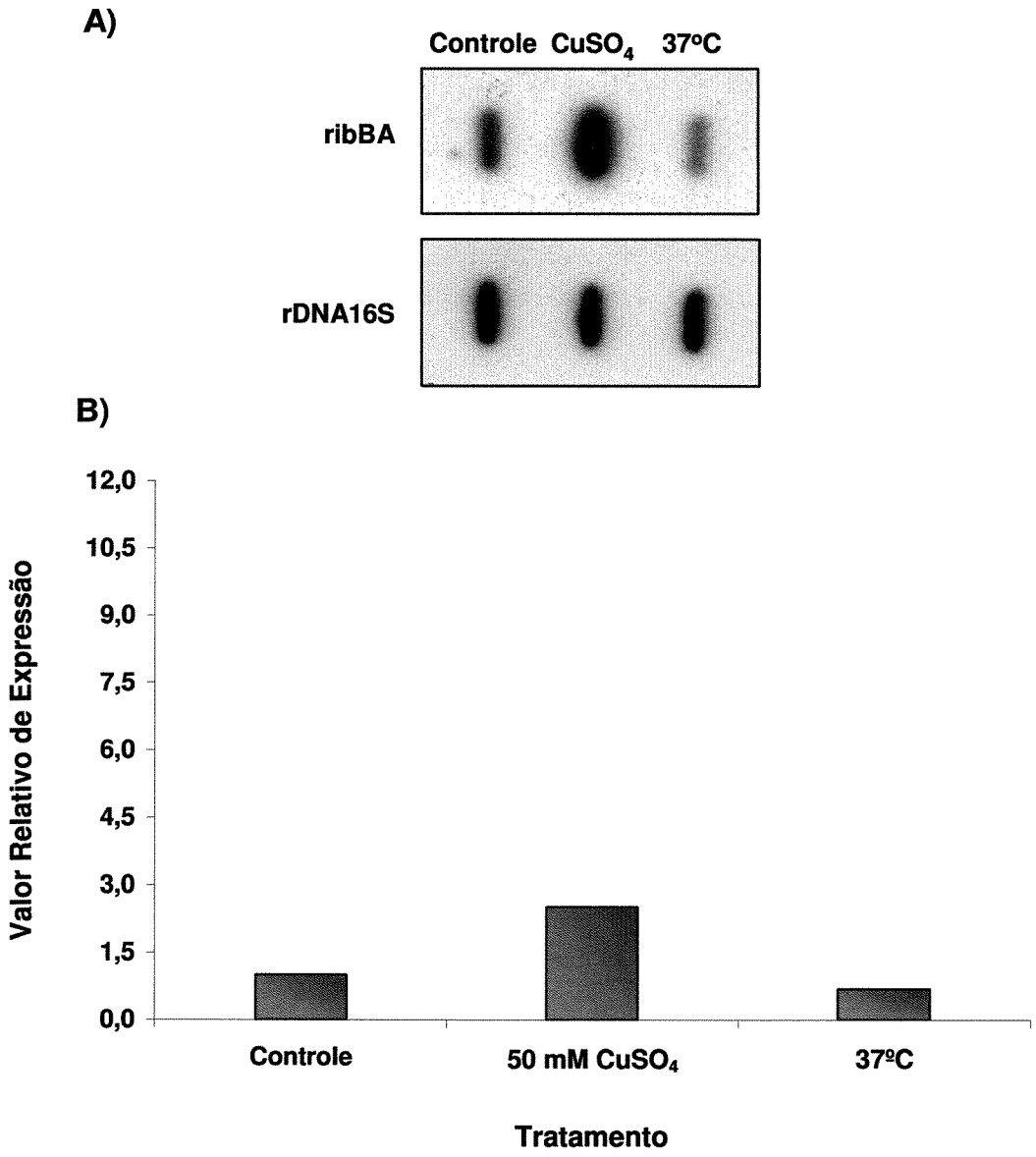

Figura 15: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em 50 mM de $CuSO_4$ e a 37ºC. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o gene *ribBA* e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

A. ferrooxidans e outros organismos acidofílicos possuem pH citosólico próximo da neutralidade (Cobley & Cox, 1983). Todavia, o periplasma e a membrana externa estão expostos a variações de pH (Valdés *et al.*, 2003). Diversas proteínas envolvidas na oxidação de Fe^{2+} em *A. ferrooxidans* como, por exemplo, a rusticianina e diversos citocromos, localizam-se na membrana externa ou no espaço periplasmático (Yarzábal *et al.*, 2002; Yarzábal *et al.*, 2002a). Deste modo, é de se esperar que alterações no pH do meio de cultura tenham grande efeito na eficiência das reações de oxi-redução que ocorrem durante a respiração celular de *A. ferrooxidans*, alterando, por exemplo, o potencial eletroquímico do meio e/ou a estabilidade das enzimas envolvidas neste processo e de seus cofatores como FAD e FMN, derivados da riboflavina. Assim, é provável que o aumento da expressão de *ribB* e *ribBA* nos pHs 1,5, 2,5 e 3,0, tenha relação com um ajuste do sistema de oxidação de ferro em pHs estressantes, ou sub-ótimos.

Neste contexto, a repressão de *ribB* e *ribBA* em pH 1,2 pode indicar a ocorrência de níveis mínimos de respiração celular, pois o maior efeito inibitório sobre oxidação de ferro de *A. ferrooxidans* foi observado em pH 1,2. Curiosamente, Stancik *et al.* (2002) utilizando eletroforese de proteínas em duas dimensões, relataram que em *E. coli* RibB encontra-se entre as enzimas com síntese aumentada em pH baixo (6,0). Contudo em pHs mais restritivos (no caso, 4,9) a síntese desta proteína foi reduzida. O mesmo padrão não foi observado em resposta a um aumento de pH. Nestas condições, ao contrário do observado em *A. ferrooxidans*, a síntese de *ribB* diminuiu drasticamente.

A expressão de *ribB* e *ribBA* mostrou ser sensível a fase de cultivo de *A. ferrooxidans* na presença e ausência de fosfato no meio de cultura (figs. 18 e 19). Durante o cultivo em meio contendo 1,75 mM (controle) de K_2HPO_4, a expressão de *ribB* e *ribBA*, permaneceu praticamente inalterada durante o início e meio da fase log. Quando as células estavam na transição entre as fases log e estacionária, a expressão de *ribB* e *ribBA* diminuiu. Uma menor expressão de *ribB* e *ribBA* provavelmente reflete uma queda geral na taxa metabólica de *A. ferrooxidans* com a eminente depleção do substrato de oxidação.

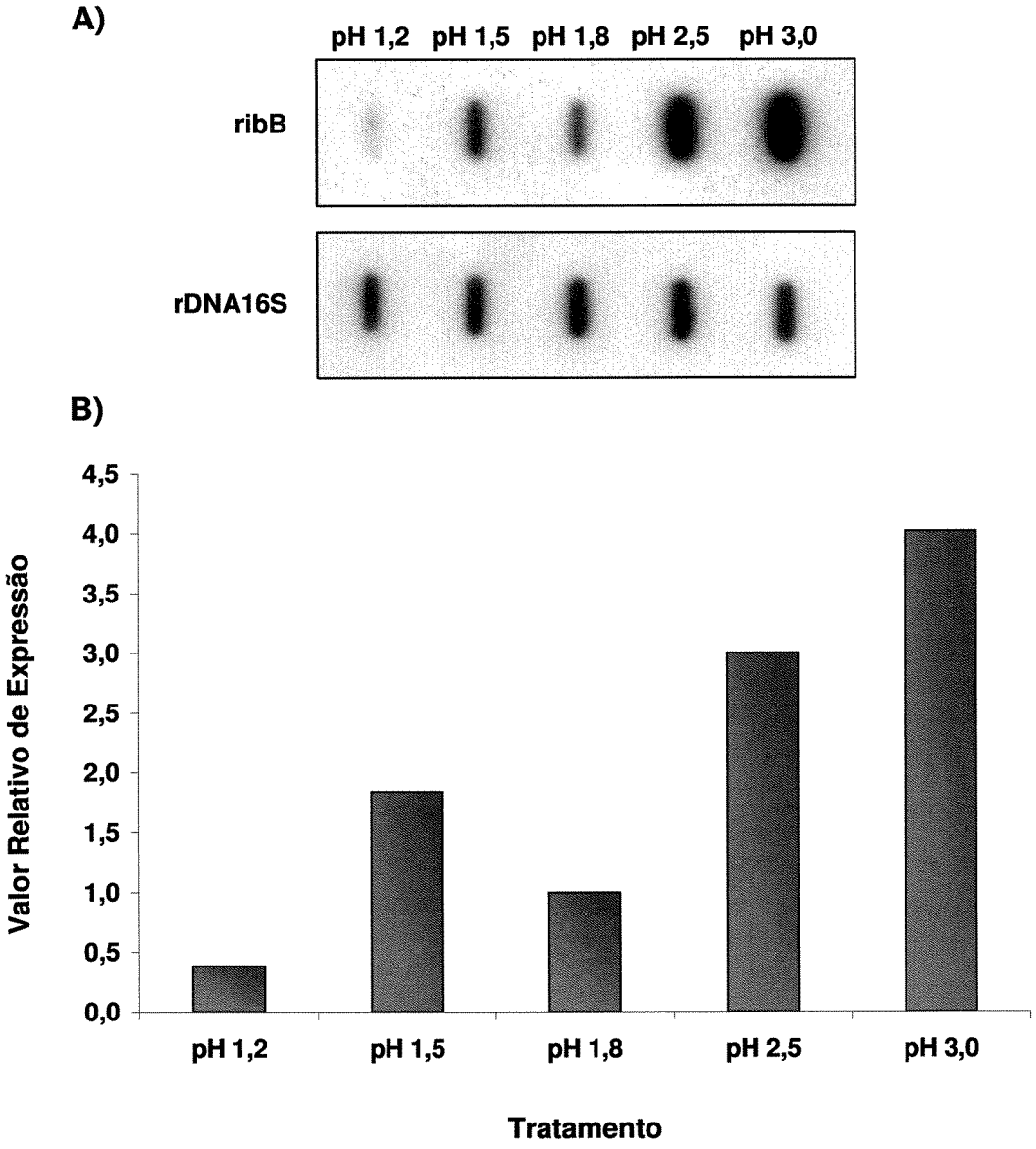

Figura 16: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversos pHs. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ14 S8 (*ribB*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

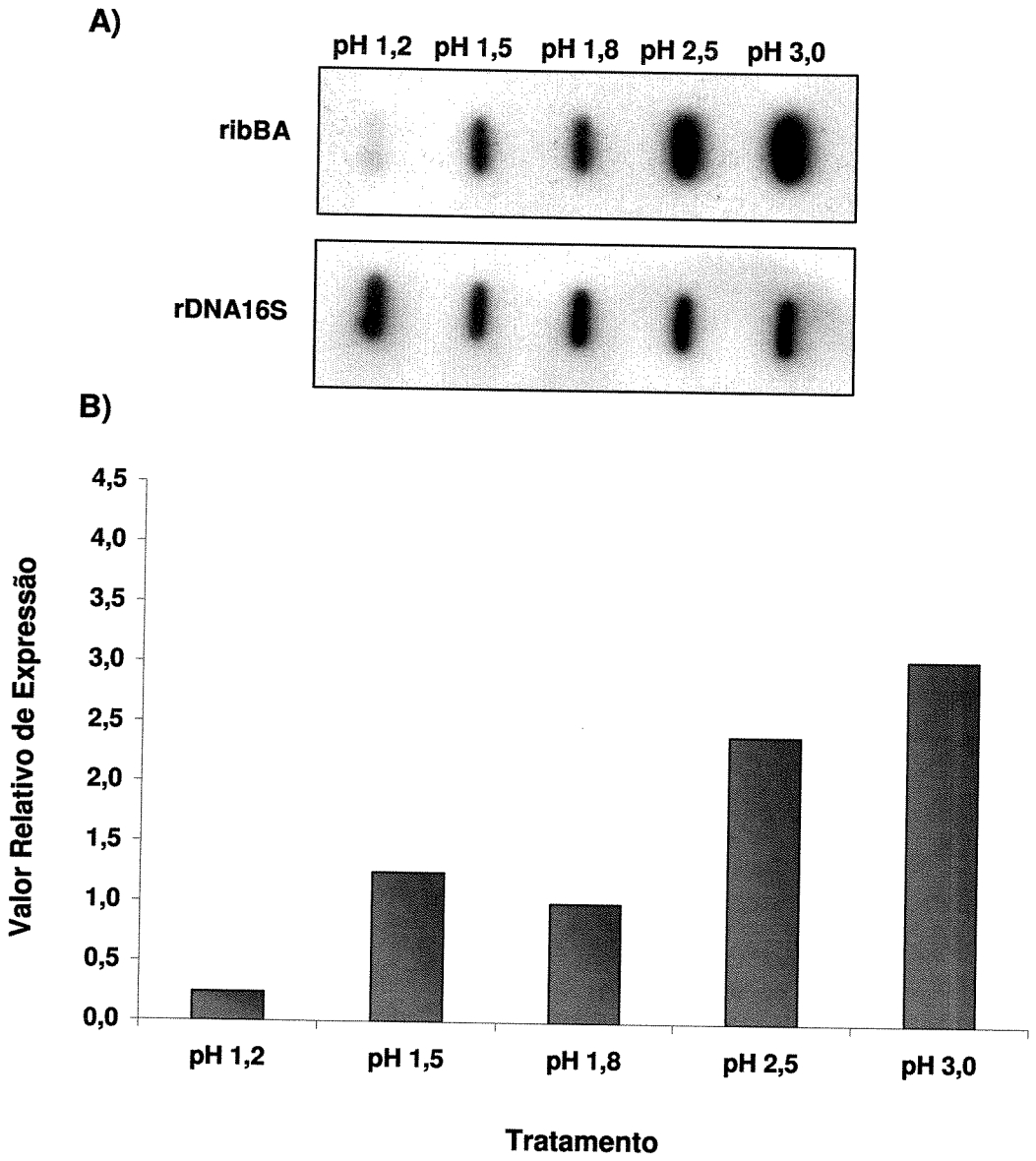

Figura 17: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversos pHs. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o gene *ribBA* e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

Durante o cultivo na ausência de fosfato a expressão de *ribB* e *ribBA* mostrou ser ainda mais sensível à fase de cultivo do que durante o cultivo em 1,75 mM de K_2HPO_4. Talvez refletindo uma pequena taxa metabólica inicial, a expressão de *ribB* e *ribBA* no princípio do crescimento em meio sem fosfato mostrou-se menor do que na presença deste nutriente (figs. 18 e 19). Há um pico de expressão durante o meio da fase log e, assim como observado no cultivo em 1,75 mM K_2HPO_4, há uma queda na expressão de *ribB* e *ribBA* no final do crescimento. Durante as fases mais avançadas do crescimento, a expressão de *ribB* e *ribBA* foi maior na ausência de fontes de fosfato.

