

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ROGÉRIO FARIA BERGAMO

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
GENES EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE NA
PRESENÇA DE CÁDMIO E ZINCO EM**

Acidithiobacillus ferrooxidans

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) <u>Rogério Faria Bergamo</u>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>05/06/2001 Laura m. m. Ottoboni</u>
---	--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Marisca Ottoboni



ADE B.C.
 HAMADA:
T/UNICAMP
B452i
 Ex.
 NO BC/ 46039
16-392/04
☐ D ☒
R\$ 11,00
16-08-04
 70

MO0158821-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Bergamo, Rogério Faria

B452i Identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente na presença de cádmio e zinco em *Acidithiobacillus ferrooxidans* / Rogério Faria Bergamo. - - Campinas, SP. [s.n.], 2001.
117f: ilus.

Orientadora: Laura Maria Marical Ottoboni

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Genes-expressão diferencial. 2. Cádmio. 3. Zinco. I. Ottoboni, Laura Maria Marical. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 05 de junho de 2001.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni (orientador) Laura m. m. Ottoboni

Prof. Dr. Gilson P. Manfio Gilson P. Manfio

Profa. Dra Maricilda P. Mello Maricilda P. Mello

Profa Dra Shirlei M. R. Pimentel _____

Um cientista muito preocupado com os problemas do mundo passava dias em seu laboratório, tentando encontrar meios de minorá-los.

Certo dia, seu filho de 7 anos invadiu o seu santuário decidido a ajudá-lo. O cientista, nervoso pela interrupção, tentou fazer o filho brincar em outro lugar. Vendo que seria impossível removê-lo, procurou algo que pudesse distraí-lo. De repente, deparou-se com o mapa do mundo. Estava ali o que procurava. Recortou o mapa em vários pedaços e, junto com um rolo de fita adesiva, entregou ao filho dizendo:

- Você gosta de quebra cabeça ? Então vou lhe dar o mundo para consertar. Aqui está ele todo quebrado. Veja se consegue consertá-lo direitinho ! Mas faça tudo sozinho !

Pelo seus cálculos, a criança levaria dias para recompor o mapa. Passadas algumas horas, ouviu o filho chamando-o calmamente. A princípio, o pai não deu crédito às palavras do filho. Seria impossível na sua idade conseguir recompor um mapa que jamais havia visto. Relutante, o cientista levantou os olhos de suas anotações, certo de que veria um trabalho digno de uma criança. Para sua surpresa, o mapa estava completo. Todos os pedaços haviam sido colocados nos devidos lugares. Como seria possível ?, Como o menino havia sido capaz ?

- Você não sabia como era o mundo, meu filho, como conseguiu ?

- Pai, eu não sabia como era o mundo, mas quando você tirou o papel da revista para recortar, eu vi que do outro lado havia a figura de um homem. Quando você me deu o mundo para consertar eu tentei, mas não consegui. Foi aí que me lembrei do homem, virei os recortes e comecei a **consertar o homem** que eu sabia como era. Quando consegui **consertar o homem**, virei a folha e vi que **havia consertado o mundo**.

Autor desconhecido

Dedico este trabalho

A **Deus** , força sempre presente em minha vida.

Ao meu pai, **João Batista**, (*in memoriam*)
sinônimo de dignidade, caráter e honestidade.
Pessoa que sempre se fará presente em minha caminhada e que muito incentivou-me com entusiasmo e carinho.

A minha mãe, **Maria José**, mulher dedicada, perseverante e espelho da minha vida.
Presença constante na busca de meus sonhos.

Ao meu irmão, **Renato**, que nos momentos tão difíceis da vida, revelou a cada dia, sua amizade, companheirismo e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni, pela orientação deste trabalho e importante contribuição a minha formação. Acreditando e me incentivando a todo momento com seus sábios ensinamentos, dedicação e organização que tanto dignificam a sua pessoa.

À Profa. Dra. Maricilda P. de Mello, pela participação na banca examinadora, lendo criteriosamente a tese na pré-banca e pelas discussões que tanto contribuíram para o seu enriquecimento.

Ao Dr. Gilson P. Manfio, pela participação na banca examinadora, leitura da tese na pré-banca e atenção recebida que tanto auxiliou na elaboração criteriosa da dissertação da tese.

À Profa. Dra. Shirlei M. Recco Pimentel, pela discussão, sugestões na pré-banca e participação como suplente da banca examinadora. Se hoje estou aqui, apresentando este trabalho, muito tenho a agradecer a sua co-orientação, ensinamentos e incentivos recebidos, durante o período de Iniciação Científica, que realizei em seu laboratório com a valiosa orientação da Profa. Dra Rita M. P. Avancini.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr. e à Dra. Maria Teresa M. Novo pela realização dos experimentos de Respirometria e Curvas de Crescimento, que muito contribuíram para a complementação dos resultados apresentados na tese.

Ao Dr. Carlos Colombo, do laboratório do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pela **significante** ajuda na realização de uma etapa fundamental do trabalho: Sequenciamento dos produtos de RAP-PCR.

Às secretárias do CBMEG: Sandra, Tânia, Fabiana, Patrícia e a Liliam, secretária do Depto. de **Biologia** Celular, pela eficiência, simpatia e presteza;

Aos amigos e companheiros do laboratório e do CBMEG, por compartilharem, no dia a dia, os momentos de alegria e tristeza.

A Patrícia, por ser mais que uma namorada, ser uma pessoa com quem estou podendo dividir todas os momentos da minha vida. Pela sua compreensão, carinho e amor.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (bolsa de mestrado 99/01497-7 e projeto científico 97/1069-0).

A todos aqueles que por um lapso de memória não constam desta lista, e que foram de grande importância, meus mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE	págs.
1. RESUMO	10
2. SUMMARY	13
3. INTRODUÇÃO	16
3.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	16
3.2. Resistência e adaptação a metais.....	17
3.3. Toxicidade e resistência a cádmio e zinco.....	20
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo Geral.....	23
4.2. Objetivos Específicos	23
CAPÍTULO I. Expressão diferencial de genes na presença de zinco em <i>A. ferrooxidans</i>.	25
Artigo 1: Identification of differentially expressed genes in response to zinc in <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	26
Summary.....	27
Introduction.....	28
Results and discussion.....	29
Experimental procedures	36
References.....	42
Figure Legends	47
Tables.....	49
Figures.....	52

Apêndice. Sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a zinco em <i>A. ferrooxidans</i>	58
Sequências nucleotídicas obtidas na presença de 600 mM de sulfato de zinco	58
Sequências nucleotídicas obtidas na ausência de 600 mM de sulfato de zinco.....	60

CAPÍTULO II. Expressão diferencial de genes na presença de cádmio em <i>A. ferrooxidans</i>	62
1. Introdução	63
2. Materiais e Métodos.....	64
3. Resultados e Discussão.....	69
Tabelas.....	76
Figuras.....	79
4. Referências Bibliográficas.....	84

Apêndice. Sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cádmio em <i>A. ferrooxidans</i>	88
Sequências nucleotídicas obtidas na presença de 60 mM de sulfato de cádmio	88
Sequências nucleotídicas obtidas na ausência de 60 mM de sulfato de cádmio.....	90

CAPÍTULO III. Caracterização dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cádmio e zinco na linhagem FG460 e na linhagem LR submetida a outros fatores de estresse.....	92
1. Introdução	93
2. Materiais e Métodos.....	94
3. Resultados e Discussão.....	95
Figuras.....	99
4. Referências Bibliográficas.....	107

CONCLUSÕES GERAIS	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1. RESUMO

A. ferrooxidans é uma bactéria não patogênica, Gram-negativa, que obtém a energia necessária para o seu crescimento pela oxidação de substratos inorgânicos. Esta bactéria tem despertado interesse por ser um dos microrganismos envolvidos na biolixiviação de metais. *A. ferrooxidans* é resistente a altas concentrações de metais como alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio. Esta característica peculiar tem estimulado vários estudos genéticos envolvendo *A. ferrooxidans*. As bases genéticas da resistência a metais em *A. ferrooxidans* ainda são pouco conhecidas, com exceção das resistências ao mercúrio e ao arsênio.

Para a identificação dos genes expressos diferencialmente na presença de cádmio e zinco, através de RAP-PCR (*random arbitrarily primed PCR*), foi utilizada a linhagem brasileira de *A. ferrooxidans* LR. Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que esta linhagem é resistente a altas concentrações de vários metais. Neste trabalho, as concentrações de 60 e 600 mM de sulfato de zinco utilizadas nos experimentos de RAP-PCR foram escolhidas tomando como base os experimentos de respirometria e de curvas de crescimento realizados com a linhagem LR na presença de 0 (controle), 100, 300 e 600 mM de sulfato de zinco. O cádmio é mais tóxico do que o zinco para *A. ferrooxidans*. Assim sendo, foi utilizada uma concentração de 60 mM para os experimentos com este metal.

Para o RAP-PCR foi utilizado RNA total isolado de células crescidas na ausência e na presença de cádmio e zinco. Com a utilização dos *primers* OPJ01, OPJ04, OPJ05, OPJ06, OPJ08 e OPF03 foram isoladas 107 bandas diferenciais para cádmio (22 reprimidas e 85 induzidas) e com os *primers* OPJ04, OPJ06 e OPF03 foram isoladas 68 bandas diferenciais para zinco (12 reprimidas e 56 induzidas). Das 107 bandas isoladas, nos experimentos de RAP-PCR com sulfato de cádmio, 62 (58%) tiveram a expressão diferencial confirmada através de *Slot blot* de DNA. Das 68 bandas diferenciais isoladas nos experimentos com sulfato de zinco, 32 (47%) tiveram a expressão diferencial confirmada através de *Slot blot* de DNA. Nenhuma das bandas isoladas na presença de 60 mM de sulfato de zinco teve a expressão diferencial confirmada.

Do total de bandas diferenciais confirmadas, foram selecionadas 20 bandas de RAP-PCR dos experimentos com cádmio e 18 bandas de RAP-PCR dos experimentos com zinco para clonagem e sequenciamento. Das bandas reprimidas por cádmio, 3 apresentaram seqüências nucleotídicas idênticas restando assim, um total de 17 bandas dos experimentos com cádmio. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências de bancos de dados através da utilização do algoritmo BLAST, função BLASTX.

Três seqüências induzidas e três reprimidas por 600 mM de sulfato de zinco apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em banco de dados. Assim sendo: 7F03Zn apresentou similaridade com o gene *tnsB* do transposon Tn7, 7J04Zn apresentou similaridade com uma proteína hipotética de *Deinococcus radiodurans* e 6J04Zn com uma provável proteína secretora de *Pseudomonas aeruginosa*. Entre as seqüências reprimidas por sulfato de zinco, a seqüência da banda 13J06C apresentou similaridade com o fator de elongação Tu (EF-Tu) de *P. aeruginosa*, 16J06C uma proteína RLX de *Staphylococcus aureus* e 7J06C com uma GTP ciclohidrolase de *Photobacterium leignathi*.

Dentre as seqüências das bandas de RAP-PCR induzidas e reprimidas por 60 mM de sulfato de cádmio, 11 (8 induzidas e 3 reprimidas) apresentaram similaridade com seqüências presentes em banco de dados. As bandas que apresentaram as maiores similaridades foram: 17F03Cd, apresentou similaridade com uma ribonuclease III de *E. coli*, 17J04Cd com uma transposase de *A. ferrooxidans*, 5J06Cd com o gene *nif A* de *Rhodobacter capsulatus*, 20J04Cd com um oligossacarídeo transferase transmembrana de *Pyrococcus abyssi* e 1J05C com um precursor putativo de citocromo c1 de *A. ferrooxidans*.

Através de *slot blot* de RNA, a expressão de algumas seqüências com similaridade reconhecida foram testadas quanto a outros fatores de estresse como cobre, pH e temperatura e em concentrações variadas de sulfato de cádmio e zinco. Nos experimentos de *Slot blot* de RNA as bandas de RAP-PCR selecionadas foram hibridizadas com 3µg de RNA isolado de células crescidas na presença 0 (controle), 10, 30 e 60 mM de sulfato de cádmio, 0 (controle), 100, 300 e 600 mM de sulfato de zinco, 200 mM de sulfato de cobre, pH 2,5 (pH ótimo 1,8) e 37°C (temperatura ideal de crescimento 30°C).