É interessante notar que em todas as situações testadas, *ribB* e *ribBA* tiveram um padrão de expressão semelhante, mesmo estando em unidades de transcrição diferentes. A análise da seqüência do operon *rib* não revelou a presença de nenhum promotor interno, deste modo é provável que o nível transcricional de *ribBA* corresponda ao nível transcricional de todo o operon. Assim, a semelhança no padrão de expressão de *ribB* e *ribBA*, sugere que, pelo menos nas condições testadas, o gene *ribB*, estaria sujeito ao mesmo controle transcricional que os genes do operon *rib*, do qual *ribBA* faz parte. O controle simultâneo de *ribB* e *ribBA* não seria esperado se o produto de *ribB* (a DHBP sintase) realizasse uma função não relacionada com a síntese de riboflavinas, como ocorre no caso descrito por Jin *et al.* (2003), que relataram que a DHBP sintase de *S. cerevisieae* possui uma função relacionada à respiração mitocondrial. Os dados apresentados, corroboram a hipótese de que a RibB funcione como um auxiliar na síntese de riboflavinas de *A. ferrooxidans*, complementando a atividade DHBP sintase da enzima bifuncional RibBA, aumentando a eficiência da síntese de riboflavinas nesta bactéria.

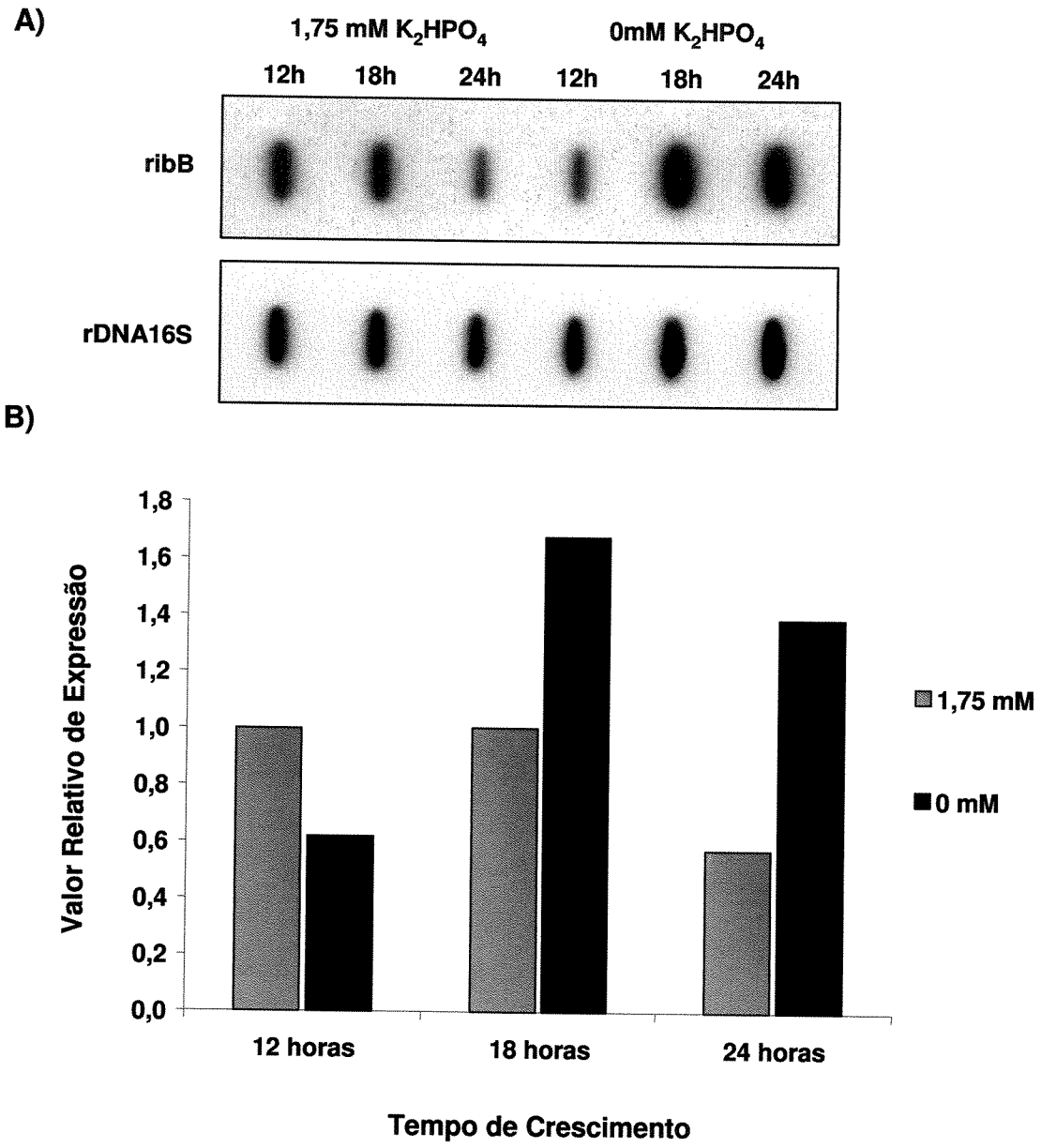

Figura 18: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em meio com 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4 durante 12, 18 e 24 horas. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ14 S8 (*ribB*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento. Os valores relativos de expressão para um mesmo tempo de cultivo foram agrupados no gráfico para facilitar a comparação.

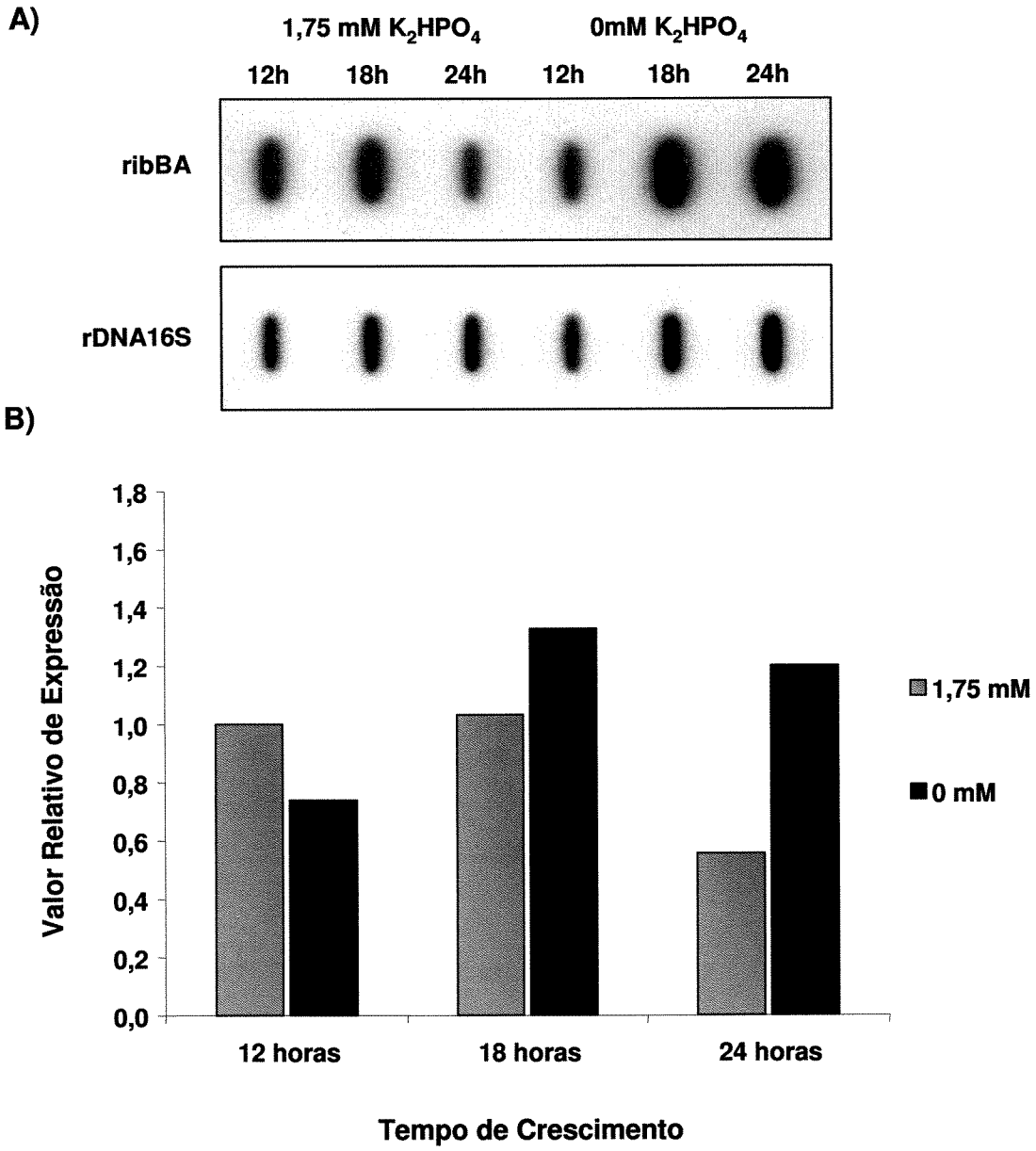

Figura 19: *Slot blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em meio com 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4 durante 12, 18 e 24 horas. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o gene *ribBA* e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento. Os valores relativos de expressão para um mesmo tempo de cultivo foram agrupados no gráfico para facilitar a comparação.

5.1- *hspA*

As α-HSPs são produzidas em uma ampla gama de condições, havendo variações entre os vários organismos estudados, sendo na maioria dos casos (mesmo em células eucarióticas) o controle realizado em nível transcricional (Narberhaus, 2002). Yuan *at al.* (1996) mostraram que uma α-HSP de *Mycobacterium tuberculosis* tem sua síntese aumentada durante o crescimento com aeração reduzida e na fase estacionária. Contudo, esta α-HSP não foi induzida em uma ampla gama de outros estresses tais como privação nutricional de carbono, *cold shock*, estresse oxidativo, exposição a etanol e choque térmico. Nenhuma das três α-HSPs de *Bacillus subtillis* é expressa em resposta a choque térmico, estando ligadas ao desenvolvimento de esporos (Reischl *et al.*, 2001). Entretanto, na maioria dos organismos estudados, as α-HSPs respondem prontamente a condições de choque térmico. Foi demonstrado que as proteínas IbpA e IbpB estão envolvidas na resistência de *E. coli* aos estresses de choque térmico e oxidativo (Kitagawa *et al.*, 2000). Uma α-HSP de *Leuconostoc oenos* é induzida em condições de choque térmico, pH baixo, exposição a etanol e fase estacionária de cultivo (Jobin *et al.*, 1997). Já foram encontradas e caracterizadas α-HSPs induzidas por choque térmico em diversos organismos tais como: *E. coli*, (Richmond *et al.*, 1999), *Salmonella enterica* (Tomoyasu *et al.*, 2003), *Synechococcus vulcanus* (Roy *et al.*, 1999), *B. japonicum* (Münchbach *et al.*, 1999), *Streptomyces albus* (Servant & Mazodier, 1995), *Stigmatella auriantica* (Heidelbach *et al.*, 1993) e *Clostridium acetobutylicum* (Sauer & Dürre, 1993). Outras condições de expressão foram observadas em diversos organismos. Por exemplo, em *B. japonicum* não há expressão de α-HSPs em anoxia ou na fase estacionária (Münchbach *et al.*, 1999). Por outro lado, a α-HSP de *S. auriantica* é induzida em anoxia e durante o desenvolvimento dos mixosporos (Heidelbach *et al.*, 1993).

Assim como os genes *ribB* e *ribBA* (figs. 12 e 13), *hspA* também foi induzido nas concentrações de zinco testadas (fig. 20). A diferença entre a expressão de *hspA* em 300 e 600 mM de zinco foram ainda menores do que no caso dos genes *rib* e os valores relativos de expressão em todas as situações são ligeiramente menores. Ao contrário do observado em *ribB* e *ribBA* (figs. 14 e 15), a indução de *hspA* durante o cultivo em 50 mM de sulfato de cobre foi mínima (fig. 21).

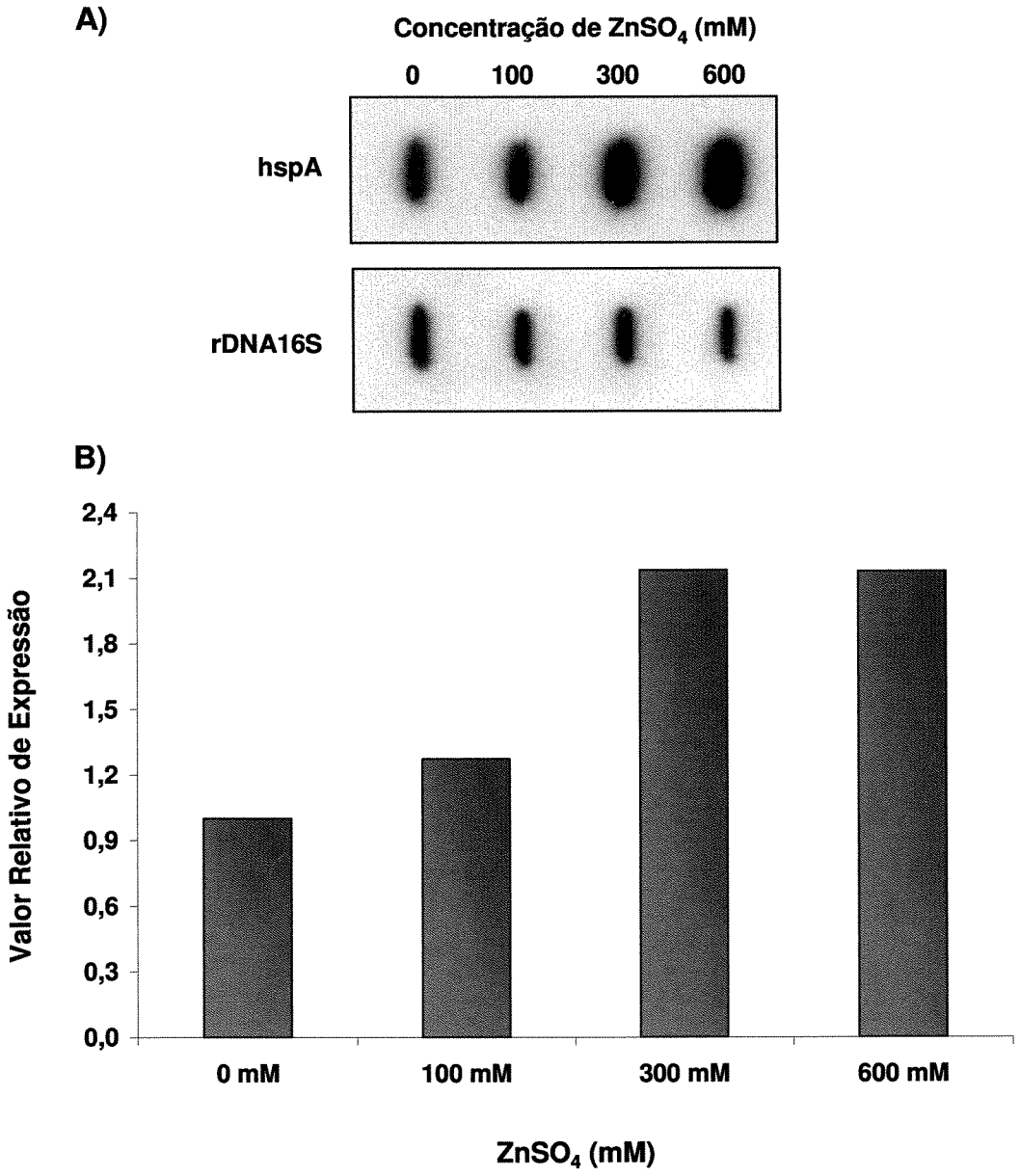

Figura 20: *Slot-blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversas concentrações de sulfato de zinco. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ06 S11 (*hspA*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

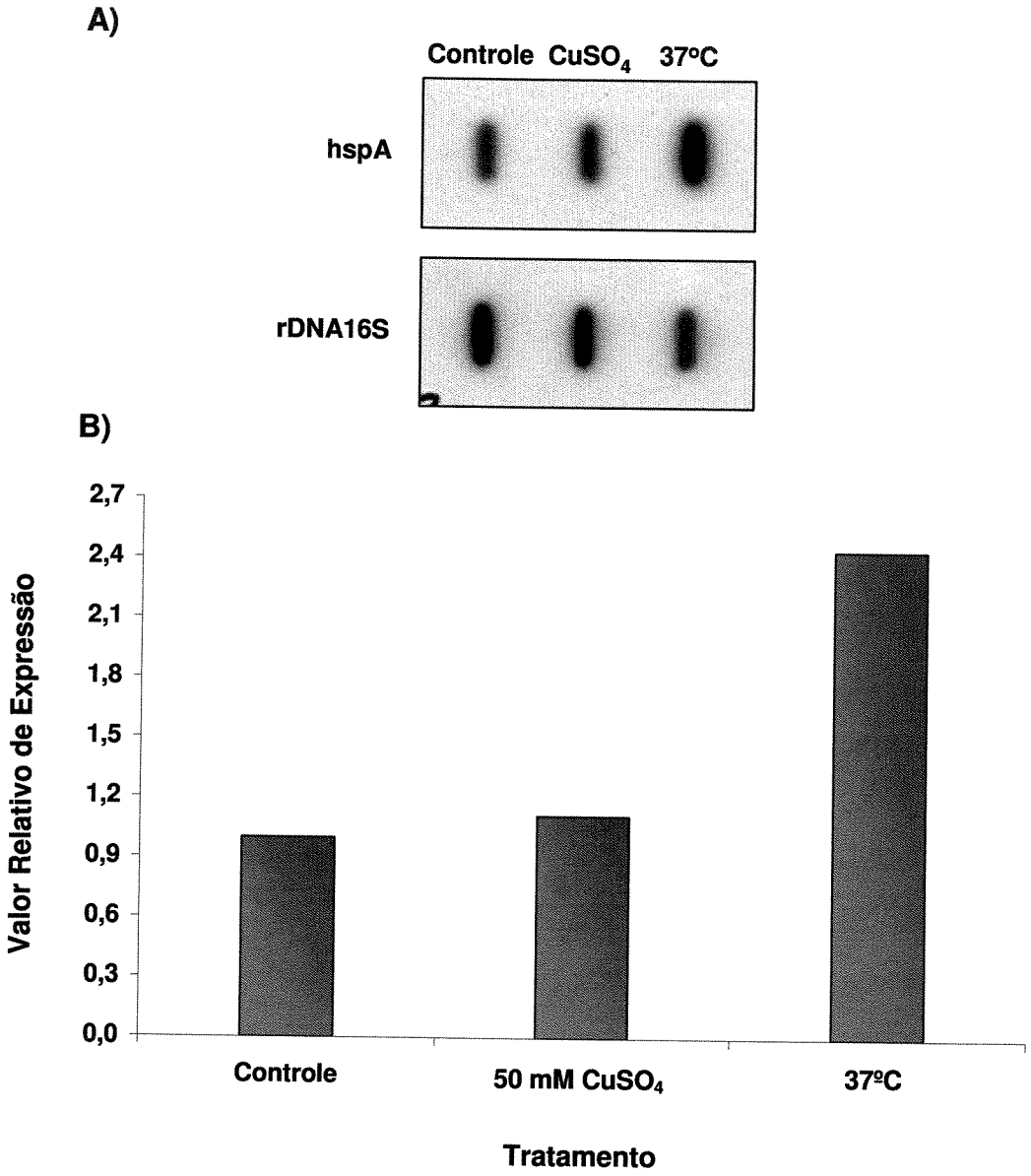

Figura 21: *Slot-blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em 50 mM de $CuSO_4$ e a 37ºC. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ06 S11 (*hspA*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

Estes dados indicam que podem existir diferenças entre o mecanismo de toxicidade de cobre e zinco em *A. ferrooxidans*. De fato, a resistência a zinco em bactérias está geralmente associada a mecanismos de resistência a cádmio e cobalto, havendo sistemas exclusivos para a resistência ao cobre (Silver & Walderhaug, 1992). Mellano & Cooksey (1988) mostraram que vários outros íons metálicos, entre eles o zinco, não foram capazes de induzir o sistema de resistência a cobre de *Pseudomonas syringae*. Sabe-se que um dos mecanismos de ação tóxica de íons metálicos é a indução de estresse oxidativo, por produção de espécies reativas de oxigênio (Schützendübel & Polle, 2002). Em *E. coli*, Kitagawa *et al.* (2000) apresentaram evidências que as α-HSPs IbpA e IbpB estão envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Por outro lado, não há relatos anteriores de indução de α-HSPs bacterianas em resposta a exposição a íons metálicos.

De acordo com Narberhaus (2002), comparando a expressão de todos os genes que codificam proteínas de *heat shock*, os que codificam α-HSPs estão entre os mais induzidos em condições de choque-térmico. A indução de *hspA* em *A. ferrooxidans* foi pequena em comparação com outros exemplos da literatura. Em experimentos de *microarray*, o nível de indução do operon ibpAB, as α-HSPs de *E. coli*, foi de 300 vezes, para células submetidas a um choque térmico de 50° C (Richmond *et al.* 1999). Esta indução não tão radical de *hspA* em *A. ferrooxidans* pode ser resultado de uma temperatura não tão distante da ideal como foi relatado no experimento anterior. Um choque térmico de 50°C em *E. coli* representa um desvio de 12°C de sua temperatura ótima de cultivo, ao passo que 37°C dista apenas 7°C do ótimo de *A. ferrooxidans*. Münchbach *et al.* (1999), relataram aumentos contínuos na síntese de α-HSPs de *B. japonicum* quando esta foi submetida a aumentos de temperatura de 28°C para 43°C.

Sabe-se que em algumas bactérias, há indução de α-HSPs em resposta a baixos pHs (Abu Kwaik *et al.*, 1994; Jobin *et al.*, 1997; González-Márquez *et al.*, 1997; Guzzo *et al.*, 1997.). Curiosamente *hspA* foi levemente reprimida em pHs inferiores ao ótimo de *A. ferrooxidans* (fig. 22). Contudo, a expressão deste gene aumentou em pHs superiores a 1,8. Não há nenhum relato conhecido de indução de α-HSPs em resposta a alcalinização do meio.

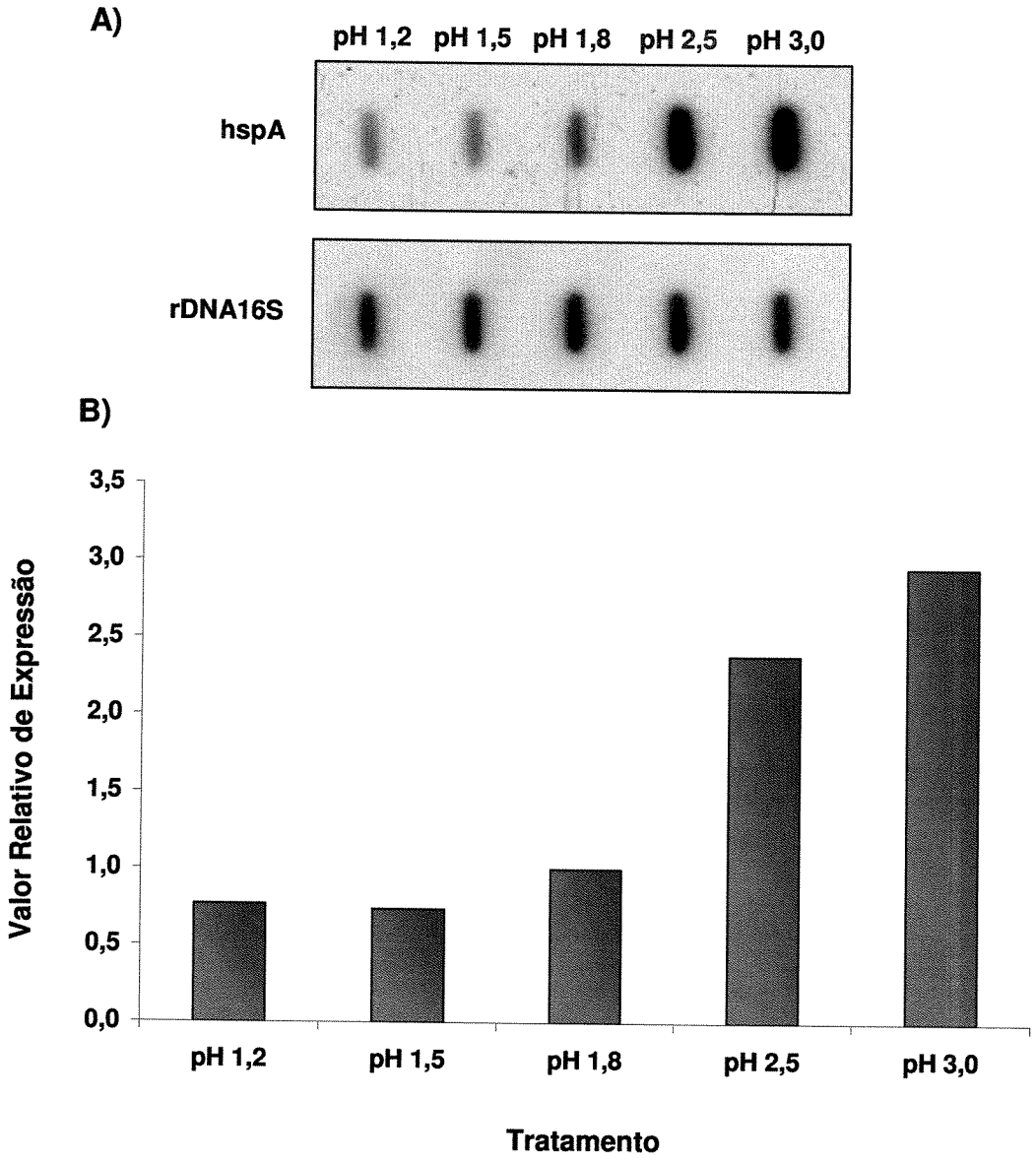

Figura 22: *Slot-blot* de RNA realizado com RNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em diversos pHs. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ06 S11 (*hspA*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento.

Uma possível explicação para o aumento na expressão de *hspA* em pHs superiores a 1,8 seria a proteção de componentes da membrana celular ou de proteínas de membrana e/ou periplasmáticas durante o cultivo em pHs altos. α-HSPs já foram encontradas em *S. auriantica* (Lünsdorf *et al.*, 1995), *O. oeni* (Jobin *et al.* 1997), *M. tuberculosis* (Lee *et al.*, 1992) e *E. coli* (Laskowska *et al.*, 1996). Sabe-se que durante um choque térmico, uma Hsp de *Synechococcus* sp. é um importante estabilizador da membrana desta bactéria, protegendo seu aparato fotosintético.

Assim como no caso de *ribB* e *ribBA*, a expressão de *hspA* apresentou variação temporal durante o cultivo de *A. ferrooxidans* (fig. 23) em meio com 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4. Houve um aumento contínuo da expressão tanto na ausência quanto na presença de K_2HPO_4. Curiosamente, nos três pontos (tempos de crescimento) estudados, a expressão na ausência de fosfato é aproximadamente 1,5 vez maior que no controle (fig. 23).

Sabe-se que em *L. oenos* (Jobin *et al.* 1997) e *M. tuberculosis* (Yuan *et al.*, 1996) há aumento da síntese ou expressão de α-HSPs na fase estacionária. Contudo, não há nenhum estudo mostrando qualquer relação entre à privação nutricional de fosfato ou outro nutriente e a indução na síntese ou expressão de α-HSPs, ou ainda a desnaturação de proteínas. Contudo, sabe-se que duas importantes chaperonas, DnaK e GroEL, sofrem fosforilação em resposta à privação de fosfato (Seeger *et al,* 1996). Isto indica as que chaperonas de modo geral estão envolvidas na resposta de *A. ferrooxidans* à privação de fosfato, uma vez que estas proteínas têm um papel central na rede de chaperonas e proteases existentes nas células de diversos organismos (Narberhaus, 2002).