Todas as bandas induzidas por sulfato de zinco, 7F03Zn, 7J04Zn e 6J04Zn, foram induzidas por sulfato de cobre. As bandas 7F03Zn e 6J04Zn também foram induzidas na presença de pH 2,5. Somente a banda 6J04Zn foi induzida a 37°C. Entre as bandas reprimidas por 600 mM de sulfato de zinco, as bandas 13J06C e 16J06C foram inibidas na presença de todas as situações de estresse testadas. Apesar de ter a expressão inibida na presença de zinco, a banda 7J06C apresentou a expressão induzida em pH 2,5.

Entre as bandas induzidas por cádmio, 17J04Cd e 20J04Cd, também foram induzidas na presença de 37°C, pH 2,5 e cobre. Já as bandas 17F03Cd e 5J06Cd foram induzidas principalmente por cobre. A banda cuja expressão foi reprimida na presença de cádmio, 1J05C, foi reprimida na presença dos outros fatores de estresse testados.

Estas bandas foram hibridizadas, também com RNA isolado da linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 crescidas na presença de 60 mM de sulfato de cádmio e 600 mM de sulfato de zinco. Todas as bandas que foram induzidas ou reprimidas por sulfato de cádmio ou zinco na linhagem LR também foram induzidas ou reprimidas por estes metais na linhagem FG460.

Além disso, a conservação das seqüências em outras linhagens de *Acidithiobacillus* ssp foi testada através de *Southern blot*. Nos experimentos de *Southern blot* as bandas de RAP-PCR foram hibridizadas com DNA genômico, digerido com *Bam*H I e *Hind* III, das linhagens: *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, LR, FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP; *A. thiooxidans* ATCC 19377^T e DAMS e *E. coli* ATCC 25922. Todas as bandas de RAP-PCR testadas hibridizaram com as três linhagens de *A. ferrooxidans*. Somente a banda 16J06C, reprimida por zinco, hibridizou com o DNA de todas as linhagens.

2. SUMMARY

A. ferrooxidans is Gram-negative, chemolithotrophic, acidophilic bacterium that derives energy from the oxidation of either ferrous iron or reduced sulfur compounds. This bacterium is involved in metal bioleaching and shows resistance to high concentrations of heavy metals, such as aluminum, zinc, cobalt, manganese, copper, chromium and uranium. Except for the genes involved in mercury and arsenic resistance, the genetic basis for other metal resistance in *A. ferrooxidans* are still unknown.

The Brazilian strain *A. ferrooxidans* LR was used to identify differentially expressed genes in the presence of cadmium and zinc, using RAP-PCR. Previous experiments have shown that this strain is resistant to high concentrations of several metal ions. The 600 mM zinc sulfate concentration used in the RAP-PCR experiments was based on the results of the growth curves and respirometric experiments both performed with 0, 100, 300 and 600 mM zinc sulfate. Since cadmium is more toxic to *A. ferrooxidans* than zinc, the concentration used this for metal in the RAP-PCR experiments was 60 mM.

The RNA used in the RAP-PCR experiments was isolated from cells grown in the absence or in the presence of 60 mM cadmium sulfate and in the absence or in the presence of 60 mM or 600 mM zinc sulfate. A total of 107 cadmium differentially expressed bands were isolated (22 repressed and 85 induced) using the random *primers* OPJ01, OPJ04, OPJ05, OPJ06, OPJ08 and OPF03. In the presence of zinc sulfate, a total of 68 differentially expressed bands were isolated (12 repressed and 56 induced) using *primers* OPJ04, OPJ06 and OPF03. Fifty eight % and 47% of the bands isolated in the cadmium and zinc sulfate experiments, respectively, had their differential expression confirmed by DNA Slot blot hybridizations. None of the bands isolated in the presence of 60 mM zinc sulfate had their differential expression confirmed.

Twenty bands isolated from the RAP-PCR experiments with cadmium sulfate and 18 isolated from the experiments with zinc sulfate were cloned and sequenced. Three bands repressed by cadmium have been discarded since their sequences were repeated. The sequences of the RAP-PCR bands were compared to GenBank sequences using the BLAST algorithm, function BLASTX.

Three induced and 3 repressed sequences by 600 mM zinc sulfate presented similarity with GenBank sequences. The 7F03Zn sequence showed similarity with the *tnsB* gene from transposon Tn7, 7J04Zn presented similarity with a hypothetical protein from *Deinococcus radiodurans* and 6J04Zn with a putative secretion protein from *Pseudomonas aeruginosa*. Among the bands repressed by zinc sulfate, the sequence of 13J06C showed similarity with the elongation factor Tu (EF-Tu) from *P. aeruginosa*, 16J06C showed similarity with a RLX protein from *Staphylococcus aureus* and 7J06C with a GTP cyclohydrolase from *Photobacterium leignathi*.

The sequence of 11 RAP-PCR bands differentially expressed in the presence of 60 mM cadmium sulfate (8 induced and 3 repressed by cadmium sulfate) showed similarity with GenBank sequences. Among the bands whose sequences showed the highest similarities with GenBank sequences were 17F03Cd that showed similarity with ribonuclease III from *Escherichia coli*, 17J04Cd that showed similarity with a transposase from *A. ferrooxidans*, 5J06Cd showed similarity with the *nif* gene from *Rhodobacter capsulatus*, 20J04Cd showed similarity with a putative transmembrane oligosaccharyl transferase and 1J05C with a putative cytochrome c1 precursor from *A. ferrooxidans*.

Some RAP-PCR bands whose sequence presented similarity to GenBank sequences were selected for further analyses by RNA Slot blot and Southern blot hybridizations. In the RNA Slot blot experiments, the RAP-PCR bands were hybridized with 3 µg of RNA isolated from cells grown in the presence of 0, 10, 30 and 60 mM cadmium sulfate; 0, 100, 300 and 600 mM zinc sulfate; 200 mM copper sulfate; pH 2.5 (optimum pH 1.8) and 37°C (optimum temperature 30°C).

All the bands induced by zinc sulfate, 7F03Zn, 7J04Zn and 6J04Zn, were also induced by copper sulfate. The bands 7F03Zn and 6J04Zn were induced in the presence of pH 2.5. Only 6J04Zn was induced at 37°C. Among the bands repressed by zinc sulfate, 13J06C and 16J06C had their expression repressed in the presence of all the stress situations tested. Although the expression of 7J06C was repressed in the presence of zinc sulfate, it was induced in pH 2.5.

Among the bands induced by cadmium sulfate, 17J04Cd and 20J04Cd were also induced in the presence of copper sulfate, pH 2.5 and 37°C. The bands 17F03Cd and

5J06Cd were mainly induced in the presence of copper sulfate. The band 1J05C, repressed by cadmium sulfate, was repressed in the presence of the other stress situations tested.

These RAP-PCR bands were also hybridized with RNA from the *A. ferrooxidans* strain FG460 grown in the absence and the presence of 60 mM cadmium sulfate and 600 mM zinc sulfate. All the bands that were induced or repressed by by cadmium or zinc sulfate in strain LR were also induced or repressed by these metals in strain FG460.

In the Southern blot experiments, the RAP-PCR bands were hybridized with 5 µg of genomic DNA, digested with *Bam*H I and *Hind* III, from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, LR, FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP; *A. thiooxidans* ATCC 19377^T and DAMS and *E. coli* ATCC 25922. All the RAP-PCR bands tested hybridized with the 3 *A. ferrooxidans* strains. Only 16J06C, repressed by zinc sulfate, hybridized with the DNA from all the strains tested.

3. INTRODUÇÃO

3.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

O gênero *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood, 2000) compreende várias espécies de bactérias (*Acidithiobacillus albertensis*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*) Gram-negativas, não patogênicas, com metabolismo quimiolitotrófico isto é, obtém a energia necessária para seu crescimento pela oxidação de substratos inorgânicos, sendo capazes de fixar o CO₂ atmosférico. Esse gênero compreende espécies que apresentam entre si características diferentes quanto às necessidades nutricionais e também quanto a pH e temperatura ideais para o crescimento (Kuenen *et al.*, 1992). *A. ferrooxidans* é a única espécie do gênero capaz de obter energia através da oxidação do íon ferroso (Leduc & Ferroni, 1994). Esta bactéria é acidofílica, com pH ótimo de crescimento em torno de 2,0 (Leduc & Ferroni, 1994). A temperatura ideal de crescimento de *A. ferrooxidans* é em torno de 30°C.

A. ferrooxidans é uma das espécies mais estudadas do gênero *Acidithiobacillus*, já que é um dos principais microrganismos responsáveis pela lixiviação bacteriana de metais ou biolixiviação. Durante o processo de biolixiviação, o metabolismo microbiano causa a solubilização de minérios que apresentam em sua constituição formas reduzidas de enxofre e ferro. A bactéria pode solubilizar metais diretamente, pelo ataque enzimático oxidativo ou indiretamente, pela produção de soluções ácidas de sulfato férrico (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). No processo de biolixiviação os íons de metais pesados são acumulados e, a partir de certas concentrações, passam a ser tóxicos para os microrganismos, afetando, deste modo, as taxas de dissolução dos minérios. A biolixiviação vem sendo utilizada em escala industrial para obtenção de cobre, urânio e ouro. No futuro, o processo poderá se tornar comercialmente viável para obtenção de zinco, níquel, cobalto e molibidênio (Bosecker, 1997).

A. ferrooxidans apresenta também importância ambiental, pois pode ser utilizada na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados. Os métodos convencionais geralmente apresentam custos elevados, e o emprego de *A. ferrooxidans* é uma alternativa econômica e rápida, com benefícios para o meio ambiente (Shiratori &

Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995). Lombardi & Garcia Jr. (1999) sugeriram a utilização de *A. ferrooxidans* na remoção dos metais tóxicos geralmente encontrados em esgotos municipais. Lopez-Lopez *et al.*, (1999) desenvolveram um sistema para destoxificação de esgotos que utiliza um reator eletroquímico no ânodo e culturas de *A. ferrooxidans* no cátodo.

Os estudos genéticos com *A. ferrooxidans* tiveram início no final da década de setenta com trabalhos realizados por Groudeva *et al.* (1978a). Estes trabalhos de genética clássica, demonstraram a existência de uma variabilidade natural na espécie. Trabalhos adicionais detectaram também uma diversidade genômica e fisiológica entre as linhagens de *A. ferrooxidans* provenientes de diversas partes do mundo (Harrison Jr., 1982), variabilidade em atividades de lixiviação de ZnS e CuS (Groudev, 1980a, b), quanto à resistência ao urânio e tório e quanto a parâmetros cinéticos da bactéria (Dispirito & Tuovinen, 1982). Quatro linhagens brasileiras isoladas de mina de urânio e carvão apresentaram uma variabilidade quanto à resistência a metais como cobalto, cobre, prata e mercúrio (Garcia Jr. & Silva, 1991). Além disto, através de técnica de RAPD, um alto grau de diversidade genômica foi verificado para oito linhagens de *A. ferrooxidans*, sendo seis delas brasileiras (Novo *et al.*, 1996).

Recentemente, Frattini *et al.*, (2000) analisaram 5 linhagens de *A. ferrooxidans* isoladas de mina na presença de diferentes concentrações de glicose, ácido cítrico, celobiose e ácido galacturônico. Os autores utilizaram também o detergente SDS, que é utilizado na indústria de mineração como um agente de controle da acidez. Os compostos apresentaram efeitos inibitórios distintos entre as linhagens, sugerindo a existência de uma variabilidade natural entre as linhagens estudadas.

3.2. Resistência e adaptação a metais

Uma característica interessante de *A. ferrooxidans* é a resistência natural generalizada a altas concentrações de íons metálicos (Tuovinen *et al.*, 1971; Brierley, 1978; Ludgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). Isto pode ser atribuído à presença constante de metais no seu ambiente natural de crescimento. Segundo revisão de Hutchins *et al.*, (1986), *A. ferrooxidans* apresenta resistência ao alumínio (0,37 M),

manganês (0,18 M), cobalto (0,17 M), cobre (0,16 M), zinco (0,15 M), cromo (0,1 M) e urânio (0,01 M). Os níveis de resistência da bactéria são menores para prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M), molibidênio, selênio, telúrio e arsênio (10^{-3} M).