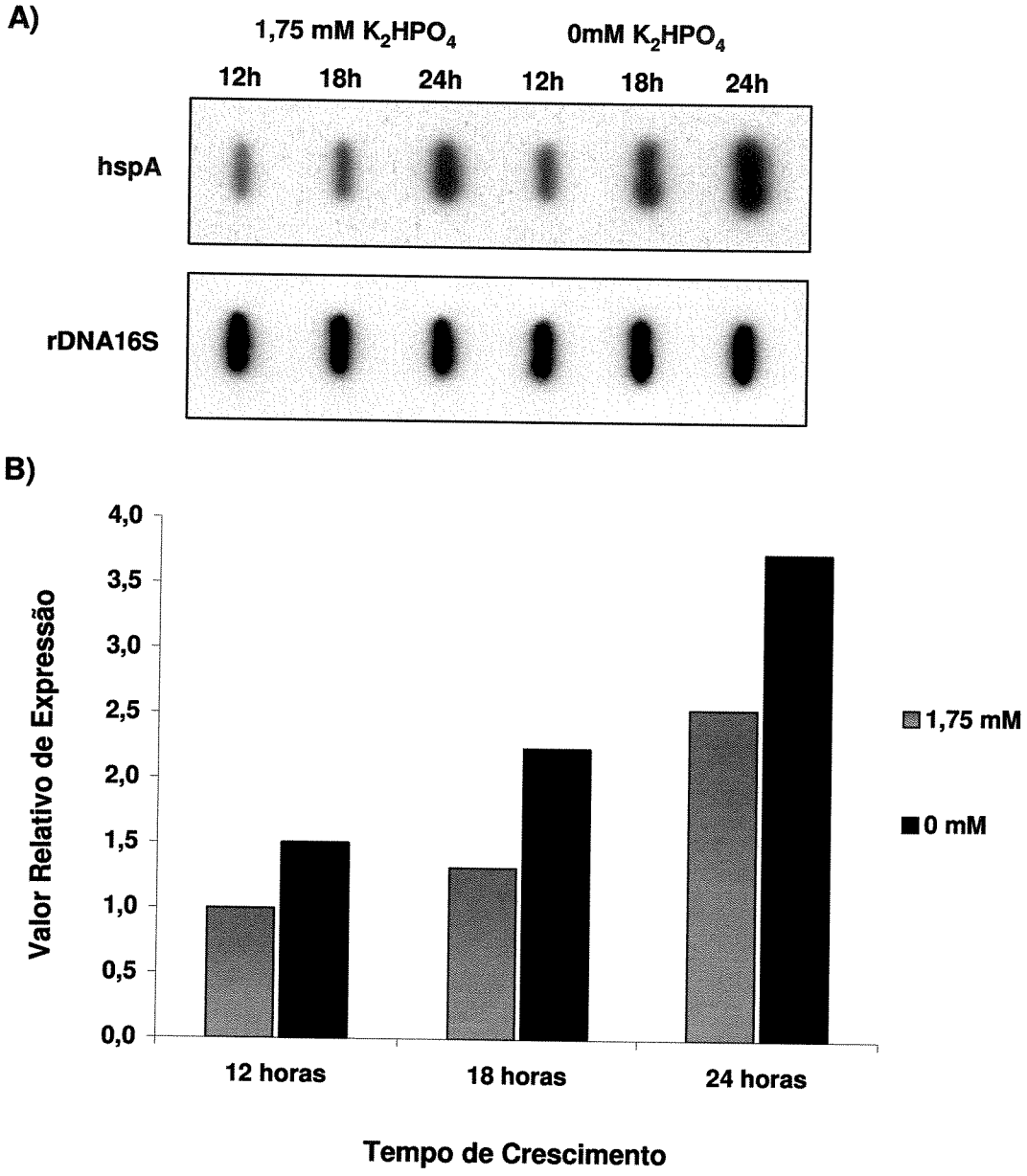

Figura 23: *Slot-blot* de RNA realizado co mRNAs isolados de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em meio com 0 e 1,75 mM de K_2HPO_4 durante 12, 18 e 24 horas. A) Hibridização das membranas utilizando como sonda o cDNA OPJ06 S11 (*hspA*) e o rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR. B) Gráfico mostrando o valor relativo de expressão em cada tratamento. Os valores relativos de expressão para um mesmo tempo de cultivo foram agrupados no gráfico para facilitar a comparação.

No momento, as razões para a indução de *hspA* nestas condições só podem ser especuladas. Além de evitar a agregação e denaturação de proteínas, as chaperonas auxiliam algumas proteínas recém sintetizadas a assumirem sua conformação correta (Narberhaus, 2002). Holmquist *et al.* (1994), relataram que em *Vibrio sp.* DnaK apresentava-se associada a uma proteína periplasmática com síntese específica em privação de fontes de carbono, Csp5. Tal proteína só era encontrada associada a DnaK no citoplasma, sendo sugerido por estes autores que esta chaperona mantém Csp5 em um estado competente para a translocação. Em células eucarióticas, sabe-se que, com o auxílio de outras proteínas, as chaperonas DnaK e Hsp90 auxiliam na formação de complexos protéicos, secreção e reciclagem de vesículas e no transporte de proteínas (Young *et al.*, 2003). Sabe-se também que chaperonas estão envolvidas na formação da estrutura secundária e terciária que ocorre durante a inserção de proteínas na membrana externa de *E. coli* (Kleinschmidt, 2003). Assim, poder-se-ia especular que uma possível função de *hspA* e outras chaperonas durante o cultivo de *A. ferrooxidans* em privação de fosfato poderia envolver o auxílio na inserção correta e a proteção de superfícies hidrofóbicas de transportadores e porinas específicas deste estresse nas membranas celular e externa do microrganismo.

6- Análise das Alterações Morfológicas de *A. ferrooxidans* Submetida à Privação de Fosfato

6.1- Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica, normalmente chamada de AFM (*Atomic Force Microscopy*), desenvolvida por Binnig *et al.* (1986), pertence a uma classe de aparelhos chamada *scanning probe microscopes*. Estes microscópios, ao contrário de outros mais convencionais como os ópticos e os eletrônicos, não produz imagens a partir da detecção de fótons ou elétrons. Os *scanning probe microscopes* produzem imagens a partir da interação entre a superfície da amostra e uma sonda localizada na ponta de uma alavanca. No caso da AFM, as imagens são geradas a partir da detecção de forças entre a amostra e uma sonda de dimensões microscópicas (Dufrêne, 2002).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Em espécimes biológicos, a AFM é capaz de produzir imagens com magnificação semelhante a microscópios eletrônicos. A AFM oferece também outros benefícios: aquisição quantitativa de dados em três dimensões; preparação rápida e simples de amostras, sem a necessidade de vácuo ou tratamento com sais de ouro ou ósmio; em alguns casos, há a possibilidade de aquisição de dados em tempo real (Braga & Ricci, 2002). Além disto, a AFM proporciona outras vantagens tais como: maior facilidade no procedimento de medição das dimensões celulares em bactérias, permite a avaliação de parâmetros físicos – tais como dureza e elasticidade – e em determinadas condições, pode analisar células vivas (Dufrene, 2002).

Até o início dos anos noventa, a AFM era utilizada primordialmente em estudos das ciências físicas. Entretanto à partir dos anos noventa, esta forma de microscopia começou a ser amplamente utilizada em várias áreas das ciências biológicas, como, por exemplo, no estudo de biomoléculas como proteínas e DNA (Engel *et al.*, 1999; Muller & Anderson, 2002). No que concerne à microbiologia, a AFM já foi extensivamente utilizada para caracterizar superfícies de células microbianas (Dufrêne, 2001), substâncias poliméricas extracelulares (van der Aa & Dufrêne, 2002) e em vários estudos de morfologia microbiana (Braga & Ricci, 1998; Bolshakova *et al.*, 2001; Steinberger *et al.*, 2002). Em *A. ferrooxidans*, a AFM foi utilizada para demonstrar que durante a oxidação da pirita, esta bactéria adere em irregularidades e rachaduras microscópicas da superfície deste mineral (Gehrke *et al.*, 2001). Recentemente, Bevilaqua *et al.* (2004), utilizaram a AFM para estudar a aderência de *A. ferrooxidans* durante a dissolução oxidativa de calcopirita.

Em um trabalho de 1993, Seeger & Jerez relataram que células de *A. ferrooxidans* R2 submetidas à privação de fosfato tornavam-se alongadas, com um aumento de até dez vezes em seu comprimento. Este foi um resultado inesperado, uma vez que tradicionalmente bactérias com formato de bacilos e vibriões assumem uma morfologia cocóide durante à privação nutricional. Exemplos são conhecidos em diversas espécies tais como: *Klebsiella pneumoniae* (Lappin-Scott *et al.*, 1988); *Pseudomonas aeruginosa* (Robinson *et al.*, 1984; Cefalì *et al.*, 2002); *Pseudomonas putida* (Givskov *et al.*, 1994); *Acinetobacter sp.* (James *et al.*, 1995); *Vibrio cholerae* (Wai *et al.*, 1999); *Vibrio sp.* isoladas de ambiente marinho (Kjllenberg *et al.*, 1982). Em *E. coli*, tal fenômeno já foi extensivamente relatado na literatura (Donachie *et al.*, 1976; Jenkins *et al.*, 1988; Rockabrand *et al.*, 1995). Bactérias cocóides como *Staphylococcus aureus* também sofrem redução em suas dimensões (Watson *et al.*, 1998) durante à privação nutricional.

No estudo de Seeger & Jerez (1993) a obtenção de imagens foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão, porém, com baixa magnificação. Nestas imagens, com exceção do tamanho aproximado e forma das células, poucas informações foram obtidas. Deste modo, o uso da AFM poderia fornecer informações mais precisas sobre a morfologia de *A. ferrooxidans* submetida à privação de fosfato. Para isto, foram analisadas células cultivadas nas condições controle (1,75 mM de K_2HPO_4), células cultivadas em meio de cultura sem nenhuma fonte de fosfato e ainda células repicadas quatro vezes em meio sem fosfato.

Para a realização de nossos experimentos, houve um período inicial de otimização e padronização das condições de cultura e preparo das amostras. As amostras foram visualizadas após depósito em duas superfícies: mica recém-clivada e silício opticamente polido. Para a obtenção de imagens de *A. ferrooxidans*, o silício (opticamente polido) mostrou-se um melhor substrato que a mica, sendo utilizado em todas as imagens subseqüentes e em todas as imagens mostradas.

As imagens obtidas de células cultivadas em 1,75 mM de K_2HPO_4 (fig. 24) mostraram que, nestas condições as células de *A. ferrooxidans* LR apresentaram a forma de pequenos bacilos, possuindo superfícies lisas, com pequenas irregularidades. Em comparação as imagens obtidas de outras bactérias Gram-negativas (Umeda *et al.*, 1998), a superfície das células de *A. ferrooxidans* mostrou-se mais lisa. Pode-se observar que houve pouca variação fenotípica entre as células observadas, todas têm aproximadamente o mesmo tamanho e aparência. Algumas células em aparente divisão celular, evidenciada pela existência de um provável anel de divisão puderam ser observadas (fig. 24C). Apesar de constar na descrição da espécie que *A. ferrooxidans* são bactérias possuidoras de flagelos polares (Kelly & Wood, 2000), nenhum flagelo foi observado, em nenhuma das condições estudadas (figs. 24, 25 e 26).

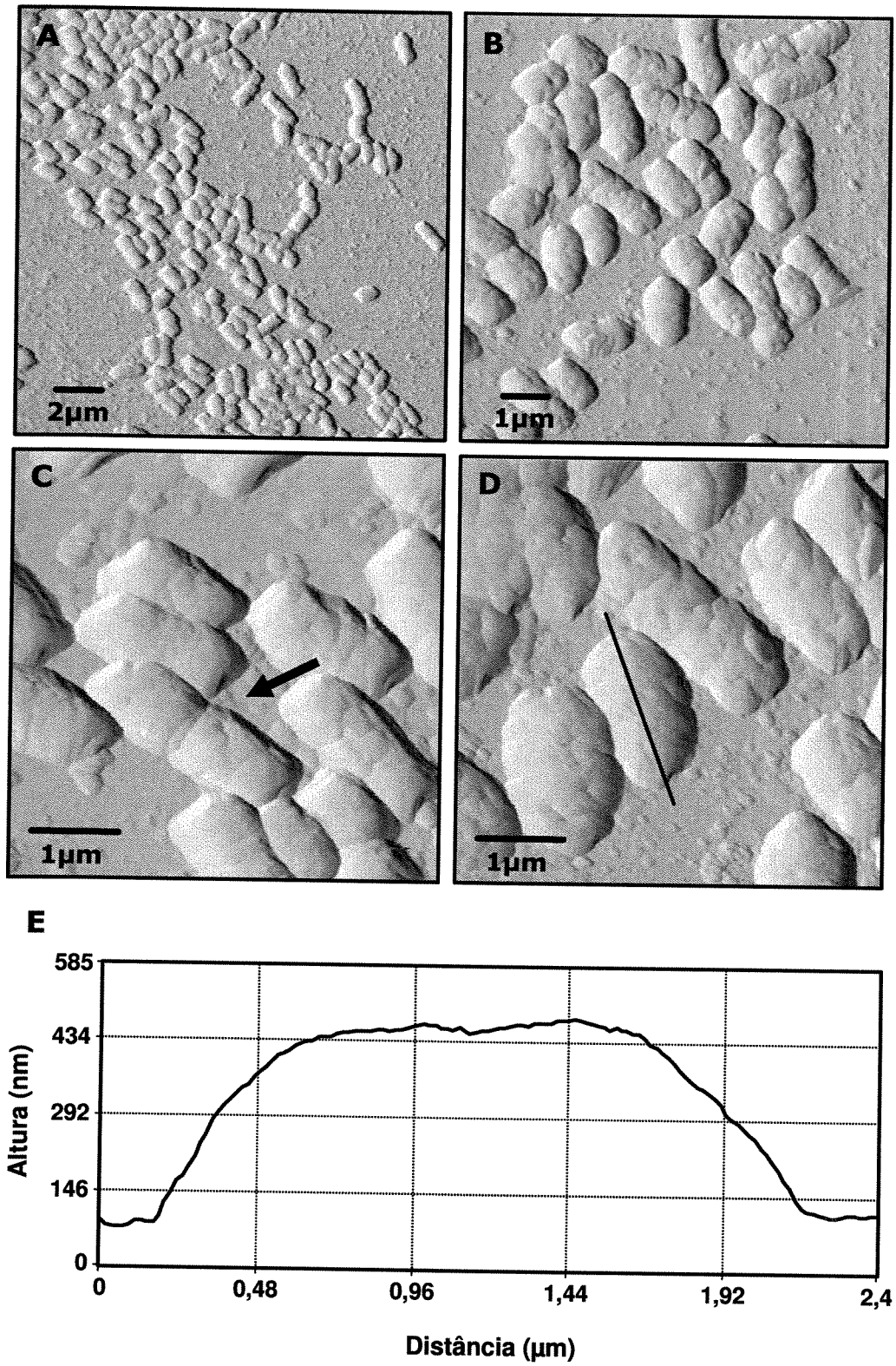

Figura 24: Microscopia de força atômica de *A. ferrooxidans* cultivada em meio com 1,75 mM de K_2HPO_4. A) Imagem com *scan range* de 20 µm. B) *Scan range* 10 µm. C e D) *Scan range* de 5 µm. A seta indica uma provável célula em divisão E) Perfil vertical (gráfico altura X distância) correspondente à linha que corta a bactéria marcada em D. Todas as imagens foram obtidas utilizando silício opticamente polido como substrato.

As imagens obtidas à partir de células originárias de culturas de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato revelaram que as mesmas apresentavam severas alterações morfológicas em comparação as células controle (figs. 25 e 26). Tal como descrito por Seeger & Jerez (1993), foi observado um aumento do comprimento celular. Outra modificação morfológica observada nas células submetidas à privação de fosfato, foi uma considerável modificação na superfície celular das células estressadas. Ao contrário das células cultivadas em condições controle, as células privadas de fosfato apresentaram superfícies bastante irregulares, enrugadas (figs. 25 e 26). Entretanto, não foram observadas evidências de rompimento da membrana ou parede celular destas células. Pode-se ainda observar variações na altura das células, algumas regiões apresentaram altura semelhante a de células controle, e outras mostraram-se consideravelmente mais baixas. Este fenômeno é mais facilmente observado nos gráficos altura X distância (figs. 24E, 25E e 26E).