Tuovinen *et al.*, (1971) observaram que a resistência a metais pesados em *A. ferrooxidans* pode ser afetada pela fonte de energia utilizada. Assim sendo, células de *A. ferrooxidans* que oxidam ferro como substrato podem ser até 2.000 vezes mais resistentes a íons metálicos como zinco, níquel e cobre do que aquelas que utilizam tiosulfato como doador de elétrons. Foi observado também, que as células que cresciam em presença de enxofre elementar apresentavam uma resistência intermediária aos metais mencionados acima (Tuovinen *et al.*, 1971). Os resultados obtidos por Tuovien *et al.*, (1971) foram posteriormente confirmados por Silver & Torma (1974).

Os mecanismos que conferem resistência a metais em *A. ferrooxidans*, assim como o(s) gene(s) envolvido(s) no processo, são pouco conhecidos. Genes envolvidos na resistência ao mercúrio foram isolados por Shiratori *et al.*, (1989) através de hibridização com o fragmento determinante da resistência ao mercúrio do transposon Tn501. Foi observado que a resistência ao mercúrio em *A. ferrooxidans* é determinada por pelo menos dois genes, um gene do tipo *merC* que codifica uma proteína capaz de captar Hg^{+} através da membrana e o gene *merA* que codifica a mercúrio redutase que é responsável pela volatilização do mercúrio como Hg^0 . Os genes de *A. ferrooxidans* associados com a resistência ao mercúrio diferem de outras bactérias em alguns aspectos tais como: os genes estão localizados no cromossomo e não em plasmídios e a estrutura do operon apresenta arranjos diferentes dos genes (Shiratori *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1989).

Recentemente, Butcher *et al.*, (2000) clonaram e sequenciaram genes de *A. ferrooxidans* envolvidos no mecanismo de resistência ao arsênio. Células de *E. coli* transformadas com estes genes adquiriram aumento de resistência ao arsênio e ao antimônio. A exemplo dos genes de resistência ao mercúrio, neste caso também os genes são cromossomais.

Mecanismos de resistência a metais como cobre (Cervantes & Gutierrez, 1994), mercúrio (Misra, 1992), arsênio e antimônio (Kaur & Rosen, 1992), telúrio (Walter & Taylor, 1992), cromato (Cervantes & Silver, 1992) e cádmio são conhecidos em vários organismos (Silver & Misra, 1988). A resistência a metais em bactérias pode ser

codificada por genes presentes em plasmídios, transposons ou no cromossomo (Rouch *et al.*, 1995). Genes que codificam resistência a metais como cádmio, cobre, zinco, cobalto e outros tem sido freqüentemente encontrados em plasmídios (Nies *et al.*, 1987; Bender & Cooksey, 1987; Silver, 1998; Ghosh *et al.*, 2000; Edet *et al.*, 2000). Até o momento, apesar das várias tentativas, não foi feita nenhuma correlação entre a resistência a metais e a presença de plasmídios nativos em *A. ferrooxidans*.

Os mecanismos propostos de resistência a metais em microrganismos, segundo Bruins *et al.*, (2000), são: (1) exclusão do metal através de uma barreira de permeabilidade; (2) transporte ativo do metal para fora da célula; (3) seqüestro intracelular do metal através de ligação com uma proteína; (4) seqüestro extracelular do metal; (5) destoxificação enzimática do metal (conversão para uma forma menos tóxica) e (6) redução da sensibilidade do metal aos alvos celulares.

Outra característica interessante de *A. ferrooxidans* é a capacidade de adaptação da bactéria a condições adversas. Natarajam *et al.*, (1994) adaptaram a linhagem de *A. ferrooxidans* MAL-4 a altas concentrações de cobre, através de repiques em concentrações crescentes do metal. O processo de adaptação resultou em um aumento do nível de resistência da bactéria ao metal. Esta resistência foi perdida quando a bactéria foi submetida a repiques sucessivos em meio sem o metal, indicando que a resistência adquirida pela adaptação era estresse-dependente e não um traço permanente da linhagem adaptada (Natarajan *et al.*, 1994).

Kondratyeva *et al.*, (1995) adaptaram linhagens de *A. ferrooxidans* a altas concentrações de zinco e arsênio. A análise dos padrões de restrição do DNA genômico destas linhagens, através de eletroforese de campo pulsado, mostrou que fragmentos de DNA eram amplificados nas linhagens adaptadas (Kondratyeva *et al.*, 1995). Com base nos resultados obtidos, Kondratyeva *et al.*, (1995) sugeriram que o aumento da resistência, observado nas células adaptadas, era devido ao aumento do número de cópias dos genes de resistência e conseqüentemente, ao aumento da síntese de proteínas envolvidas no processo.

3.3. Toxicidade e resistência a cádmio e zinco

Vários trabalhos relataram a contaminação do meio ambiente por metais, em particular por metais pesados (densidade $\geq 5 \text{ g/cm}^3$), e seu efeito tóxico em uma grande variedade de organismos (Trevors *et al.*, 1986; Silver, 1996). O cádmio por exemplo, pode entrar no meio ambiente através da refinação do zinco, da combustão do carvão, pelo uso de fertilizantes e pesticidas entre outros (Trevors *et al.*, 1986; Nies, 1992). Este metal é extremamente tóxico para diversos organismos como por exemplo, bactérias, algas e fungos (Trevors *et al.*, 1986; Nies, 1992).

Tanto o mecanismo de toxicidade quanto o de resistência ao cádmio são bastante variáveis, dependendo do organismo afetado. O cádmio exerce o seu efeito tóxico em uma ampla faixa de concentrações, entretanto, nenhuma concentração única do metal foi especificada como sendo tóxica para todas as espécies estudadas sob condições padronizadas (Trevors *et al.*, 1986).

Dois genes, localizados em plasmídios, são responsáveis pela resistência ao cádmio em *Staphylococcus aureus* (Silver & Misra, 1984). Estes dois genes afetam de maneira diferente o grau de resistência ao metal no microrganismo. Isto é, o gene *cadA* confere uma alta resistência ao metal e o gene *cadB* confere um pequeno aumento na resistência (Silver & Misra, 1984). Foi observado também que, quando os dois genes estavam presentes em uma mesma linhagem de bactéria, o gene *cadA* mascarava o efeito de *cadB*. Além de estarem envolvidos com a resistência ao cádmio, estes dois genes aumentam também a resistência ao Zn^{2+} (Silver & Misra, 1984). Apesar da resistência ao cádmio ter sido inicialmente relacionada com genes presentes em plasmídios em algumas bactérias, foi observado que bactérias que não apresentavam plasmídios eram tão resistentes ao metal quanto as que apresentavam (Trevors *et al.*, 1986).

O gene *cadA* foi clonado e sequenciado. A comparação da sequência com as depositadas em bancos de dados e testes bioquímicos revelaram que a proteína CadA era uma ATPase do tipo P que é responsável pelo efluxo de Cd^{2+} e provavelmente Zn^{2+} (Nies, 1992). A proteína CadA precisa de uma segunda proteína (CadC) para a resistência ao cádmio e zinco ser efetivada (Yoon & Silver, 1991; Nies, 1992; Silver, 1998). Uma terceira proteína, CadR, é provavelmente responsável pela regulação do sistema.

Crupper *et al.*, (1999) identificaram e clonaram um outro gene de resistência a cádmio, *cadD*, de *Staphylococcus aureus*. No operon onde se encontra o gene *cadD*, foi identificado um outro gene, o *cadX*, que é um gene regulador. Os autores observaram um alto grau de similaridade entre *cadD* e o gene *cadB* de *Staphylococcus lugdunensis* contudo, *cadD* não apresentou similaridade significativa com os genes *cadA* e *cadB* encontrados nos plasmídios pI258 e pII147 de *S. aureus*.

Babai & Ron (1998), utilizando a técnica de fusão de genes em linhagem de *E. coli*, identificaram um gene que foi induzido por metais pesados como cádmio, zinco e mercúrio. O gene, *zntA*, foi seqüenciado e identificado como uma ATPase do tipo P que transporta zinco e com uma menor eficiência cádmio.

Hassan *et al.*, (1999) isolaram cinco genes, *czrSRCBA*, envolvidos na resistência a cádmio e zinco em *Pseudomonas aeruginosa*. Experimentos de hibridização DNA-DNA mostraram uma alta conservação destes genes em outros isolados do meio ambiente de *P. aeruginosa* e na linhagem tipo PAO1.

Recentemente, Lee *et al.*, (2001) clonaram um fragmento cromossômico de *Pseudomonas putida*, linhagem 06909, responsável pela resistência a cádmio. A análise da seqüência do fragmento revelou dois genes *cadA* e *cadR*, sendo que *cadA* apresentou similaridade com ATPases transportadoras de cádmio de bactérias Gram-positivas e com ZntA, uma ATPase transportadora de cádmio, zinco e chumbo de *E. coli*. CadR apresentou similaridade com a família MerR que normalmente controla destoxificação ao mercúrio.

Pouco se sabe sobre os genes e os mecanismos de resistência a cádmio e zinco em *A. ferrooxidans*. Novo *et al.*, (2000) analisaram através de eletroforese em gel de duas dimensões, proteínas isoladas de células de *A. ferrooxidans* LR tratadas com cádmio e zinco. Como controle, foram utilizadas proteínas isoladas de células de *A. ferrooxidans* crescidas na ausência de metal. A análise dos géis mostrou a existência de três proteínas (105, 58 e 54 kDa) que tinham a síntese diminuída na presença de cádmio e zinco. Na presença de cádmio foram identificadas outras duas proteínas (42 kDa e 16 kDa) com síntese diminuída, e uma, de 66 kDa, com síntese aumentada.

A resistência a altas concentrações de metais e a adaptabilidade ao meio, aliadas à importância ambiental, bem como a sua aplicação nos processos de biolixiviação de

metais, tornam *A. ferrooxidans* um organismo de grande interesse para estudos genéticos. O isolamento de genes expressos diferencialmente na presença e ausência de cádmio e zinco é de grande interesse em pelo menos três aspectos: (1) ampliação dos nossos conhecimentos sobre os mecanismos de resistência a metais em bactérias, (2) transferência desses genes entre linhagens de *A. ferrooxidans*, objetivando a otimização do processo de biolixiviação e (3) transferência desses genes para outros organismos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL:

O projeto tem como objetivo a identificação e a caracterização de genes que se expressam diferencialmente na presença de cádmio e zinco em *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo I. Expressão diferencial de genes na presença de zinco em *A. ferrooxidans*

Artigo 1: Identification of differentially expressed genes in response to zinc in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

- Curva de crescimento e respirometria da linhagem LR submetida a diferentes concentrações de sulfato de zinco;
- Identificação de genes expressos diferencialmente na presença e ausência de 600 mM de sulfato de zinco através de RAP-PCR;
- Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de *Slot blot* de DNA;
- Clonagem e sequenciamento das bandas diferenciais e comparação das seqüências em bancos de dados;
- Comparação através de *Slot blot* de RNA do padrão de expressão das bandas diferenciais em *A. ferrooxidans*, submetida a diferentes concentrações de sulfato de zinco;

- Hibridização das seqüências obtidas por RAP-PCR com o DNA de outras espécies de bactérias para confirmação da presença ou ausência destes genes nestas espécies.

Capítulo II. Expressão diferencial de genes na presença de cádmio em *A. ferrooxidans*

- Identificação de genes expressos diferencialmente na presença e ausência de 60 mM de sulfato de cádmio através de RAP-PCR;
- Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de *Slot blot* de DNA;
- Clonagem e seqüenciamento das bandas diferenciais e comparação das seqüências em bancos de dados;
- Comparação através de *Slot blot* de RNA do padrão de expressão das bandas diferenciais em *A. ferrooxidans*, submetida a diferentes concentrações de sulfato de cádmio;
- Hibridização das seqüências obtidas por RAP-PCR com o DNA de outras espécies de bactérias para confirmação da presença ou ausência destes genes nestas espécies.

Capítulo III. Caracterização dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cádmio e zinco na linhagem FG460 e na linhagem LR submetida a outros fatores de estresse

- Comparação através de *Slot blot* de RNA do padrão de expressão das bandas diferenciais na linhagem de *A. ferrooxidans* LR, submetida a diferentes tipos de estresse como presença de sulfato de cobre, alterações no pH e temperatura;
- Comparação através de *Slot blot* de RNA do padrão de expressão das seqüências diferenciais na linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 tratada com sulfato de cádmio e zinco.

Expressão diferencial de genes na presença de zinco em *A. ferrooxidans*

Capítulo I

**Identification of differentially expressed genes in response to zinc in
*Acidithiobacillus ferrooxidans***

**Rogério F. Bergamo¹, Maria Teresa M. Novo², Oswaldo Garcia Jr.² and Laura
M. M. Ottoboni^{1,*}**

*¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de
Campinas, Campinas, SP, Brazil*

*²Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil*

***Corresponding author:**

Laura M. M. Ottoboni

CBMEG - UNICAMP, Caixa Postal 6010

13083-970, Campinas, SP, Brazil

Phone: +55 (19) 3788-1136

fax: +55 (19) 3788-1089

e-mail: ottoboni@obelix.unicamp.br

Summary

Zinc is an essential element for living organisms, but may be toxic in high concentrations and cause environmental pollution. *A. ferrooxidans*, an acidophilic, Gram-negative, rod-shaped, chemolithoautotrophic bacterium, presents tolerance to high concentrations of this metal. The genes induced or repressed by zinc in *A. ferrooxidans* are unknown. In this work, 68 differentially expressed bands were detected in RAP-PCR experiments using RNA isolated from *A. ferrooxidans* strain LR cells grown in the absence (control) and in the presence of 60 mM and 600 mM zinc sulfate. The differential expression of these RAP-PCR bands was confirmed by Slot blot hybridizations. Eighteen bands were selected for cloning and sequencing. The obtained sequences were submitted to comparison to GenBank sequences. The RAP-PCR bands that showed similarity to GenBank sequences were further characterized by RNA Slot blot and Southern blot hybridizations.

Introduction

Acidithiobacillus ferrooxidans (Kelly and Wood, 2000) is an acidophilic, Gram-negative, rod-shaped, chemolithoautotroph bacterium that derives energy from the oxidation of ferrous iron or reduced sulfur compounds. *A. ferrooxidans*, together with other species from the genus *Acidithiobacillus* (*A. thiooxidans* and *A. caldus*) and *Leptospirillum ferrooxidans*, is involved in the bioleaching of metals. The recovery of copper and uranium by industrial heap bioleaching as well as the recovery of valuable metals, like gold and silver, by stirred reactor processes represent a global market estimated to be about US\$ 10 billion in 1998 (Johnson, 1999). By 1998, in Brazil, the recovery of gold from sulfide minerals using bacterial oxidation processes was responsible for the production of about 4 tons/year of gold.

Besides its industrial use, *A. ferrooxidans* has gained attention due to its unusual physiology. The bacterium grows at low pH values and shows resistance to high concentrations of metal-ions (Rawlings & Kusano, 1994). It has been suggested that the *A. ferrooxidans* resistance to heavy metals might depend on the source of energy being used by the cells, that is, cells oxidizing iron as a growth substrate are more resistant to heavy metals than the ones using thiosulphate (Tuovinen *et al.*, 1971; Silver and Torma, 1974). According to Magnin *et al.* (1998), *A. ferrooxidans* cells growing in the presence of Fe^{2+} show tolerance to the following concentrations of metals: 0.75 M Cd^{2+} , 1M Ni^{2+} , 1 M Zn^{2+} , 0.6 M Cu^{2+} , 0.15 M Co^{2+} , 0.075 M Cr^{3+} , 1 mM Pb^{2+} , 0.1 mM Hg^+ , 10 μM Hg^{2+} and 1 μM Ag^+ . Garcia & Silva (1991) have shown the existence of significant differences in metal resistance among four *A. ferrooxidans* strains. The authors mentioned that this natural variability is important for the selection of the appropriate strains for metal leaching studies.

Cromosomal genes conferring mercury (Shiratori *et al.*, 1989) and arsenic (Butcher *et al.*, 2000) resistance in *A. ferrooxidans* were isolated and characterized. Except for those genes, very little information about genes expressed in the presence of metals in *A. ferrooxidans* is available. The fact that few information on

metal resistance genes is available can be attributed, at least in part, to the fact that *A. ferrooxidans* is difficult to work with since, as mentioned by others, it is a slow growing bacterium (Rawlings and Kusano, 1994) and the cell yielding is low (Holmes & Yates, 1990). Salazar *et al.* (1989), mentioned that it is important to understand gene expression in *A. ferrooxidans* to improve leaching processes.

An interesting metal to study is zinc as it is an essential nutrient for living organisms, including microbes, since it is a cofactor of several enzymes related with metabolic processes. Its presence on the biosphere is mainly in the form of sphalerite (ZnS), which can be directly oxidized by *A. ferrooxidans*, as demonstrated by Garcia *et al.* (1995). Conversely, zinc is one of the metals that contributes to environmental pollution due to several agricultural and industrial practices (Trajanovska *et al.*, 1997). Despite its importance as an essential nutrient, and the well-documented knowledge of the oxidative dissolution of its minerals by *A. ferrooxidans*, there is no information about the genes expressed in this bacterium in the presence of this metal, even though this species presents a high level of resistance to zinc ions.

In this paper, the effect of 60 and 600 mM zinc sulfate on gene expression was investigated by random arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) in *A. ferrooxidans* LR. The differential gene expression was confirmed by Slot blot hybridizations and cDNA identification was achieved by sequencing. The six cDNAs that showed similarity to sequences found in the GenBank database had their expression investigated in other zinc sulfate concentrations. The presence or absence of these genes in other bacteria species was verified by Southern blot.

Results and discussion

The effect of zinc in A. ferrooxidans LR oxygen uptake and growth

Previous studies have shown that the *A. ferrooxidans* Brazilian strain LR is tolerant to high concentrations of several metal ions (Garcia & Silva, 1991; Novo *et al.*,

2000). Therefore, we selected this strain to identify differentially expressed genes in the presence of zinc ions. To determine a zinc concentration to be used in the experiments, growth curves and respirometric analyses were performed for the bacteria in the presence of the following zinc sulfate concentrations: 0 (control), 100, 300 and 600 mM. As shown in Fig. 1A, in the presence of 100 mM zinc sulfate there was practically no inhibition of the bacterium growth since total Fe^{2+} oxidation in the culture medium was completed in the same period of time observed for the control. For zinc sulfate concentrations of 300 and 600 mM, a progressive growth inhibition was detected by the increase of the time required for total Fe^{2+} oxidation (4 and 6 days of growth, respectively) (Fig. 1A).

The effect of zinc on the iron oxidation by *A. ferrooxidans* strain LR was also evaluated by oxygen consumption in respirometric experiments (Fig. 1B). None of the zinc sulfate concentrations used in the experiments fully inhibited oxygen uptake by strain LR (Fig. 1B). However, the velocity of oxygen consumption, calculated from the curves by linear regression, presented a variation in the presence of the zinc concentrations tested. As in the growth experiments, it was not observed a significant effect in the presence of 100 mM zinc sulfate (Fig. 1B). The velocity of oxygen consumption was approximately $4.93 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ ($r=0.99$) in the control (without zinc) and $4.88 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ ($r=0.99$) in the presence of 100 mM zinc sulfate, whereas in the presence of 300 and 600 mM the velocity decreased to 4.69 and $2.73 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$, respectively. Therefore, the inhibition of oxygen uptake by resting cells in the presence of 100, 300, and 600 mM zinc sulfate was 0.02, 4.87 and 44.63%, respectively, in comparison to the control.

Since 600 mM zinc sulfate exerted the most inhibitory effect in growth and oxygen uptake, we decided to investigate differential gene expression in the presence of this metal concentration. To verify if genes were also differentially expressed under a lower metal concentration, we also tested 60 mM zinc sulfate in the RAP-PCR experiments.

RAP-PCR

Two PCR based techniques, mRNA differential display and random arbitrarily primed PCR (RAP-PCR), have been used by several authors (Shepard & Gilmore, 1999; Gill *et al.*, 1999; Liang & Pardee, 1992; McClelland *et al.*, 1995; Welsh *et al.*, 1992; Wong & McClelland, 1994) to investigate differential expression of genes in two or more comparative situations. In this work, the RAP-PCR technique has been optimized to be used for the first time in the identification of differentially expressed genes in response to 60 and 600 mM zinc sulfate in *A. ferrooxidans*. We have found that the utilization of the ready-to-go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia), for the first strand cDNA synthesis, improved the quality of the RAP-PCR experiments since the duplicates of the PCR reactions showed, for the same primer and RNA sample, very little variation in the RAP-PCR gels. Also, a great number of differentially expressed bands were observed when the RNA fingerprintings from control and 600 mM zinc sulfate were compared. Previous experiments conducted without the beads resulted in the observation of just a few differentially expressed bands for each primer.

Only the bands that were reproducible in the two PCR reactions performed for each RNA sample with each primer were considered as differential. A total of 68 differentially expressed bands were isolated from the RNA fingerprintings generated with 3 primers (OPJ-04, OPJ-06 and OPJ-03; Operon Technologies Inc.). Fourteen were isolated with OPF-03 (2 from the control, 4 from the 60 mM and 8 from the 600 mM zinc sulfate treatment), 17 were isolated with the OPJ-04 primer (4 from the control, 5 from the 60 mM and 8 from the 600mM zinc sulfate treatment) and 37 were isolated with the OPJ-06 primer (6 from the control, 8 from the 60 mM and 23 from the 600 mM zinc sulfate treatment).

To confirm the differential expression of the 68 bands isolated from the RAP-PCR experiments, DNA Slot blot hybridizations and analyses were performed as described in the Experimental procedures. Figure 2 shows the RNA fingerprintings, obtained with primer OPJ-04, as well as the Slot blot hybridizations and respective band intensity analyses. From a total of 17 bands isolated with

primer OPJ-04, 11 had their differential expression confirmed by Slot blot hybridization with total cDNA isolated from cells grown in the absence (Fig. 2A) and in the presence of 600 mM zinc sulfate (Fig. 2B). The induction coefficients of the 3 bands isolated in the absence of zinc sulfate (bands whose expression was repressed by the metal) ranged from 0.44 to 0.89 and the induction coefficient for the 8 bands isolated in the presence of zinc sulfate (bands induced by the metal) ranged from 1.44 to 2.81 (Fig. 2F). Figure 2 shows an example of a band isolated from control whose differential expression was not confirmed. That is, band 4, isolated from the control, was supposed to present an induction coefficient below 1. However, this band was located on the line in Fig. 2E, indicating an induction coefficient of 1 (Fig. 2F). From the 68 bands tested, a total of 32 (47%) had the differential expression confirmed (Table 2). It is interesting to notice that none of the 17 bands that were isolated in the presence of 60 mM zinc sulfate had their differential expression confirmed (Table 2). A possible explanation for this is that this zinc sulfate concentration was not a stressful condition for *A. ferrooxidans* LR, a result that is in agreement with the data obtained from the respirometric and growth curves experiments (Fig. 1) that showed similar oxygen consumption and growth for cells in the control and in the presence of 100 mM zinc sulfate. The bands isolated in the presence of 60 mM zinc sulfate as well as the other 21 bands whose differential expression was not confirmed by DNA Slot blot hybridization are false positives, a common problem related to mRNA differential display and RAP-PCR experiments (Liang *et al.*, 1993; Shepard and Gilmore, 1999). The false positive bands were eliminated from further analysis.

Sequencing of differentially expressed RAP-PCR bands

Among the bands whose differential expression was confirmed by the Slot blot hybridizations, we selected the 10 exhibiting the highest induction coefficients (bands induced by zinc) and the 8 exhibiting the lowest induction coefficients (bands repressed by zinc sulfate) for further analyses. The induction coefficients of these bands are shown in Table 3. These bands, ranging in size from 214 to

618 bp (Table 3), were cloned into pGEM-T easy (Promega) and sequenced in a 377XL automated DNA sequencer (Perkin Elmer). The obtained sequences were compared to GenBank sequences using the BLASTX search algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>). The putative sequence identities of the RAP-PCR bands are summarized in Table 3.

Within the 10 bands induced by zinc sulfate, 3 (7F03Zn, 7J04Zn and 6J04Zn) presented similarity with GenBank sequences (Table 3). The RAP-PCR band 7F03Zn was homologous to transposon 7 (Tn7) and Tn7-like from *E. coli* (Flores *et al.*, 1990) and *A. ferrooxidans* (Oppon *et al.*, 1998), respectively. This transposon encodes resistance to trimethoprim and the aminoglycosides streptomycin and spectinomycin (Barth *et al.*, 1976; Craig, 1989). It is a large (14 Kb) and complex transposon that requires five genes, *tnsA*, *B*, *C*, *D* and *E* for transposition (Flores *et al.*, 1990). Our RAP-PCR band was homologous to the TnsB protein. The TnsB and TnsA proteins collaborate in the formation of the transposase involved in strand exchange (May & Craig, 1996; Sarnovsky, 1996). The differential expression of the RAP-PCR band 7F03Zn is probably related with the fact that under stress situations, transposons are stimulated to move to different positions in the genome. The RAP-PCR bands 7J04Zn and 6J04Zn showed low similarity with a hypothetical protein from *Deinococcus radiodurans* (White *et al.*, 1999) and a probable secretion protein from *Pseudomonas aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000), respectively. The function of these two proteins in stress mechanisms is unknown.