Também é possível observar que, ao contrário das células cultivadas nas condições controle, as células sujeitas à privação nutricional apresentaram grande variação fenotípica. Há células de diversos tamanhos e com diferentes combinações de altura. Algumas são baixas ou altas (com irregularidades) em toda sua extensão ao passo que outras apresentam regiões altas e baixas (figs. 25 e 26). O pleiomorfismo de culturas bacterianas submetidas à privação nutricional foi relatado anteriormente em células de *E. coli* submetidas à privação nutricional em superfícies inorgânicas como aço inox (Wainwright *et al.*, 1999). Contudo, neste caso o pleiomorfismo apresentado pelas células foi bem mais radical que o observado em *A. ferrooxidans*.

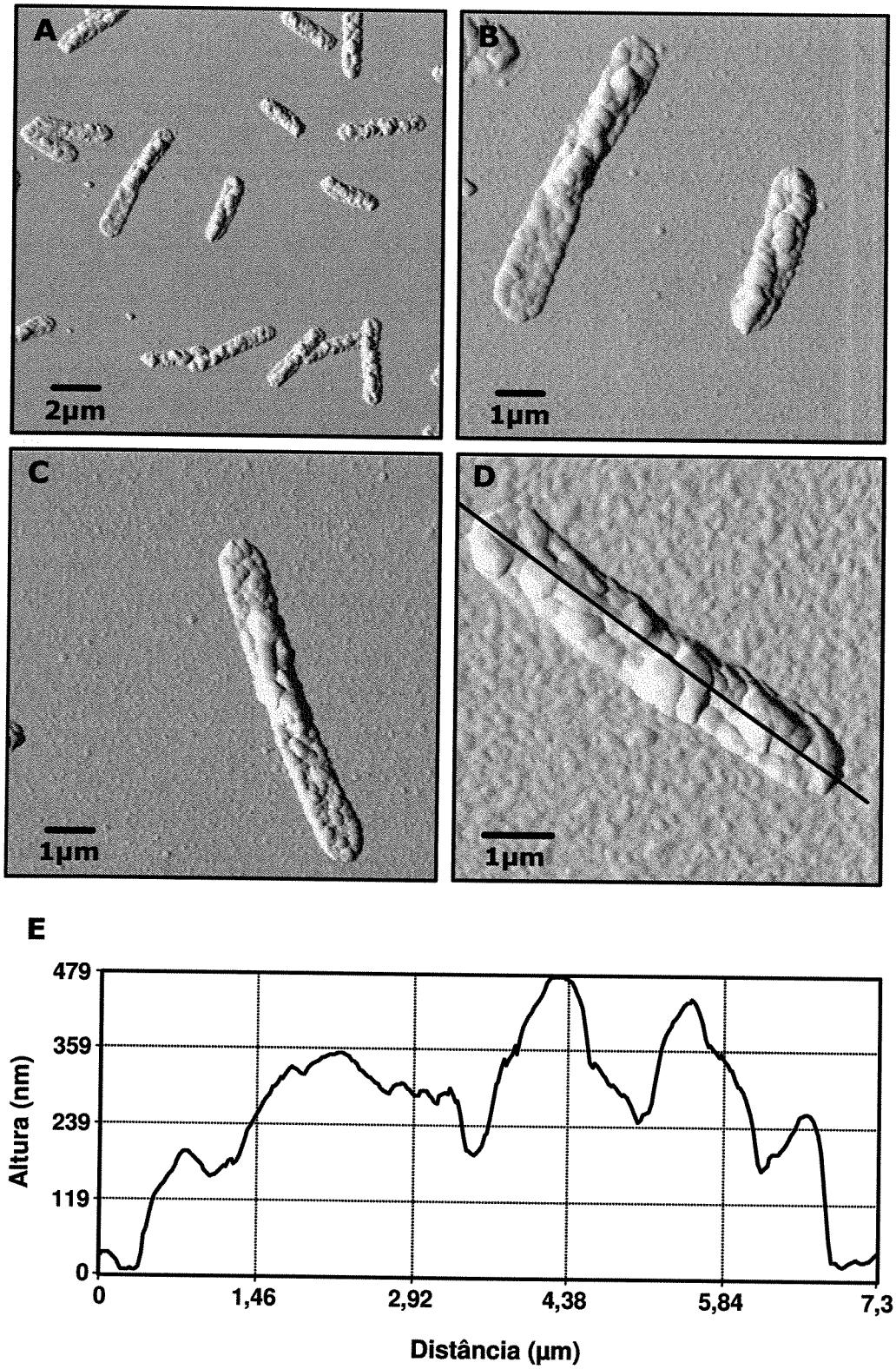

Figura 25: Microscopia de força atômica de *A. ferrooxidans* cultivada em meio sem K_2HPO_4. A) Imagem com *scan range* de 20 µm. B) *Scan range* 10 µm. C e D) *Scan range* de 6 µm. E) Perfil vertical (gráfico altura X distância) correspondente à linha que corta a bactéria marcada em D. Todas as imagens foram obtidas utilizando silício opticamente polido como substrato.

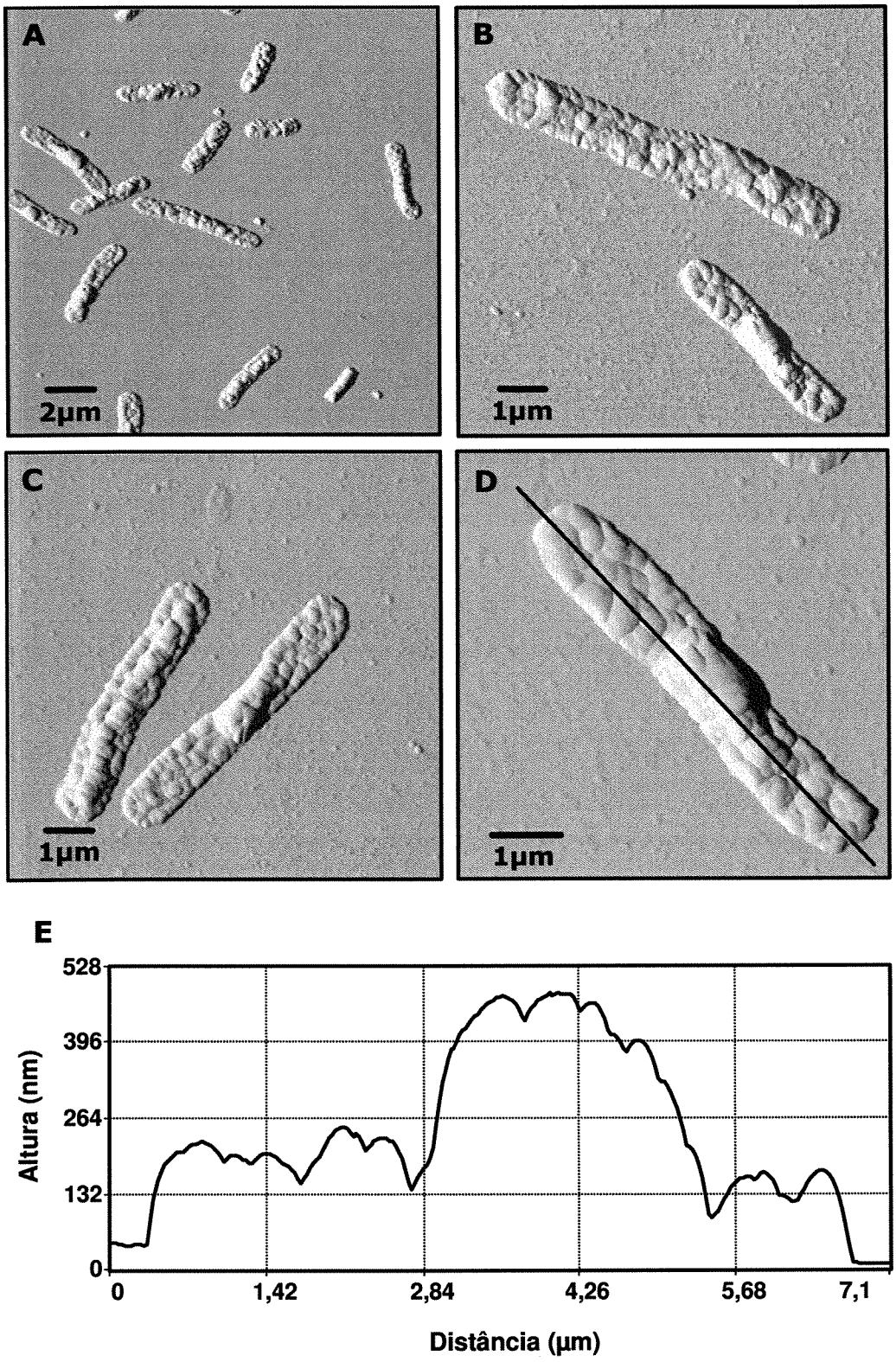

Figura 26: Microscopia de força atômica de *A. ferrooxidans* repicada 4 vezes em meio sem K_2HPO_4. A) Imagem com *scan range* de 20 µm. B) *Scan range* 10 µm. C e D) *Scan range* de 6 µm. E) Perfil vertical (gráfico altura X distância) correspondente à linha que corta a bactéria marcada em D. Todas as imagens foram obtidas utilizando silício opticamente polido como substrato.

6.2- Análise estatística dos dados obtidos com a AFM

Um mínimo de 30 células de cada tratamento tiveram suas dimensões celulares medidas, em dois experimentos independentes. Foram mensurados o comprimento, a largura em dois pontos diferentes e a altura máxima de cada célula. Este dados estão compilados na figura 27.

A dimensão que mais variou nas condições estudadas foi o comprimento celular (fig. 27). As células cultivadas em meio sem nenhuma fonte de fosfato adicionada apresentaram comprimentos, em média, três vezes maiores do que células cultivadas na presença (1,75mM) deste nutriente. Contudo, células bem maiores, possuindo quase 10 μm, foram encontradas entre as células cultivadas em meio sem fosfato. Por outro lado, nas células controle somente em casos extremos foram observados comprimentos próximos a 2 μm. O tamanho médio de células cultivadas na condição controle foi de aproximadamente 1,5 μm (fig. 27). As células cultivadas nas condições controle apresentaram uma variação muito pequena em seu comprimento (fig. 27). Uma variação muito maior ocorreu nas células submetidas à privação de fosfato (fig. 27), fato evidenciado pelo maior desvio padrão no comprimento destas células.

A análise por ANOVA indicou que tanto o tratamento (cultivo em meio com ou sem fosfato) quanto as réplicas dos experimentos tiveram um efeito significativo ($P < 0,05$) no comprimento das células. Contudo, o tratamento foi responsável por 68,7% de toda a variabilidade encontrada no comprimento das células, ao passo que as réplicas dos experimentos influíram apenas em 1%. Assim, além de ser a dimensão que mais variou, o comprimento celular foi a mais afetada pelo cultivo em meio sem fosfato.

Um teste *a posteriori* de Tukey mostrou que há diferenças significativas ($P < 0,05$) no comprimento das células controle e das células submetidas à privação de fosfato. Contudo, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) no comprimento das células que foram simplesmente cultivadas em meio sem fosfato, e as células que foram repicadas quatro vezes em meio sem fosfato. Ou seja, no que concerne o comprimento celular, a resposta morfológica de *A. ferrooxidans* à privação de fosfato é a mesma, nas duas situações testadas.

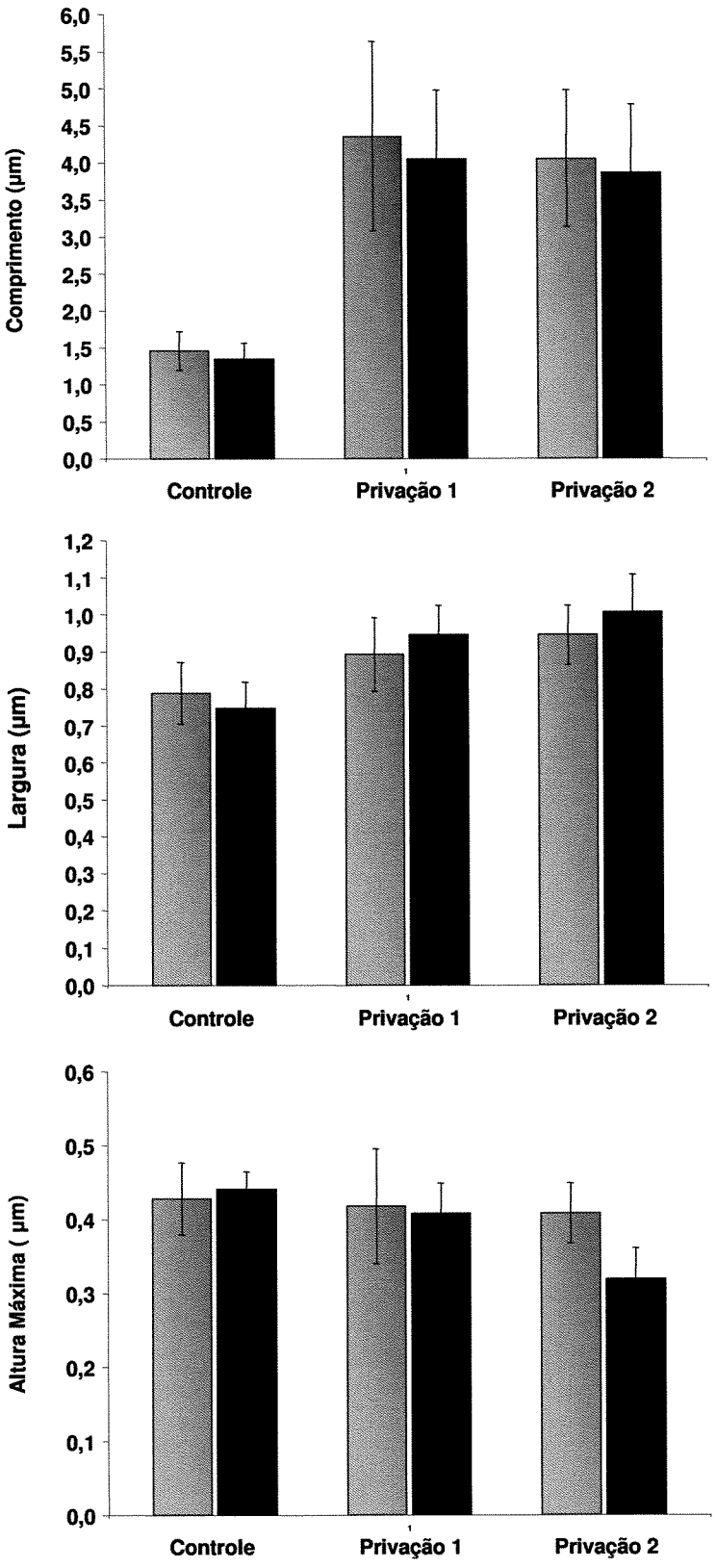

Figura 27: Medidas das dimensões celulares de *A. ferrooxidans* cultivada em 1,75 mM de K_2HPO_4 (controle), 0 mM de K_2HPO_4 (Privação 1) e repicadas quatro vezes em meio com 0 mM de K_2HPO_4 (Privação 2). A medidas realizadas em experimentos independentes estão colocadas lado a lado.

A largura celular mostrou ser uma dimensão bem mais constante, tanto dentro de uma mesma condição de cultivo quanto quando se compara as réplicas dos experimentos. A ANOVA mostrou que, assim como ocorreu no caso do comprimento, o cultivo na presença ou ausência de fosfato, assim como as réplicas dos experimentos influiram significativamente na largura das células. De toda a variação observada nesta dimensão, 46,5% pôde ser atribuída à condição de cultivo. As réplicas dos experimentos influíram em apenas 1,2% da variação observada. Assim, a maior parte da variação observada na largura das células pode ser atribuída a variação não explicada pelo modelo estatístico utilizado nas análises.

Em comparação com as alterações no comprimento celular, o efeito das variáveis tratamento e experimento (réplica) na mofidicação da largura das células foi bem menor. Tomando como base a média ajustada das larguras em cada condição de crescimento, o aumento da largura de células cultivadas e repicadas quatro vezes em meio sem fosfato em comparação com o controle, foi de 19 e 26%, respectivamente. No caso do comprimento celular, o aumento foi de aproximadamente 300%, nas duas situações.

O teste *a posteriori* de Tukey mostrou que há diferenças significativas entre a largura das células cultivadas nas condições controle, e em ambas situações de privação nutricional. Além disto, ao contrário do observado para o comprimento celular, houve diferença estatisticamente significativa entre a largura das células crescidas em meio sem fosfato e as células repicadas quatro vezes neste mesmo meio. Entretanto este efeito é pequeno, correspondendo a um aumento médio de apenas 0,048 μm (48 nm) na largura das células repicadas quatro vezes em meio sem fosfato, em comparação com as células cultivadas em meio sem fosfato. Assim, é possível que este efeito, apesar de estatisticamente significativo, não possua significado biológico. A título de comparação, o aumento nas médias ajustadas (média de um determinado fator, considerando todos os outros constantes) da largura de células cultivadas na presença de fosfato e das células subtidas à privação de fosfato é de 152 nm, para células cutivadas em meio sem fosfato e de 201 nm para célula repicadas quatro vezes neste mesmo meio de cultura.

A altura máxima das células de *A. ferrooxidans* não foi afetada pelas réplicas dos experimentos, mas foi influenciada significativamente pelo cultivo das células em meio com e sem fosfato. Contudo, apenas 35% da variação observada na altura das células pôde ser atribuída ao tratamento dado quanto ao meio de cultivo. Curiosamente o teste *a posteriori* de Tukey mostrou que não há diferenças significativas entre a altura máxima das células

cultivadas na presença de 1,75 mM de K_2HPO_4 e das células cultivadas em meio sem fosfato. Por outro lado, a altura máxima de células repicadas quatro vezes em meio sem fosfato mostrou ser significativamente menor que a das células cultivadas nas outras duas condições testadas, sendo a média ajustada da altura destas células aproximadamente 20% menor.

A altura mínima das células submetidas à privação de fosfato também foi mensurada. Uma vez que não há grandes deformações na superfície das células cultivadas nas condições controle, a medição só foi realizada em células privadas de fosfato. A parte mais baixa das células apresentou valores que variavam entre 200 e 50 nm. Todos os tratamentos e réplicas apresentaram valores médios próximos de 150 nm. Não foram encontratadas diferenças significativas entre a altura mínima nas duas situações de privação de fosfato.

6.3- Interpretação dos resultados obtidos

Apesar de ser amplamente divulgado que a resposta canônica de bactérias frente à privação nutricional envolve redução de dimensões celulares, há outros exemplos de aumento destas em condições de limitação nutricional. Em *Listeria monocytogenes*, ocorre aumento do comprimento das células durante crescimento em pH ácido concomitante a altas concentrações de NaCl (Bereksi *et al.*, 2002). O cultivo em meio contendo concentrações subótimas de ácidos orgânicos também induz um aumento do comprimento em *Lactobacillus alimentarius*. Nestas bactérias, as células controle apresentam comprimentos que variam de 1 a 2 μm em condições normais de crescimento. Na presença dos ácidos orgânicos, foram encontradas células de até 5 μm (Lemay et al., 2000). Braga & Ricci (1998), relataram que células de *E. coli* cultivadas em concentrações subletais (sub-MIC) de antibióticos além de modificações na estrutura celular, apresentam comprimentos maiores que o de células controle. De acordo com Mattick *et al.* (2003), o cultivo em temperaturas, concentrações salinas e pHs estressantes, mas em que há crescimento celular, resulta no aparecimento de células com até 200 μm de comprimento em *E. coli* e *Salmonella enterica*. Dependendo da condição de cultivo e da linhagem estudada, diferentes proporções da população total de células apresentam o fenótipo alongado. Algumas das células pleiomórficas de *E. coli* em superfícies inorgânicas relatadas por Wainwright *et al.* (1999) apresentaram aumentos radicais em seu comprimento, sendo relatada a existência de células com até 50 μm. Em outro estudo, Steinberger *et al.* (2002) demonstraram que células de

biofilmes de *P. aeruginosa* cultivados em condições de limitação nutricional moderada de nitrogênio e carbono também apresentam aumento no comprimento celular.

É interessante notar que estes estudos têm em comum, o fato de relatarem aumento no comprimento de células cultivadas em condições estressantes em que há crescimento limitado. A única exceção a esta regra é o estudo realizado por Wainwright *et al.* (1999), que relatou aumento do comprimento de células submetidas à privação nutricional, em superfícies inorgânicas. Por outro lado, os estudos que descrevem a transição de bactérias com morfologia bacilar para a forma cocóide, utilizam condições mais severas de privação nutricional. Os estudos de Kjelleberg *et al.* (1982), Baker *et al.* (1983), Lappin-Scott *et al.* (1988), Rockabrand *et al.* (1995), James *et al.* (1995) e van Overbeek *et al.* (1995) utilizaram como condição de privação nutricional a manutenção de células em meio mínimo, solução salina, ou tampão sem a presença de nenhuma fonte de energia e carbono. Em outro estudo que descreve o aparecimento de formas cocóides em uma bactéria que normalmente apresenta o formato de bacilos, as células foram cultivadas em meio rico em fontes de carbono e energia e mantidas neste por 45 dias, ocorrendo, deste modo, total depleção dos nutrientes do meio (Cefalì *et al.*, 2002).

Assim, parece razoável concluir que, em geral, bactérias com morfologia bacilar assumem a morfologia cocóide em condições de privação nutricional total, aumentando seu comprimento em resposta a estresses moderados. Mattick *et al.* (2003) sugeriram que este aumento do comprimento celular poderia representar uma estratégia para economizar energia, evitando o gasto energético da etapa final da divisão celular. Steinberger *et al.* (2002), sugeriram outra vantagem para o alongamento de células cultivadas em limitação nutricional. O aumento do comprimento celular promove um aumento da superfície de contato da bactéria com o meio. Isto poderia otimizar a aquisição de nutrientes escassos. Obviamente estas hipóteses não são, necessariamente, mutuamente exclusivas. Curiosamente, Ferenci (2001) propôs a existência de um estado fisiológico intermediário entre a privação nutricional completa e a abundância de nutrientes que caracteriza as condições de crescimento exponencial.

Seeger e Jerez (1993), sugeriram que o aumento no comprimento das células de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato seria resultado da incapacidade de duplicação do DNA. Dentro do contexto apresentado acima, parece pouco provável que esta explicação esteja correta. É mais provável que o fenômeno observado represente uma adaptação ativa das células

de *A. ferrooxidans* frente à baixa disponibilidade de fosfato. O aumento do comprimento celular poderia ser interpretado como uma tentativa das células de aumentar sua superfície de contato com o meio de cultura (Steinberger *et al.*, 2002), otimizando a capacidade de captação de fosfato, que poderia ser proveniente de células mortas ou de impurezas de outros reagentes utilizados no meio de cultura. Além disto, de acordo com Mattick *et al.* (2003), a ausência de divisão celular resultaria em uma economia de energia para as células, evitando uso excessivo de suas prováveis reservas de fosfato. O fato de que o aumento do comprimento celular é o mesmo nas células cultivadas em meio sem fosfato e repicadas por quatro vezes nestas mesmas condições, corrobora a hipótese de que este fenômeno represente uma adaptação de *A. ferrooxidans* à privação de fosfato. Se a hipótese de Seeger e Jerez (1993) estivesse correta, seria esperado que o cultivo repetido em meio sem fosfato levasse a aumentos cada vez maiores no comprimento celular, o que não foi observado nos experimentos.

Poucos estudos de morfologia bacteriana se preocuparam em analisar a largura celular. Ao contrário do observado em nossos experimentos, Trueba & Woldringh (1980), relataram que em meio rico, durante o ciclo celular, células de *E. coli* com maiores comprimentos apresentaram menores larguras. Em células de *Acinetobacter sp.* com morfologia cocóide devido à privação nutricional total, o inóculo em meio rico é acompanhado de um período de aumento (20%, em média) da largura celular. Contudo, após uma hora, e durante o resto do crescimento exponencial, o comprimento celular continuou a crescer ao passo que a largura celular permaneceu constante (James *et al.*, 1995). Van de Merwe *et al.* (1997), também relataram que ao passar para uma condição nutricional mais rica, células de *E. coli* tiveram aumentos em sua largura. Já em 1958, Schaechter *et al.* haviam relatado que células de *Salmonella typhymurium* cultivadas em meio rico são mais largas que células cultivadas em meio mínimo. Em um estudo mais recente, Steinberger *et al.* (2002) não encontraram diferenças significativas na largura de células de biofilmes formados por *P. aeruginosa* em diversas condições de limitação nutricional.

Num primeiro momento, pode-se pensar que o aumento da largura das células de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato poderia representar uma adaptação para aumentar a área de superfície das bactérias, tal como provavelmente ocorre com o comprimento celular. Entretanto, apesar de haver exceções, os dados da literatura mostram que, em geral, bactérias apresentam menores larguras em meios que possuem menor concentração de nutrientes. Deste modo, o comportamento da largura de *A. ferrooxidans* neste

estudo é diferente do observado em outras bactérias. Assim, é possível especular algumas razões para o aumento da largura de células de *A. ferrooxidans* nas condições de privação nutricional testadas. Pode-se pensar que a retirada do K_2HPO_4 do meio de cultura, tenha levado a uma diminuição da pressão osmótica do meio suficiente para aumentar a entrada de água nas células de *A. ferrooxidans*. Contudo, isto é bastante improvável, já que o K_2HPO_4 representa apenas 1,38% da concentração salina total do meio T&K. Outra possibilidade seria a de que as células de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato apresentassem menor resistência em sua estrutura externa (parede celular e membranas). Deste modo, as células mais frágeis poderiam se espalhar mais que células controle ao serem depositadas na superfície de silício utilizada nas visualizações. Por fim, pode-se supor que *A. ferrooxidans*, diferentemente do que até o momento foi observado em outras bactérias, apresente um aumento da largura celular como uma adaptação à privação nutricional.

O aparecimento de irregularidades na superfície de bactérias submetidas a estresse foi relatado em um pequeno número de casos. Células de *E. coli*, cultivadas em concentrações subinibitórias do antibiótico cefodizima (um inibidor da síntese da parede celular) apresentam, além de maior comprimento celular, menor altura em grandes extensões das células (Braga & Ricci, 1998), conforme observado por AFM. Neste estudo pôde-se observar que células crescidas nestas condições possuem superfícies rugosas. Células submetidas a concentrações supra-inibitórias (supra-MICs) de cefodizima também apresentaram superfícies rugosas, porém com flagrante rompimento da parede celular. Sharma *et al.* (2003) observaram, através de AFM, células de *E. coli* expostas a um composto com propriedades antimicrobianas. Estas células apresentaram superfícies semelhantes às observadas neste trabalho para células de *A. ferrooxidans* submetidas à privação de fosfato: a superfície celular mostrou-se radicalmente alterada, porém sem evidências de rompimento da parede celular. Cefalì *et al.* (2002) utilizaram a AFM para observar células de *P. aeruginosa* submetidas a vários (até 45) dias de privação nutricional. Nos primeiros dias de privação nutricional, as células apresentaram um perfil vertical semelhante ao observado em *A. ferrooxidans* durante a privação de fosfato. Células privadas de nutrientes por 45 dias apresentaram rompimento da parece celular, com vazamento de conteúdo citoplasmático. É digno de nota que, diversos trabalhos relataram a ausência de danos na estrutura celular de bactérias Gram-negativas observadas por AFM submetidas à secagem simples, em um procedimento semelhante ao utilizado neste trabalho (Braga & Ricci, 1998; Auerbach *et al.*, 2000; Cefalì *et al.*, 2002).

Cefalì *et al.* (2002), citaram possíveis razões para as alterações na superfície das células observadas em seu estudo, são elas: redução da espessura do envelope celular; variação na densidade do material citoplasmático; variação da composição do material citoplasmático; perda de uma das camadas do envelope celular e destruição do envelope celular, com extrusão de material citoplasmático. A hipótese que melhor explica os resultados obtidos em *A. ferrooxidans* durante o cultivo em meio sem fosfato seria a alteração na espessura (e conseqüentemente resistência) do envelope celular nestas condições. As hipóteses de alteração no conteúdo citoplasmático também se apresentam como alternativas possíveis, podendo ocorrer concomitantemente ao enfraquecimento do envelope celular. As imagens obtidas não corroboram as hipóteses de que poderia ocorrer perda de camadas, ou rompimento do envelope celular.

Assim, pode-se especular que o enfraquecimento do envelope celular e/ou alterações no citoplasma seriam os responsáveis pelo aumento atípico da espessura de *A. ferrooxidans* durante à privação de fosfato. A possibilidade de notar que em uma mesma célula, regiões mais altas são visivelmente mais finas, corrobora esta hipótese (figs. 25 B e C; 26 C). Num contexto de economia de energia, em que nem mesmo o processo de divisão celular seria concluído, não é improvável que a manutenção da estrutura celular fique reduzida a níveis mínimos para a sobrevivência. A menor altura máxima de células repicadas quatro vezes em meio sem fosfato, em comparação com células cultivadas em meio sem fosfato, poderia indicar que o crescimento contínuo em meio sem fosfato, levaria a um comprometimento cada vez maior na qualidade da manutenção da estrutura celular. A altura mínima estatisticamente igual nas duas condições, sugere um nível mínimo aceitável de manutenção da estrutura do envelope celular e/ou de densidade do citoplasma para a sobrevivência das células. É importante lembrar que as células observadas estavam viáveis no meio de cultura, já que apresentavam crescimento quando repicadas.

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições de privação de fosfato testadas, foi possível observar mudanças fisiológicas, morfológicas e de expressão gênica em *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR.

Os genes identificados como expressos diferencialmente em privação de fosfato provavelmente estão envolvidos na resposta a outros estresses, uma vez que tem sua expressão aumentada nestas condições.

Apesar de situados em diferentes unidades transcricionais, os genes *ribB* e *ribBA* provavelmente possuem mecanismos de regulação coincidentes, pois possuem um padrão de expressão semelhante.