Among the 8 bands repressed by zinc sulfate, 3 (13J06C, 16J06C and 7J06C) presented similarity with GenBank sequences (Table 3). The RAP-PCR band 13J06C, isolated from the control and repressed in the presence of zinc sulfate, showed similarity with an elongation factor Tu (EF-Tu) from *Pseudomonas aeruginosa*. The EF-Tu, a guanosine nucleotide binding protein, is involved in protein synthesis (Ludwig *et al.*, 1990). The RAP-PCR band 7J06C showed similarity with a GTP cyclohydrolase II from *Photobacterium leignathi* and 16J06C showed low similarity with a RLX protein from *Staphylococcus aureus*. The relation of these proteins with stress situations is unknown.

RNA Slot blot and Southern blot analyses of the differentially expressed RAP-PCR bands

The 6 RAP-PCR bands that showed similarity, even if a low one, to GenBank sequences were further analyzed by RNA Slot blot and Southern blot. The DNA from these bands was labeled with [α - 32 P]dCTP and used as probes in the RNA Slot blot and Southern blot hybridizations. The RNA Slot blots included 3 μ g of RNA isolated from *A. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of 0, 100, 300 and 600 mM zinc sulfate. The Southern blots included 5 μ g of DNA isolated from: *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* FG460, *Acidithiobacillus* sp. SSP, *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, *A. thiooxidans* DAMS and *E. coli* ATCC 25922^T (Table 1). The purpose of these experiments was to observe the expression of the RAP-PCR bands in the presence of the same zinc sulfate concentration used in the growth and respirometric experiments and to verify their presence in other *A. ferrooxidans* strains and other bacteria species.

As expected, the bands induced by 600 mM zinc sulfate showed, in the RNA Slot blots, a higher expression in the presence of zinc sulfate than in the control. As shown in Fig. 3A, the expression of the RAP-PCR band 7F03Zn progressively increased as the zinc sulfate concentration changed to higher concentrations. The genomic DNA blot hybridization (Fig. 4A) showed that the 7F03Zn probe hybridized with the *A. ferrooxidans* strains, ATCC, LR and FG460, and with *Acidithiobacillus* sp. SSP, a strain whose allocation to the *A. ferrooxidans* genomic species has been revised (Paulino *et al.*, in press). Under the stringency conditions used, no hybridization signals were observed for the *A. thiooxidans* strains, ATCC and DAMS, and for *E. coli*. Oppon *et al.* (1998) described the transposon Tn5468, a close relative of Tn7, for *A. ferrooxidans* ATCC 33020. Though Oppon *et al.* (1998) found, by Southern blot hybridization, a similar or identical Tn5468 transposon in three *A. ferrooxidans* strains isolated from different parts of the world, these authors did not find the transposon in *A. thiooxidans* strains which is in agreement with our data.

The accumulation of the 7J04Zn transcripts increased in the presence of the different concentrations of zinc sulfate in comparison to the control. The maximum accumulation of this transcript was observed in the presence of 300 mM zinc sulfate, followed by a small decrease in the presence of 600 mM zinc sulfate (Fig. 3B), indicating that this zinc sulfate concentration started to exert an inhibitory effect in the expression of this gene. The 7J04Zn probe hybridized with the genomic DNA from the *A. ferrooxidans* strains and *E. coli* (Fig. 4B). The expression of 6J04Zn progressively increased with the increase of the zinc sulfate concentrations (Fig. 3C). Hybridization with the 6J04Zn probe was observed only for genomic DNA from the *A. ferrooxidans* strains tested (Fig. 4C).

As expected, the RAP-PCR bands isolated from the control (expression repressed in the presence of 600 mM zinc sulfate), 13J06C, 16J06C and 7J06C, showed a low transcript accumulation in the presence of 600 mM zinc sulfate (Fig. 5). The 16J06C transcripts progressively decreased in the presence of crescent concentrations of zinc sulfate (Fig. 5B). On contrary to the other RAP-PCR bands, 16J06C might be a very conserved gene since DNA from all the different species tested hybridized with the 16J06C probe (Fig. 6B). The accumulation of the 7J06C transcript progressively decreased from control to 300 mM zinc sulfate (Fig. 5C). However, a very little transcript increase was observed in the presence of 600 mM zinc sulfate in relation to the 300 mM concentration. The 7J06C probe hybridized with the DNA from the 3 *A. ferrooxidans* strains tested and with *Acidithiobacillus* sp. SSP (Fig. 6C). An increase in the accumulation of the 13J06C transcripts was observed in the presence of 100 mM zinc sulfate in comparison with the control (Fig. 5A). Since this RAP-PCR band showed similarity with the elongation factor Tu (EF-Tu) from *Pseudomonas aeruginosa* that is involved in protein synthesis (Ludwig *et al.*, 1990), the transcript increase might be indicating that stress proteins are synthesized in the presence of 100 mM zinc sulfate. However, the accumulation of the 13J06C transcript decreased in the presence of 300 and 600 mM zinc sulfate in comparison with 100 mM, indicating that these higher zinc sulfate concentrations are inhibiting protein synthesis. Only the DNA from the three *A. ferrooxidans* strains hybridized with the 13J06C probe (Fig. 6A).

Experimental procedures

Bacterial strain and growth conditions

The *A. ferrooxidans* strain used in the RAP-PCR experiments was LR. This strain was isolated by O. Garcia Jr. from an uranium ore column leaching effluent in Lagoa Real, State of Bahia, Brazil. Strain LR was grown, in the absence (control) and in the presence of zinc sulfate, under constant shaking at 30°C in modified T&K liquid medium (Tuovinen & Kelly, 1972): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.4 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4 g/l; $(NH_4)_2SO_4$, 0.4 g/l; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 33.4 g/l; pH 1.8. After growth, the cells were harvested by filtration on Millipore membrane (0.45 μm), frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C, for RNA and DNA extraction. DNA was also isolated from the bacterial strains described in Table 1.

Respirometric and growth experiments

A. ferrooxidans LR suspensions were standardized before the respirometric experiments by total protein determination (Bradford, 1976). The experiments, with 100, 300 and 600 mM zinc sulfate, were conducted in a Warburg respirometer in 25 ml flasks. The main compartment of each flask contained 0.3 ml of cell suspensions and 2.2 ml of zinc sulfate solution, pH 1.8. A total of 0.5 ml of the oxidizable substrate (120 mM Fe^{2+}) was placed in the side arm of the Warburg flask and 0.1 ml of 20% (w/v) KOH in a Whatman number 1 filter paper was placed in the center well. The respirometric experiments were carried out in a water bath at 30°C and 150 strokes/min. The cells and metal solution were kept in contact for 10 min before the oxidizable substrate was added to the main compartment. Oxygen uptake was measured in 15 min intervals for 150 min. The rate of oxygen consumption was calculated for each experiment from the linear part of the curve. After the respirometric experiments, cell viability was confirmed by plating.

For the growth experiments, *A. ferrooxidans* LR cells (0.75×10^9 cells) were inoculated in 50 ml of T&K medium, pH 1.8, in 250 ml Erlenmeyer flasks,

containing 0 (control), 100, 300 and 600 mM of zinc sulfate. The samples were incubated in a rotatory shaker at 30°C, 300 rpm. Bacterial growth was monitored every 24 h by ferrous iron titration with potassium dichromate (Garcia *et al.*, 1995). The respirometric and growth experiments were performed in duplicate.

RNA isolation

RNA was isolated from *A. ferrooxidans* LR cells grown, until complete ferrous iron oxidation, in the absence and in the presence of 100, 300 and 600 mM of zinc sulfate. The RNA was isolated as previously described by Winderickx & Castro (1994), with minor modifications. The cells were washed with DEPC-treated water and after centrifugation, they were resuspended in 1 ml of extraction buffer (EDTA 1 mM, LiCl 0.1 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0). One ml of phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) and 100 µl of SDS 10% were added and the mixture was spun in a vortex for 2 min. The aqueous phase was separated by centrifugation (8000 rpm, 3 min, 4°C) and extracted once again with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v). After centrifugation, the aqueous phase was recovered and the RNA was precipitated with 1/20 vol potassium acetate 40% and 2 vol ethanol at -20°C. The RNA was pelleted by centrifugation, washed with 70% ethanol and resuspended in 100 µl of DEPC-treated water. Residual DNA was removed from the RNA preparations by treatment with RNase-free DNase I (Amersham Pharmacia). The RNA concentration and integrity were determined by electrophoresis through 1% agarose-formaldehyde gel in 1 x MOPS running buffer (Sambrook *et al.*, 1989).

RAP-PCR

The protocols described by Welsh *et al.* (1992) and Wong & McClelland (1994) were used to perform the RAP-PCR (random arbitrarily primed polymerase chain reaction) experiments, after modifications. The arbitrary primers (Operon Technologies Inc.) used in the RAP-PCR experiments were OPJ-04, OPJ-06 and

OPF-03. The first strand cDNA synthesis was carried out using the ready-to-go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia) and 1 μ g of DNA-free RNA isolated from cells grown in the absence (control) and in the presence of 600 mM zinc sulfate. For the second strand synthesis, 4 μ l of the first strand reaction were mixed, in a 20 μ l reaction, with 1 x PCR buffer, 1.25 mM $MgCl_2$, 2 μ M of the same primer used in the first strand cDNA synthesis, 2 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP, Gibco BRL), 1 μ Ci [α - ^{32}P]dATP (Amersham Pharmacia) and 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia). The amplifications were carried out, in duplicate, in a Perkin Elmer 2400 thermal cycler following the parameters: initial denaturation at 94°C (5 min); 40 cycles at 94°C (30 sec), 40°C (2 min), 72°C (30 sec) and final extension at 72°C (20 min). Seven μ l of each PCR sample were mixed with 5 μ l of 80% formamide with 0.01% bromophenol blue and 0.01% xylene cyanol. The samples were incubated at 80°C for 4 min and 10 μ l were submitted to electrophoresis (1320 V, 35 mA) on 5% acrylamide-50% urea-1 x Tris-borate-EDTA gels. After electrophoresis, the gel was dried under vacuum onto 3 MM Whatman paper and exposed to X-ray film (Hyperfilm MP, Amersham) for visualization of the RAP fingerprintings. After exposition, the X-ray films were aligned with the RAP-PCR gels and the differentially expressed bands were cut out of the gels and eluted at 95°C in 200 μ l of water. Four μ l of the eluted DNA were used in 40 μ l amplification reactions containing 1 x PCR buffer, 1.25 mM $MgCl_2$, 1 μ M of the same arbitrary primer used in the cDNA synthesis, 20 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (Gibco BRL) and 2.5 U of *Taq* polimerase (Amersham Pharmacia). The amplification conditions were the same described above.

Differential gene expression confirmation

The RAP-PCR bands isolated had their differential expression confirmed by DNA Slot blot hybridization following the methods described by Mou *et al.* (1994) and Xu *et al.* (1997), with modifications. Ten ng of the RAP-PCR bands were mixed

with TE to obtain a final volume of 200 μ l. The DNA was incubated at 95°C for 5 min and 200 μ l of 20 X SSC were added. The DNA samples were transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham) using a Slot blot apparatus (Gibco BRL). The membranes were prehybridized at 42°C overnight in a solution containing 5 X SSC, 50% deionized formamide, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA and 10 X Denhardt's solution (Sambrook *et al.* 1989). Approximately 30 ng of total cDNA samples, synthesized from RNA isolated from cells grown in the absence and in the presence of 600 mM zinc sulfate with the same primers used to isolated the RAP-PCR bands, were labeled with [α -³²P]dCTP, using the Megaprime kit (Amersham Pharmacia), and used as probes. Hybridization was carried out at 42°C, overnight, in a hybridization buffer containing 5 X SSC, 50% deionized formamide, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% SDS, 5% dextran sulfate, 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, 2 X Denhardt's solution and 10^7 - 10^8 cpm/ml of the denatured probe. After hybridization, the membranes were washed for 5 min, twice, at room temperature, in a solution containing 2 X SSC and 0.5% SDS. These washes were followed by two 15 min washes at room temperature in a solution containing 2 X SSC and 0.1% SDS and two 30 min washes at 60°C in 0.1 X SSC and 0.1% SDS. The membranes were exposed to X-ray films (Amersham).