A indução do gene *hspA* em condições de privação de fosfato sugere que outras proteínas de choque térmico também estão envolvidas na resposta à privação de fosfato, uma vez que as α-HSPs atuam em conjunto com outras destas proteínas.

As alterações observadas na superfície de *A. ferrooxidans* LR privadas de fosfato possivelmente são fruto de danos moderado à estrutura celular.

O aumento de comprimento *de A. ferrooxidans* em privação de fosfato provavelmente representa uma adaptação da bactéria a estas condições. A ausência de divisão celular poderia ser uma forma de economia de energia. O aumento da superfície celular poderia aumentar a superfície de contato da bactéria com o meio de cultura, otimizando a absorção de fosfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu Kwaik, Y.; Engleberg N.C. (1994). Cloning and molecular characterization of a *Legionella pneumophila* gene induced by intracellular infection and by various in vitro stress conditions. *Molecular Microbiology*, 13: 243–251.

Allen S.P.; Polazzi, J.O.; Gierse, J.K.; Easton, A.M. (1992). Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 6938-6947.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.

Alvarez, S.; Vera, M.; Jerez, C.A.; Guiliani, N. (2001). Polyphosphates, polyphosphate kinase activity and *ppk* gene in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859. Em: Ciminelli, V.S.T., Garcia Jr., O. (eds.), *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part A*, pp. 355-362. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Amaro, A.M.; Chamorro, A.; Seeger, M.; Arredondo, R.; Peirano, I.; Jerez, C.A. (1990). Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 173: 910-915.

Antelmann, H.; Scharf, C.; Hecker, M. (2000). Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *Journal of Bacteriology* 182: 4478-4490

Arsene, F.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 3-9.

Auerbach, I.D.; Sorensen, C.; Hansma, H.G.; Holden, P.A. (2000). Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 182: 3809-3815.

Bacher, A.; Eberhardt, S. ; Richter, G. (1996). Biosynthesis of riboflavin. Em: Neidhardt, F.C.; Curtiss, R. III; Ingraham, J.L.; Lin, E.C.C.; Low, K.B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W.S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umbarger, H.E. (eds.), *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology* 2ª ed, Vol. 1, pp. 657-664. ASM Press, Washington, D.C.

Baker, R.M.; Singleton, F.L.; Hood, M.A. (1983). Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 930-940.

Barquera B.; Zhou W.; Morgan J.E.; Gennis R.B. (2003). Riboflavin is a component of the Na+-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 10322-10324.

Barron, J.L.; Lueking, D.R. (1990). Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2801–2806.

Basha, E.; Lee, G.J.; Breci, L.A.; Hausrath, A.C.; Buan, N.R.; Giese, K.C.; Vierling, E. (2004). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 7566-7575.

Bateman, A.; Coin, L.; Durbin, R.; Finn, R.D.; Hollich, V.; Griffiths-Jones, S.; Khanna, A.; Marshall, M.; Moxon, S.; Sonnhammer, E.L.; Studholme, D.J.; Yeats, C.; Eddy, S.R.(2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue): D138-D141.

Beck, J.V.; Shafia, F.M. (1964). Effect of phosphate ion and 2,4-dinitrophenol on the activity of intact cell of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 88: 850-857.

Bereksi, N; Gavini, F; Bénézech, T; Faille, C. (2002). Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 556-565.

Bevilaqua, D.; Diez-Perez, I.; Fugivara, C.S.; Sanz, F.; Benedetti, A.V.; Garcia Jr, O.. (2004). Oxidative dissolution of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. *Bioelectrochemistry*, 64: 79-84.

Bidle, K.A. (2003). Differential expression of genes influenced by changing salinity using RNA arbitrarily primed PCR in the archaeal halophile *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*, 7: 1-7.

Bidle, K.A.; Barlett, D.H. (2001). RNA arbitrarily primed PCR survey of genes regulated by ToxR in deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *Journal of Bacteriology*, 183: 1688-1693.

Binnig, G.; Quate, C.F.; Gerber, C. (1986). Atomic force microscopy. *Physical Review Letters*, 56: 930-933.

Bolshakova, A.V.; Kiselyova, O.I.; Filonov, A.S.; Frolova, O.Y.; Lyubchenko, Y.L.; Yaminsky, I.V. (2001). Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy*, 86: 121-128.

Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20: 591-604.

Brady, J.P.; Garland, D.; Duglas-Tabor, Y.; Robison Jr., W.G.; Groome, A.; Wawrousek, E.F. (1997). Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 94: 884-889.

Braga, P.C.; Ricci, D. (1998). Atomic Force Microscopy: Application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 18-22.

Brasseur, G.; Levican, G.; Bonnefoy, V.; Holmes, D.; Jedlicki, E.; Lemesle-Meunier, D. (2004). Apparent redundancy of electron transfer pathways via bc(1) complexes and terminal oxidases in the extremophilic chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1656: 114-26.

Brierley, J.A.; Brierley, C.L. (2001). Present and future commercial application of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 59: 233-239.

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.

Callahan, S.M.; Dunlap, P.V. (2000). LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-*lux* genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 182: 2811-2822.

Cefali, E.; Patane, S.; Arena, A.; Saitta, G.; Guglielmino, S.; Cappello, S.; Nicolo, M.; Allegrini, M. (2002). Morphologic variations in bacteria under stress conditions: near-field optical studies. *Scanning*, 24: 274-283.

Chia, JS.; Lee, Y.; Huanf, P.; Chen, J. (2001). Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. *Infection and Immunity*, 69: 2493-2501.

Clark, J.I.; Muchowski, P.J. (2000). Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 52-9.

Cobley, J.G.; Cox, J.C. (1983). Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiology Review*, 47: 579-595.

Das, A.; Mishra, A.; Roy, P. (1992). Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, 97: 167-172.

de Jong, W.W.; Caspers, G.; Leunissen, J.A.M. (1998). Genealogy of the α-Crystallin – small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22: 151-162.

DiSpirito, A.A.; Touvinen, O.H. (1992). Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives in Microbiology*, 133: 28-32.

Dominy, C.N.; Deane, S.M.; Rawlings, D.E. (1997). A geographically widespread plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans* has genes for ferredoxin-, FNR-, prismane- and NADH-oxidoreductase-like proteins which are also located on the chromosome. *Microbiology*, 143: 3123-3136.

Donachie, W.D.; Begg, K.J.; Vicente, M. (1976). Cell length, cell growth and cell division. *Nature*, 264: 328-333.

Drobner, E.; Huber, H.; Stetter, K.O. (1990). *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxider. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2922-2923.

Dufrêne, Y.F. (2001). Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron*, 32: 153-165.

Dufrêne, Y.F. (2002). Atomic force ficroscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 184: 5205-5213.

Engel, A.; Lyubchenko, Y.; Müller, D. (1999). Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work. *Trends in Cell Biology*, 9: 77-80.

Fassbinder, F.; Kist, M.; Bereswill, S. (2000). Structural and functional analysis of the riboflavin synthesis genes encoding GTP cyclohydrolase II (*rib*A), DHBP synthase (*rib*BA), riboflavin synthase (*rib*C), and riboflavin deaminase/reductase (*rib*D) from *Helicobacter pylori* strain P1. *FEMS Microbiological Letters*, 191: 191-197.

Ferenci, T. (2001). Hungry bacteria: definition and properties of a nutritional state. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 605-611.

Fleming, J. T.; Yao, W. H.; Sayler, G. S. (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3698-3706.

Fox B.; Walsh. C.T. (1982). Mercuric reductase. Purification and characterization of a transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 2498-503.

Garcia Jr, O.; da Silva, L.L. (1991). Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnology Letters*, 13: 567-570.

Garcia Jr, O; Bigham, J.M.; Tuovinen, O.H. (1995). Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 508-514.

Garcia Jr., O. (1997) Microrganismos e metais. Em: Deme, I.T.; Azevedo, J.L. (eds.), *Microbiologia Ambiental*, pp. 11-39. EMBRAPA-CNPMA.

Gehrke, T.; Hallmann, R.; Kinzler, K.; Sand, W. (2001). The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* – a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Science Technology*, 43: 159-167.

Givskov, M.; Eberl, L.; Moller, S.; Poulsen, L.K.; Molin, S. (1994). Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content. *Journal of Bacteriology*, 1994 Jan;176(1):7-14.

González-Márquez, H.; Perrin C.; Bracquart P.; Guimont C.; Linden G. (1997). A 16 kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology*, 5: 1587–1594.

Groat R.G.; Schultz, J.E.; Zychlinsky, E.; Bockman, A.; Matin, A. (1986). Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *Journal of Bacteriology*, 168: 486-93.

Guiliani, N.; Jerez, C.A. (2000). Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2318-2324.

Guzzo, J.; Delmas, F.; Pierre, F.; Jobin, M.P.; Samyn, B.; Van Beeumen, J.; Cavin, J.F.; Divies, C. (1997). A small heat shock protein from Leuconostoc oenos induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 393-396.

Harndahl, U.; Hall, R.B.; Osteryoung, K.W.; Vierling, E.; Bornman, J.F.; Sundby, C. (1999). The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress & Chaperones*. 4: 129-138.

Harris, R.M.; Webb, D.C.; Howitt, S.M.; Cox, G.B. (2002). Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183: 5008-5014.

Harrison Jr., A. P. (1982). Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Archives in Microbiology*, 131: 68-76.

Heckathorn, S.A.; Downs, C.A.; Sharkey, T.D.; Coleman, J.S. (1998). The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiology*, 116: 439-444.

Heidelbach, M.; Skladny, H.; Schairer, H.U. (1993). Heat shock and development induce synthesis of a low-molecular weight stress-responsive protein in the myxobacterium *Stigmatella auriantica*. *Journal of Bacteriology*, 175: 7479-7482.

Heidelbach, M.; Skladny, H.; Schairer, H.U. (1993a). Purification and characterization of SP21, a development-specific protein of the myxobacterium *Stigmatella aurantica*. *Journal of Bacteriology*, 175: 905–908.

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.

Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 148-152.

Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the δ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 373-395.

Hoffmann, M.R.; Faust, B.C.; Panda, F.A.; Koo, H.H.; Tsuchiya, M. (1981). Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 259-271.

Holmes, D.S.; Zhao, H.L.; Levican, G.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V.; Varela, P.; Jedlicki, E. (2001). ISAfe1, an ISL3 family insertion sequence from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859. *Journal of Bacteriology*, 183: 4323-4329.

Holmquist, L.; Nelson, D.R.; Kjelleberg, S. (1994). The DnaK homologue of the marine *Vibrio* sp. strain S14 binds to the unprocessed form of a carbon starvation-specific periplasmic protein. *Molecular Microbiology*, 11: 861-868.

Holuigue, L.; Herrera, L.; Phillips, O.M.; Young, M.; Allenda, J.E. (1987). CO_2 fixation by mineral-leaching bacteria: characteristics of the ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9: 497-505.

Hubert, W.A.; Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. (1995). Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Current Microbiology*, 31: 10-14.

Hulo, N.; Sigrist, C.J.; Le Saux, V.; Langendijk-Genevaux, P.S.; Bordoli, L.; Gattiker, A.; De Castro, E.; Bucher, P.; Bairoch, A. (2004). Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue): D134-D137.

Hutchins, S.R.; Davidson, M.S.; Brieley, J.A.; Brieley, C.L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, 40: 311-336.

Inoue, C.; Sugawara, K.; Kusano, T. (1991). The *mer*R regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the mer structural genes. *Molecular Microbiology*, 5: 2707-2718.

Inoue, C.; Sugawara, K.; Kusano, T. (1990). *Thiobacillus ferrooxidans mer* operon: sequence analysis of the promoter and adjacent genes. *Gene*, 96: 115-120

Ishige, T.; Krause, M.; Bott, M.; Wendisch, VF.; Sahm, H. (2004). The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *Journal of Bacteriology*, 185: 4519-4529.

Iwahori, K.; Takeuchi, F.; Kamimura, K.; Sugio, T. (2000). Ferrous iron-dependent volatilization of mercury by the plasma membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3823-3827.

James, G.A.; Korber, D.R.; Caldwell, D.E.; Costerton, J.W. (1995). Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 177: 907-915.

Jerez, C.A.; Seeger, M.; Amaro, A.M. (1992). Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, 98: 29-34.

Jin, C.; Barrientos, A.; Tzagoloff, A. (2003). Yeast dihydroxybutanone phosphate synthase, an enzyme of the riboflavin biosynthetic pathway, has a second unrelated function in expression of mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 14698-14703.

Jobin, M.; Delmas, F.; Garmyn, D.; Diviès, C.; Guzzo, J. (1997). Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Micriobiology*, 63: 609-614.

Karavaiko, G.I.; Turova, T.P.; Kondrat'eva, T.F.; Lysenko, A.M.; Kolganova, T.V.; Ageeva, S.N.; Muntyan, L.N.; Pivovarova, T.A. (2003). Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 113-119.

Kasai, S.; Sumimoto, T. (2002). Stimulated biosynthesis of flavins in *Photobacterium phosphoreum* IFO 13896 and the presence of complete *rib* operons in two species of luminous bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 269: 5851-5860.

Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen.nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 511-516.

Kim, K.; Kim, K. R.; Kim, S. H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 394: 595-599.

Kitagawa, M; Matsumura, Y.; Tsuchido, T. (2000). Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 184: 165-171.

Kjelleberg, S.; Humphrey, B.A.; Marshall, K.C. (1982). Effect of interfaces on small starved marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 11-66-1172.

Klein, G.; Laskowska, E.; Taylor, A.; Lipińska, B. (2001). IbpA/B small heat-shock protein of marine bacterium *Vibrio harveyi* binds to proteins aggregated in a cell during heat shock. *Marine Biotechnology*, 3: 346-354.

Kondrat'eva, T.F.; Muntyan, L.N.; Karavaiko, G.I. (1995). Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology*, 141: 1157-1162.

Kornberg, A.; Rao, N.N.; Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68: 89-125.

Krol, E.; Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Molecular Genetics and Genomics*, Publicação eletrônica.

Kuczyńska-Wisńik, D.; Laskowska, E.; Taylor, A. (2001). Transcription of the *ibp*B heat-shock gene is under control of δ^{32}- and δ^{54}- promoters, a third regulon of heat-shock response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284: 57-64.

Kusano, T.; Sugawara, K.; Inoue, C.; Takeshima, T.; Numata, M.; Shiratori, T. (1992). Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant as the selective marker by electroporation. *Journal of Bacteriology*, 174: 6617-6623.

Laksanalamai, P.; Robb, F.T.(2004). Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles*, 8: 1-11.

Landry, J.; Chretien, P.; Lambert, H.; Hickey, E.; Weber, L.A. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *Journal of Cell Biology*, 109:7-15.

Lappin-Scott, H.M.; Cusack, F.; MacLeod, A.; Costerton, J.W. (1988). Starvation and nutrient resuscitation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from oil well waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 64: 541-549.

Laskowska, E.; Bohdanowicz, J.; Kuczynska-Wisnik, D.; Matuszewska, E.; Kedzierska, S., Taylor, A. (2004). Aggregation of heat-shock-denatured, endogenous proteins and distribution of the IbpA/B and Fda marker-proteins in *Escherichia coli* WT and grpE280 cells. *Microbiology*, 150: 247-259.

Laskowska, E.; Wawrzynow, A.; Taylor, A. ferrooxidans (1996). IbpA and IbpB, the new heat shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie*, 78: 117-122.

Lavoie, J.N.; Gingras-Breton, G.; Tanguay, R.M.; Landry, J. (1993). Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 3420-3429.

Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 14: 103-120.

Lee, B.Y.; Hefta, S.A.; Brennan, P.J. (1992). Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 60: 2066-2074.

Lee, C.Y.; O´Kane, D.J.; Meighen, E.A. (1994). Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. *Journal of Bacteriology*, 176: 2100-2104.

Lee, S.; Owen H.A.; Prochaska D.J.; Barnum S.R. (2000). HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Current Microbiology*, 40: 283–287.

Lemay, M.J.; Rodrigue, N.; Gariepy, C.; Saucier, L. (2000). Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stress. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 249-253.

Levicán, G.; Bruscella, P.; Guacucano, M.; Inostroza, C.; Bonnefoy, V.; Holmes D.S.; Jedlicki, E. (1999). Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 184: 1498-1501.

Lin, J.W.; Chao, Y.F.; Weng, S.F. (2001). Riboflavin synthesis genes *ribB*, *ribH*, *ribA* reside in the *lux* operon of *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284: 587-595.

Linder, B.; Jin, Z.; Freedman, J.H.; Rubin, C.S. (1996). Molecular characterization of a novel, developmentally regulated small embryonic chaperone from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 30158-30166.

Liu, H.L.; Chen, B.Y.; Lan, Y.W.; Cheng, Y.C. (2003). SEM and AFM images of pyrite surfaces after bioleaching by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 414-420.

Lombardi, A.T.; Garcia Jr, O. (1999). An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25: 275-288.

Lombardi, A.T.; Garcia Jr, O. (2002). Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by *Thiobacillus ferrooxidans* and its effect on metal partitioning. *Water Research*, 36: 3193-3202.

Lünsdorf, H.; Schairer H.U.; Heidelbach, M. (1995). Localization of the stress protein SP21 in indole-induced spores, fruiting bodies, and heat-shocked cells of *Stigmatella aurantiaca*. *Journal of Bacteriology*, 177: 7092–7099.

Mattick, K.L.; Rowbury, R.J.; Humphrey, T.J. (2003). Morphological changes to *Escherichia coli* O157:H7, commensal *E. coli* and *Salmonella* spp in response to marginal growth conditions, with special reference to mildly stressing temperatures. *Science Progress*, 86: 103-113.

McGuffin, L.J.; Bryson, K.; Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16: 404-405.

Mellano, M.A.; Cooksey, D.A. (1988). Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 170: 4399-4401.

Meury, J.; Kohiyama, M. (1991). Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173: 4404-4410.

Michelini , E.T.; Flynn, G.C. (1999). The unique operon of *Thermotoga maritima*: cloning and initial characterization of a functional Hsp70 and small heat shock protein. *Journal of Bacteriology*, 181: 4237-4244.

Microbicidal male contraceptive – Risug induced morphostructural damage in *E. coli* (2003). *In situ* characterization of bacterial extracellular substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23: 173-182.

Morgan, R.W.; Christman, M.F.; Jacobson, F.S.; Storz, G.; Ames, B.N. (1986). Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 21: 8059-63.

Müller, D.J.; Anderson, K. (2002). Biomolecular imaging using Atomic force microscopy. *Trends in Biotechnology*, 8 (supplement): S45-S49.

Münchbach, M.; Nocker, A.; Narberhaus, F. (1999). Multiple small heat shock proteins in Rhizobia. *Journal of Bacteriology*, 181: 83-90.

Nakamoto, H.; Suzuki, N.; Roy, S.K. (2000). Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Letters*, 483: 169-174.

Narberhaus, F. (2002). α-Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 64-93.

Narberhaus, F.; Käser, R.; Nocker, A.; Hennecke, H. (1998). A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Molecular Microbiology*, 28: 315-323.

Natarajan, K.A.; Sudeesha, K.; Rao, R. (1994). Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 303-306.

Nerland, A.H.; Mustafa, A.S.; Sweetser, D.; Godal, T.; Young, R.A. (1988). A protein antigen of *Mycobacterium leprae* is related to a family of small heat shock proteins. *Journal of Bacteriology*, 170: 5919-5921.

Novo, M.T.; da Silva, A.C.; Moreto, R.; Cabral, P.C.; Costacurta, A.; Garcia Jr, O.; Ottoboni, L.M. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77: 187-95.

Ohmura, N.; Sasaki K.; Saiki H. (2002). Anaerobic respiration using Fe^{3+}, S^0, and H_2 in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 184: 2081-2087.

Olson, G.J.; Brierley, J.A.; Brierley, C.L. (2003). Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Micriobiology Biotechnology*, 35: 249-257.

Paulino, L.; Bergamo, R.; Mello, M.; Garcia Jr., O.; Manfio, G.; Ottoboni, L. (2001). Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80: 65-75.

Paulino, L.; Mello, M.; Ottoboni, L.; (2002). Differential gene expression in response to cooper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 23: 520-527.

Peng J.B.; Yan W.M.; Bao X.Z. (1994). Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 176: 2892-2897.

Pretorius, I.M.; Rawlings, D.E.; Woods, D.R. (1986). Identification and cloning of *Thiobacillus ferrooxidans* structural *nif* genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 45: 59-65.

Pronk, J.; De B.; Bos, P.; Kuenen, J. (1992). Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2227-2230.

Raina, S.; Mabey, L.; Georgopoulos, C. (1991). The *Escherichia coli htrP* gene product is essential for bacterial growth at high temperatures: mapping, cloning, sequencing, and trascriptional regulation of *htrP*. *Journal of Bacteriology*, 173: 5999-6008.

Ramirez, P.; Toledo, H.; Guiliani, N.; Jerez C. (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, N.N.; Liu, S.; Kornberg, A. (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *Journal of Bacteriology*, 180: 2186-2193.

Rawlings D.E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*, 56: 65-91.

Rawlings D.E.; Kusano T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology Reviews*, 58: 39-55.

Rawlings, D.E. (1998). Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20: 268-274.

Rawlings, D.E.; Dew, D.; du Plessis, C. (2003). Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*, 21: 38-44.

Rawlings, D.E.; Jones, W.A.; O'Neill, E.G.; Woods, D.R. (1987). Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene and its controlling region from the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *Gene*, 53: 211-217.

Reischl, S.; Thake, S.; Homuth, G.; Schumann, W. (2001). Transcriptional analysis of three *Bacillus subtilis* genes coding for proteins with the α-Crystallin domain characteristic of small heat shock proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 194: 99-103.

Richmond, C. S.; Glasner, J. D.; Mau, R.; Jin, H.; Blattner F. R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27:3821-3835.

Richter, G.; Volk, R.; Krieger, C.; Lahm, H.M.; Rothlisberger, U.; Bacher, A. (1992). Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 4050-4056.

Robinson, J.A.; Trulear, M.G.; Characklis, W.G. (1984). Cellular reproduction and extracellular polymer formation by *Pseudomonas aeruginosa* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 22: 1409-1417.

Rockabrand, D.; Arthur, T.; Korinek, G.; Livers, K.; Blum, P. (1995). An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H_2O_2 resistance and reductive division. *Journal of Bacteriology*, 177: 3695-3703.

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.

Rosen, R.; Biran, D.; Gur, E.; Becher, D.; Hecker, M.; Ron, E.Z. (2002). Protein aggregation in *Escherichia coli*: role of proteases. *FEMS Microbiology Letters* 207: 9-12.

Roy, S.K.; Nakamoto, H. (1998). Cloning, characterization, and transcriptional analysis of a gene encoding an α-Crystallin-related, small heat shock protein from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Journal of Bacteriology*, 180: 3997-4001.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.E. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sauer, U.; Dürre, P. (1993). Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding a small heat shock protein of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 175: 3394-3400.

Schaechter, M.; Maaloe, O.; Kjeldgaard, N.O. (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology*. 19: 592-606.

Schlösser, T.; Schmidt, G.; Stahmann, K-P. (2001). Transcriptional regulation of 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Microbiology*, 147: 3377-3386.

Schutzendubel, A.; Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1351-1365.

Seeger M.; Osorio G.; Jerez C.A. (1996). Phosphorylation of GroEL, DnaK and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 138: 129-134.

Seeger, M.; Jerez, C.A. (1993). Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, 108: 35-42.

Seeger, M.; Jerez, C.A. (1993a). Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiology Letters*, 11: 37-42.

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 U S A*, 97: 3509-3514.

Servant, P.; Mazodier, P. (1995). Characterization of *Streptomyces albus* 18-kilodalton heat shock-responsive protein. *Journal of Bacteriology*, 177: 2998-3003.

Shepard, B.D.; Gilmore, M.S. (1999). Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primer PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1470-1476.

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.

Silver, M.; Torma, A. E. (1974). Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 141-147.

Silver, S.; Walderhaug, M. (1992). Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiology Review*, 56: 195-228.

Smýkal, P.; Hrdý, I.; Pechan, P. M. (2000). High-molecular-mass complexes formed in vivo contain smHSPs and HSP70 and display chaperone-like activity. *European Journal of Biochemistry*, 267:2195-2207.

Solisio, C.; Lodi, A.; Veglio, F. (2002). Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Waste Managemant*, 22: 667-675.

Stancik, L.M.; Stancik, D.M.; Schmidt, B.; Barnhart, D.M.; Yoncheva, Y.N.; Slonczewski, J.L. (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184: 4246-4258.

Steinberger, R.E.; Allen, A.R.; Hansma, H.G.; Holden, P.A. (2002). Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microbial Ecology*, 43: 416-423.

Sugio T.; Tsujita Y.; Katagiri T.; Inagaki K.; Tano T. (1988). Reduction of Mo^{6+} with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal Bacteriology*, 170: 5956-5959

Sugio, T.; Hirayama, K.; Inagaki, K.; Tanaka, H.; Tano, T. (1992) Molybdenum oxidation by *Thiobacillus Ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1768-1771.

Tatusov, R.L.; Natale, D.A.; Garkavtsev, I.V.; Tatusova, T.A.; Shankavaram, U.T.; Rao, B.S.; Kiyyutin, B.; Galperin, M.Y.; Federova, N.D. Koonin, E.V. (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Research*, 29: 22-28.

Thomas, J. G.; Baneyx, F. (2000). ClpB and HtpG facilitate de novo protein folding in stressed *Escherichia coli* cells. *Molecular Microbiology*, 36:1360-1370.

Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F; Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.

Tomoyasu, T.; Takaya, A.; Sasaki, T.; Nagase, T.; Kikuno, R.; Morioka, M.; Yamamoto, T. (2003). A new heat shock gene, *asg*A, which encodes a small chaperone involved in suppressing protein aggregation in *Salmonella enterica* serovar thyphimurium. *Journal of Bacteriology*, 185: 6331-6339.

Trueba, F.J.; Woldringh, C.L. (1980). Changes in cell diameter during the division cycle of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 142:869-878.

Tuovinen, O. H.; Kelly, D. P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie*, 12: 311-346.

Tuovinen, O.H.; Niemela, S.I.; Gyllenberg, H.G. (1971). Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37: 489-496.

Umeda, A.; Saito, M.; Amako, K. (1998). Surface characteristics of Gram-negative and Gram-positive bacteria in an atomic force microscopy image. *Microbiology and Immunology*, 42: 159-164.

Valdés, 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.

Van de Merwe, W.P.; Li, Z.Z.; Bronk, B.V.; Czege, J. (1997). Polarized light scattering for rapid observation of bacterial size changes. *Biophysical Journal*, 73: 500-506.

van der Aa, B.C.; Dufrêne, Y.F. (2002). *In situ* characterization of bacterial extracellular substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23: 173-182.

van Montfort, R.L.; Basha, E.; Friedrich, K.L.; Slingsby, C.; Vierling, E. (2001). Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural Biology*, 12: 1025-30.

van Overbeek, L.S.; Eberl, L.; Givskov, M.; Molin, S.; van Elsas, J.D. (1995) Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4202-4208.

Van Veen, H. (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72:299-315.

VanBolegen, R.; Olson, E.; Wanner, B.; Neidhardt, F. (1996). Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178: 4344-4366.

Varela, P.; Gloria, L.; Francisco, R.; Jerez, C.A. (1998). A immunological strategy to monitor *in situ* phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4990-4993.

Varela, P.; Jerez, C.A. (1992). Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, 98: 149-154.

Veinger, L.; Diamant, S.; Buchner, J.; Goloubinoff, P. (1998). The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 11032-11037.

Vera, M.; Guiliani, N.; Jerez, C.A. (2003). Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 71: 125-132.

Vicente, M.; Chater, K.F.; de Lorenzo, V. (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Molecular Microbiology*, 33: 8-17.

Wai, S.N.; Mizunoe, Y.; Yoshida, S. (1999). How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 123-131.

Wainwright, M.; Canham, L.T.; Al-Wajeeh, K.; Reeves, C.L. (1999). Morphological changes (including filamentation) in *Escherichia coli* grown under starvation conditions on silicon wafers and others surfaces. *Letters in Apllied Microbiology*, 29: 224-227.

Wanner, B.L. (1990). Phosphorus assimilation and its control of gene expression in *Escherichia coli*. Em: Hauska, G.; Thauer, R (eds.), *The molecular basis of bacterial metabolism*, pp. 152-163. Springer Publisher, Berlin.

Waters, E. R.; Lee, G. J.; Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47: 325–338.

Watson, S.P.; Clements, M.O.; Foster, S.J. (1998). Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180: 1750-1758.

Welsh, J.; Chada, K.; Dalal, S.S.; Cheng, R.; Ralph, D.; McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 4965-4970.

Winderickx, J.; Castro, J. M. (1994). *Practical course in molecular biology of microorganisms.* Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February, pp. 11-59.

Wong, K.K.; McClelland, M. (1994). Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 639-643.

Worst D.J.; Gerrits M.M.; Vandenbroucke-Grauls C.M.; Kusters J.G. (1998). *Helicobacter pylori ribBA*-mediated riboflavin production is involved in iron acquisition. *Journal of Bacteriology*, 180: 1473-1479.

Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997). Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from Loblolly pine embryos. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 377-391

Yarzábal, A.; Brasseur, G.; Bonnefoy, V. (2002). Cytochromes *c* of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Letters*, 209: 189-195.

Yarzábal, A.; Brasseur, G.; Ratouchniak, J.; Lund, K.; Lemesle-Meuunier, D.; DeMoss, J.A.; Bonnefoy, V. (2002a). The high molecular weight cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology*, 184: 313-317.

Yuan, Y.; Crane, D.D.; Barry III, C.E. (1996). Stationary-phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the Mycobacterial α-Crystallin homolog. *Journal of Baceriology*, 178: 4484-4492.

Zhenying, L.; Guiliani, N.; Appia-Ayme, C.; Borne, F.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V. (2000). Construction and characterization of *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 182: 2269-2276.