The hybridization signals were quantified using the CrazyQuant v. 1.3 software (http://chroma.mbt.washington.edu/hood_www/crazyquant/Applet.htm) and data analysis was performed as described by Gill (1999), with modifications. The experiments were performed in duplicates and the average signal intensity of each sample was determined. To normalize the data, the average signal intensity value of each RAP-PCR band was divided by the average of the five most repetitive intensity values of RAP-PCR bands isolated from the same treatment the band being analyzed was isolated and present in the same film. The data normalized to 1 was plotted in a graphic, using the program Origin v. 4.1, and the induction coefficient of each band was determined by: zinc sulfate normalized data/control normalized data. RAP-PCR bands showing induction coefficients above (induced) or below (repressed) 1 were considered differential.

RAP-PCR bands cloning and sequencing

Twenty RAP-PCR bands, 10 induced and 10 repressed by 600 mM zinc sulfate, whose differential expression was confirmed by Slot blot hybridization were chosen for cloning and sequencing. The bands selected were the ones that presented the highest induction ratios. These bands were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega), following the specifications of the manufacturer. At least three clones of each RAP-PCR band were sequenced, with the M13 forward and reverse primers (Amersham Pharmacia), in an automated sequencer (ABI Prism 377XL, Perkin Elmer). The sequences were compared to GenBank sequences using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>), function BLASTX 2.1.1.

The differentially expressed RAP-PCR bands that showed homology with GenBank sequences (6J04Zn, 7J04Zn, 7F03Zn, 7J06C, 13J06C and 16J06C) were further analyzed in RNA Slot blot and Southern blot hybridizations. The bands were labeled with [α - 32 P]dCTP using the Megaprime kit (Amersham Pharmacia) and used as probes in the experiments.

Total RNA Slot blots

The expression of the RAP-PCR bands repressed (7J06C, 13J06C and 16J06C) and induced (6J04Zn, 7J04Zn and 7F03Zn) by 600 mM zinc sulfate was evaluated in the presence of 100 and 300 mM zinc sulfate. RNA was isolated, as described above, from *A. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of 0 (control), 100, 300 and 600 mM zinc sulfate. Three μ g of RNA were mixed with TE, to obtain a final volume of 12.5 μ l, and 37.5 μ l of a solution containing 500 μ l of deionized formamide, 162 μ l of formaldehyde 37%, 100 μ l of MOPS 10 X (Sambrook *et al.*, 1989). The samples were incubated at 65°C for 5 min and 50 μ l of 20 X SSC were added. They were transferred in duplicate to nylon membranes (Hybond-N, Amersham Pharmacia) using a slot apparatus (Gibco BRL). After incubation at 80°C for 2 h, the membranes were prehybridized, for at least 2 h, and hybridized overnight with 10^7 - 10^8 cpm/ml of the denatured probe. The prehybridization,

hybridization and wash solutions were the same mentioned above for the DNA slot blot hybridizations. The membranes were exposed to X-ray films and the hybridization signals were quantified using the CrazyQuant v. 1.3 software. The results were presented as percentages. The amount of RNA in the membranes was normalized by hybridization with the *A. ferrooxidans* LR rDNA 16S gene.

Genomic DNA isolation and hybridization

Genomic DNA was isolated from the following strains: *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* FG460, *Acidithiobacillus* sp. SSP, *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, *A. thiooxidans* DAMS and *E. coli* ATCC 25922^T. The protocol described by Goss *et al.* (1990) was used for DNA isolation, after modifications. The *A. ferrooxidans* cells were washed with TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) and TAS (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl). After centrifugation, the cells were resuspended in 500 µl TAS and 150 µg of proteinase K and 50 µl of SDS 10% were added. The samples were incubated at 50°C for 1 h and after that, they were extracted with chloroform: isoamyl alcohol (24:1, v/v). Four µl of RNase (10 mg/ml) were added and the samples were incubated at room temperature for 2 h. The samples were extracted once with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) and once with chloroform: isoamyl alcohol (24:1, v/v). The DNA was precipitated with 1/10 vol of NaCl 5 M and 2 vol of ethanol. The DNA was dissolved in TE and the concentration was determined by comparison, in gel, with known concentrations of λ DNA (Gibco BRL).

Five µg of each genomic DNA preparation were digested either with *Bam*H I or *Hind* III (Gibco BRL). The resultant fragments were separated by electrophoresis on 0.8% agarose 1 X TAE gels and transferred to nylon membranes (Hybond-N) as recommended by the membrane manufacturer (Amersham Pharmacia). The membranes were prehybridized at 42°C overnight as described above for the DNA slot blot hybridizations. Approximately 50 ng of the following RAP-PCR bands: 6ZnJ04, 7ZnJ04, 7ZnF03, 7CJ06, 13CJ06 and 16CJ06 were labeled with

[α - 32 P]dCTP using the Megaprime kit (Amersham Pharmacia) and used as probes (10^7 - 10^8 cpm/ml), after denaturation, in the hybridizations. The results were visualized after the membranes were exposed to X-ray films.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 97/1069-0). R. F. B. received a postgraduate fellowship from FAPESP (99/01497-7).

References

- Barth, P., Datta, N., Hedges, R., and Grinter, N. (1976) Transposition of a deoxyribonucleic acid sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R483 to other replicons. *J. Bacteriol.* **125**: 800-810.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Butcher, B.G., Deane, S.M., and Rawlings, D.E. (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **66**: 1826-1833.
- Craig, N.L. (1989) Transposon Tn7. In: Berg D.E. & Howe M.M. (Eds). *Mobile DNA* American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 211-225.
- Fleming, J. T.; Yao, W. H., and Sayler, G. S. (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3698-3706.
- Flores, C., Qadri, M.I., and Lichtenstein, C. (1990) DNA sequence analysis of five genes; *tnsA*, *B*, *C*, *D* and *E*, required for Tn7 transposition. *Nucleic Acids Res.* **18**(4): 901-910.

- Garcia Jr., O., and Silva, L.L. (1991) Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnology Letters* **13**(8): 567-570.
- Garcia Jr., O., Bigham, J.M., and Tuovinen, O.H. (1995) Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 578-584.
- Gill, R.T., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (1999) Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. *Appl. and Environ. Microbiol.* **65**(12): 5386-5393.
- Goss, T.J., O'Hara, G.W., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R. (1990) Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.* **172**: 5173-5179.
- Holmes, D.S., and Yates, J.R. (1990) Basic principles of genetic manipulation of *Thiobacillus ferrooxidans* for biohydrometallurgical applications. In: Ehrlich HL & Brierly CL (Eds). *Microbial Mineral Recovery McGraw-Hill, New York, NY.*, pp 29-54.
- Johnson, D.B. (1999) Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. In: Amils R & Ballester A (Eds). *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part A*. Elsevier, Amsterdam, pp 645-656.
- Kelly, D.P., and 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 511-516.
- Liang, P., and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Liang, P., Averboukh, L., and Pardee, A.B. (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3269-3275.

- Ludwig, W., Weizenegger, M., Betzl, D., Leidel, E., Lenz, T., Ludvigsen, A., Möllenhoff, D., and Wenzig, P. (1990) Complete nucleotide sequences of seven eubacterial genes coding for the elongation factor Tu: functional, structural and phylogenetic evaluations. *Arch. Microbiol.* **153**: 241-247.
- Magnin, J., Baillet, F., Boyer, A., Zlatev, R., Luca, M., Cheruy, A., and Ozil, P. (1998) Augmentation par régénération électrochimique du substrat, de la production d'une biomasse (*Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583) pour un procédé biologique de récupération de métax. *Can. J. Chem. Eng.* **76**: 978-984.
- May, E. W., and Craig, N.L. (1996) Switching from cut and paste to replicative Tn7 transposition. *Science* **272**: 401-404.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., and Welsh, J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.* **11**: 242-246.
- Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E., and Chalifour, L. (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **199(2)**: 564-569.
- Novo, M.T.M., da Silva, A.C., Moreto, R., Cabral, P.C., Costacurta, A., Garcia Jr., O., and Ottoboni, L.M.M. (2000) *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 187-195.
- Oppon, J.C., Sarnovsky, R.J., Craig, N.L., and Rawlings, D.E. (1998) A tn7-like transposon is present in the *glmUS* region of the obligately chemoautolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **180(11)**: 3007-3012.
- Paulino, L.C., Bergamo, R.F., Mello, M.P., Garcia Jr., O., Manfio, G.P., and Ottoboni, L.M.M. (in press) Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil.
- Rawlings, D.E., and Kusano, T. (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**: 39-55.
- Salazar, O., Takamiya, M., and Orellana, O. (1989) Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* **242**: 439-443.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sarnovsky, R. J., May, E. W., and Craig, N. L. 1996. The Tn7 transposase is a heteromeric complex in which DNA breakage and joining activities are distributed between different gene products. *EMBO J*: **22**: 6348-6361.
- Shepard, B.D., and Gilmore, M.S. (1999) Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* **65**(4): 1470-1476.
- Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., and Kitagawa, Y. (1989) Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 3458-3464.
- Silver, M., and Torma, A. E. (1974) Oxidation of metal sulfides by *T. ferrooxidans* grown on different substrates. *Can. J. Microbiol.* **20**: 141-147.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., and Paulsen, I.T. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**(6799): 959-964.
- Trajanovska, S., Britz, M.L., and Bhave, M. (1997) Detection of heavy metal ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. *Biodegradation* **8**: 113-124.
- Tuovinen, O.H., Niemela, S.J., and Gyllenberg, H.G. (1971) Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek*. **37**: 489-496.
- Tuovinen, O. H., and Kelly, D. P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Z. Allg. Mikrobiologie*, **12**: 311-346.
- Xu, N., Johns, B., Pullman, G., and 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.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4965-4970.
- Winderickx, J., and Castro, J.M. (1994) *Practical course in molecular biology of microorganisms*. Universidade Federal de Ouro Preto – MG, January 23-February 11, pp 59.
- White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Fraser, C.M., et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**(5444): 1571-1577.
- Wong, K.K., and McClelland, M. (1994) Stress-inducible gene of salmonella typhimurium identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **91**: 639-643.

Figure Legends

Fig. 1. The effect of 0 (control), 100, 300 and 600 mM zinc sulfate on iron oxidation by *A. ferrooxidans* strain LR. (A) growth curves and (B) oxygen consumption by resting cells (respirometry).

Fig. 2. RAP-PCR profiles obtained with the OPJ-04 primer (Operon) and RNA from *A. ferrooxidans* LR cells grown in the absence (C) and in the presence (Zn) of 600 mM zinc sulfate (A). DNA Slot blot hybridizations using 10 ng of the RAP-PCR bands and as probes, total cDNAs synthesized from RNA isolated from cells grown in the absence (B) and in the presence (C) of 600 mM zinc sulfate. (D) Histogram representing the intensity of the Slot blot hybridization signals. (E) Graphic analysis of (D). (F) Induction ratios of the RAP-PCR bands tested. The white and black arrows indicate the repressed and induced bands, respectively.

Fig. 3. Slot blot hybridizations. Three μg of RNA from cells grown in the presence of 0 (1), 100 (2), 300 (3) and 600 (4) mM zinc sulfate were hybridized with the RAP-PCR probes: 7F03Zn (A), 7J04Zn (B) and 6J04Zn (C), labeled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$.

Fig. 4. Southern blot hybridizations. Five μg of genomic DNA from: *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* FG460, *Acidithiobacillus* sp. SSP, *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, *A. thiooxidans* DAMS and *E. coli* ATCC 25922^T were hybridized with the RAP-PCR probes: 7F03Zn (A), 7J04Zn (B) and 6J04Zn (C), labeled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$.

Fig. 5. Slot blot hybridizations. Three μg of RNA from cells grown in the presence of 0 (1), 100 (2), 300 (3) and 600 (4) mM zinc sulfate were hybridized with the RAP-PCR probes: 13J06C (A), 16J06C (B) and 7J06C (C), labeled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$.

Fig. 6. Southern blot hybridizations. Five μg of genomic DNA from: *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* FG460, *Acidithiobacillus* sp. SSP, *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, *A. thiooxidans* DAMS and *E. coli* ATCC 25922^T were hybridized with the RAP-PCR probes: 13J06C (A), 16J06C (B) and 7J06C (C), labeled with [α -³²P]dCTP.

Table 1. Bacterial strains

Strains	Description and source
<i>A. ferrooxidans</i>	
ATCC 23270 ^T	Type strain from ATCC ¹ , USA. Isolated from acid, bituminous effluent of coal mine
LR	Acid effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil (Garcia 1991)
FG460	Acid drainage from wastes of uranium mine from Figueira, State of Paraná, Brazil (Garcia 1991)
<i>Acidithiobacillus sp</i>	
SSP	Acid drainage from coal mine wastes from Siderópolis, State of Santa Catarina, Brazil (Garcia 1991)
<i>A. thiooxidans</i>	
ATCC 19377 ^T	Type strain from ATCC ¹ , USA. Isolated from Kimmeridge clay, Dorset, England, UK
DAMS	Effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil
<i>E. coli</i>	
ATCC 25922	Clinic isolated from ATCC ¹

¹ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

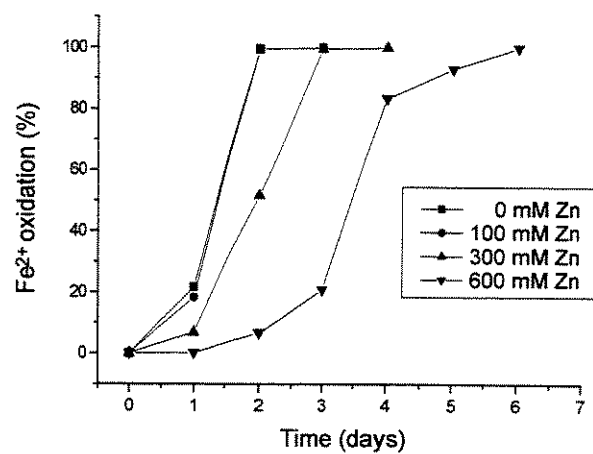
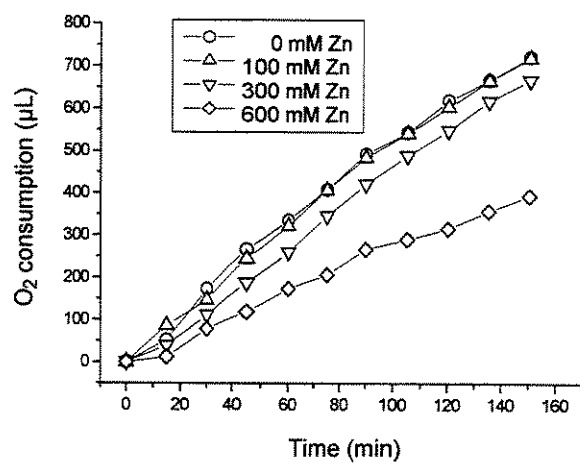
Table 2. DNA Slot blot hybridization analysis of the RAP-PCR bands

<i>Primer</i>	Number of bands analyzed	Number of bands confirmed			Total number of bands confirmed
		Control	Zn 60 mM	Zn 600 mM	
OPJ-04	17	3	0	8	11
OPJ-06	37	6	0	8	14
OPF-03	14	2	0	5	7
Total	68	11	0	21	32

Table 3. Sequence data for the cloned zinc sulfate-reponsive RAP-PCR products

RAP-PCR product	Primer	Size (bp)	Induced or Repressed by zinc	Induction Ratio ^a	Similarity (accession number)	Similarity %
7F03Zn	OPF-03	364	induced	14.64	gene <i>tns B</i> from Transposon Tn7 <i>Escherichia coli</i> (P13989); <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (T45495)	72%
18J06Zn	OPJ-06	377	induced	3.66	no known similarity	-
4J06Zn	OPJ-06	615	induced	2.86	no known similarity	-
27J06Zn	OPJ-06	221	induced	2.85	no known similarity	-
7J04Zn	OPJ-04	237	induced	2.81	Hypothetical protein <i>Deinococcus radiodurans</i> (D75542)	53%
24J06Zn	OPJ-06	226	induced	2.75	no known similarity	-
6J04Zn	OPJ-04	257	induced	2.65	Probable secretion protein <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (B83127)	55%
25J06Zn	OPJ-06	226	induced	2.31	no known similarity	-
19J06Zn	OPJ-06	299	induced	2.2	no known similarity	-
5J06Zn	OPJ-06	618	induced	2.16	no known similarity	-
13J06C	OPJ-06	483	repressed	0.87	Elongation Factor Tu (EF-Tu) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AAG07653)	92%
14J06C	OPJ-06	472	repressed	0.74	no known similarity	-
10J06C	OPJ-06	532	repressed	0.59	no known similarity	-
17J06C	OPJ-06	212	repressed	0.59	no known similarity	-
16J06C	OPJ-06	446	repressed	0.57	RLX protein <i>Staphylococcus aureus</i> (P14491)	48%
7J06C	OPJ-06	214	repressed	0.52	GTP cyclohydrolase <i>Photobacterium leignathi</i> (JC1188)	83%
1J04C	OPJ-04	573	repressed	0.48	no known similarity	-
12J04C	OPJ-04	217	repressed	0.44	no known similarity	-

(a) the induction ratio is greater than 1 to the induced and lower than 1 to the repressed RAP-PCR products

A**B****Fig. 1**

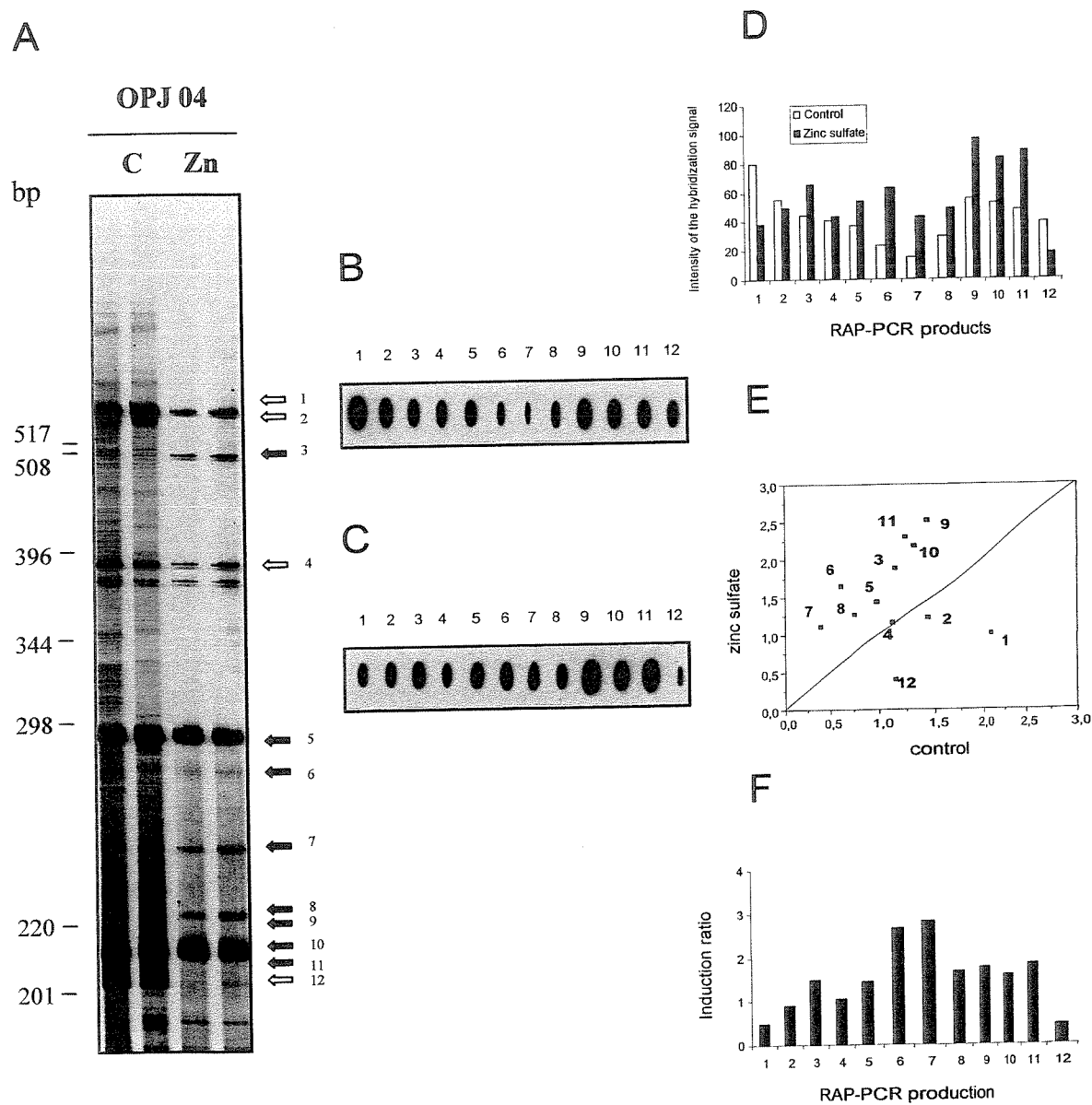
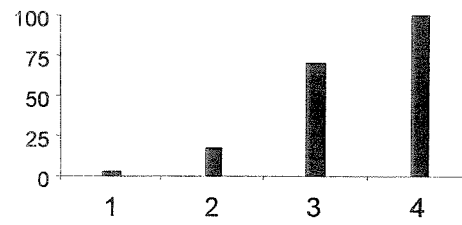
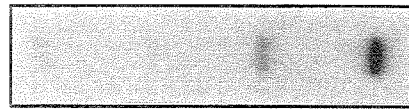
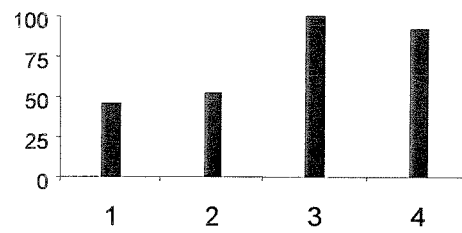
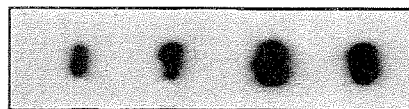


Fig. 2

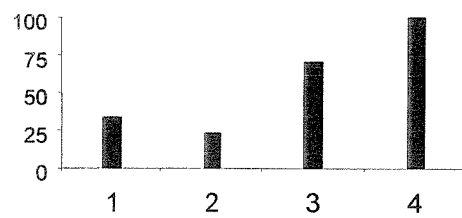
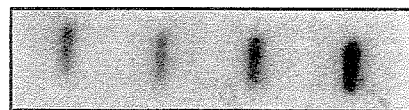
A

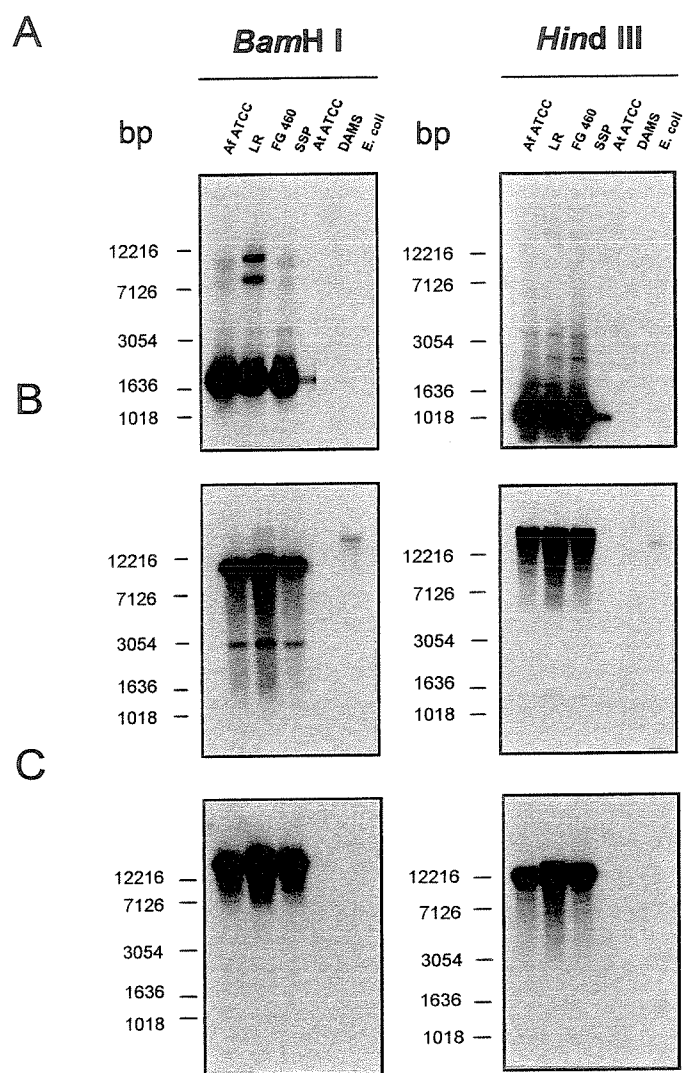


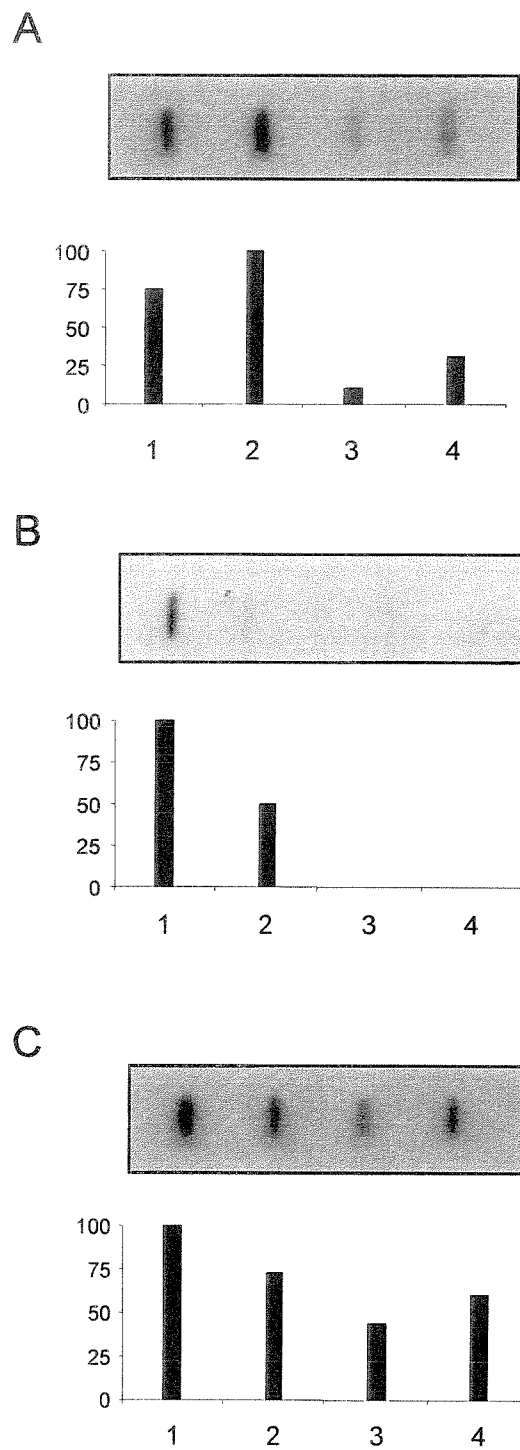
B



C

**Fig. 3**

**Fig. 4**

**Fig. 5**

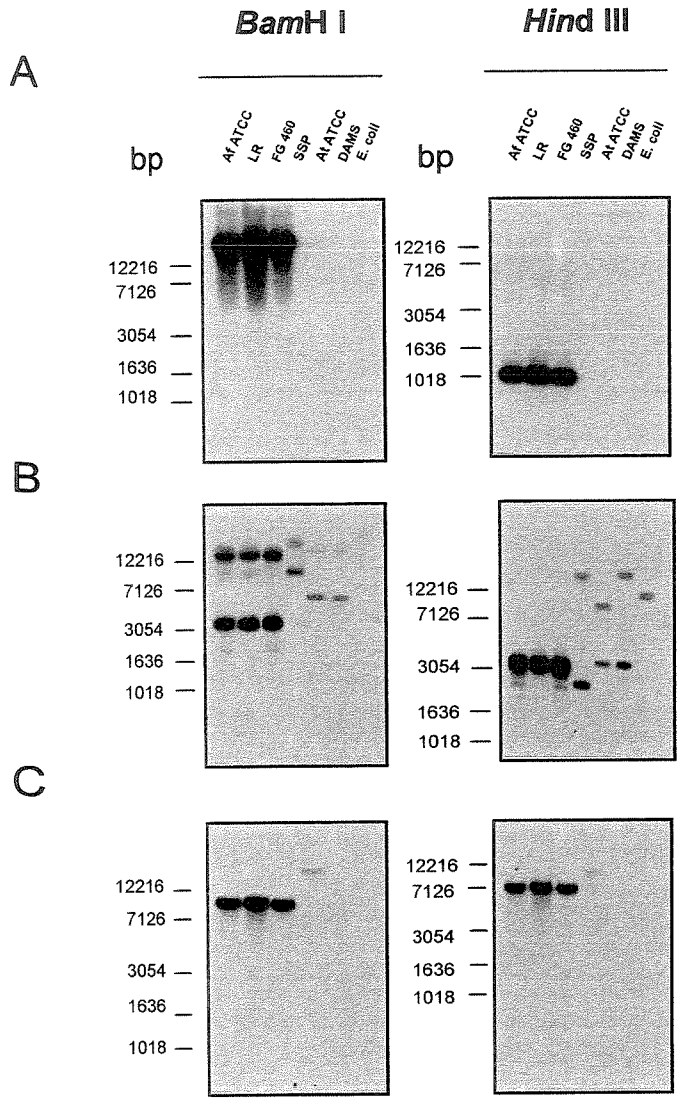


Fig. 6

APÊNDICE

Sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a zinco em *A. ferrooxidans*

As seqüências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR apresentados na tabela 3 estão relacionados abaixo:

Sequências nucleotídicas obtidas na presença de 600 mM de sulfato de zinco

> 7F03Zn

```

1 CCTGATCACC GGA CTGTATG TGGGGCTTGA AGGACCGAGC TGGTTAGGTG CGATGATGGC
61 GTTAGCTAAT GCGGCAAGCG ATAAAAAGGC GTTTTGCAGC AAATATGGAA TCTCCATATC
121 GGATGAGGAC TGGCCGTGCA AGAATCTTCC TATGGAGATC CTTGCGGATC GCGGCGAATT
181 ACTGAGTAGG CACGCCGATG AATTGACAGA TTCGTAAAC ATTACGGTGG CGAATGCGCC
241 GCCCTTTTCGT GCCGACTGGA AGGGTATAGT GGAGCAGCAA GTTCCGAATT GCCAATGAAC
301 GAAGTGATCC ATTGGGTACC TGGGGCCGTG CCGGCGTGTC GCAAGAGAAC GTGGTGATCA
361 GGA

```

> 18J06Zn

```

1 TCGTTCCGCA ATCGACTCCT ATAGGGCGAA TTGGGCCCCGA CGTCGCATGC TCCCGGCCGC
61 CATGGCGGCC GCGGGAATTC GATTCATACT GTAATGTTAG TTAGCTAAGC CTTATGACTT
121 TTGTTCA GTT TGCTTTTATT GAGTTTTTCG GTATTTCTCG TGTTCCTTTT TTTTCCCTCT
181 TTAACCTGAT GATTTATCAA GGTTTAGGAG TTAGAAATCG ATTTGTTTCC CAGCGATTGT
241 TTTCTGGAT GTTATTCAA TTTTGGTTT TTCTTTCAGG GTTAATCGTG TTCCTTCTTT
301 GTTTAAAATT GGCAATTCTT TTGATTCAAG GTGTTATGTT TTGCTTTTGT TTGCTGTATT
361 GCCTTGCGGA ACGAA

```

> 4J06Zn

```

1 TCGTTCCGCA TCCAGTACCG CACCGCCGGT CACCCCAACG TCCACCCCGT GGGCAGCATT
61 CAGGTTGAGC GAGGTAAGGC CAGCGCGCAA AGTATGTATG GCCGCAGCAG CAGGCTCCAG
121 AGACTTGTA TCCAGGGCAG GCTGAGTAAT GACGAAGCGT TGCGACGGCC CCATTGGGCG
181 CAGATCGCCG CCATGAGTGT ACCCCACGAA ATGGTATAGG ATTTGCCCTG CATCTGCGCC
241 GTGAGCGCCT GATCCAGAGC AGAAAAATA GCCGTCAATC CGGGCAGTTG CACACCATTTG
301 GTCAGGCGTT GCCCAATCGC CATGCTCAAC AGGCTGCTGA GGCCCGTTCA GGCTCGGTTT
361 GGCAGAAAAC CTCGCGATGA GCGGCTTGCG CATCGGTTAT GCCGTTGGG CAAAATCCTG
421 TACTTGTTTG GGGGAGAGAT ACAAGAGGCC GTTACGCTTG GAAAAAGGC CCGCCGCCCG
481 GCACATACAC GTTGTGAAAA GATTGTGGCC GGGGCGCGCA GCCAATTCTT GAGGCGATCC
541 GACGTTGTAT CCGTAAGATT TCGGTCAAGC GCCTGGAAGA ACCACCACAA TCGTGTTTTTT
601 ATTCTGCGGA ACCAA

```

> 27J06Zn

```

1 TCGTTCCGCA GTATAGAGTG GAGGGGCGTT GTAGGGGGTT TGAATCGTTC TTTGTGTCGT
61 TGGGGTTTGGG TTTGGTGAGG TGTTGGTTTG TGTTGGTCTT TTGGTTTTTT GTTAAATTGG
121 GCCTGGATAG TCTTTGTCTT GTGTCTCTTG ATGGAGTGGT TTAATTGATG AGATAGTTGT
181 CCATGGTTTGG CTCCGGCTGG GGTAGTTAT GCGGAACGAA

```

> 7J04Zn

```

1  CCGAACACGG GACACATCGA ACAGCGCAGC CCGCAGAAAA GGTGAGAAGC CACAGAAAGT
61 CGTGGTGTTC TGGCTTTAAC CATATAAAAT ATAGATGGAG CGCTATTTTG CCACCAAAAT
121 CCTTATATGG TCACATACTC CTCAGAACTC TATTGACCGA TCCATATTTT CTTCTGAGGT
181 TGTCGGCACA AACACTAAGA CCAACATCAG AAGCTAGATT TTTGGCCGTG TTCGGA

```

> 24J06Zn

```

1  TCGTTCCGCA CACTAGACTA AAGAATACTA AAAATCAACC ACAGCACATA AGAATCAAAA
61 AAAAGCGAAG CAGTCACATA CAAATTACGA CCACGACCAC TACTAACCAA AAACAAAAAA
121 CCAAAAGACC AACACAAACC AACACCTCAC CAAACCCAAC CCAACGACA CAAAGAACGA
181 TTCAAACCCC CTACAACGCC CCTCCACTCT ATACTGCGGA ACGAA

```

> 6J04Zn

```

1  CCGAACACGG GTGGCTTTTCG AGAATCTGCA GGCCTCCGCA GTGGGGCTGG GGGTCGCGGA
61 ATCGGCGTGG TTGCCGAGTC TTTCCCTCAC CGACAATGCG GCCCGCTCGC AAAGTAACAC
121 CACGGCGGGT TTCAGTATTC CGATCCTCAA CAGTAATTTCG GATACACTGA GTTTAAGTTA
181 CGTCCTCCTC GATTTTGGAC TGCGTAGCGC CCAGCGCGAC GCGGCACTCG CACAGATTTA
241 TATTTCCGTG TTCGGA

```

> 25J06Zn

```

1  TCGTTCCGCA TCCTTCTTTT TGCTTTTCAA CCTCTTTCCT AGTGTGCTAT TGTTCCTCTGG
61 GCACCTCCCG GCGCTGGACC TTGCTTTTCT GGCTCGAGTT TTGCATCTCT CGTACTTTAG
121 GGCTGTTAGG CTTAGCTCGG CTGGGGATTC TTATTTCAAT GTCGACGGCG AAATGGCGCG
181 TTTGCCCCGAC CTGCTCCCCCT ATGCTGCGGA ACGAA

```

> 19J06Zn

```

1  TCGTTCCGCA TTTTATGTGT TGGGTAGGTT TTGATTTGTT CTTTCTTTAT GGGTGCTTTG
61 TTGTATTACC TTATGTCTGT GTGCGTGCTT AGATTTTGGG TAATTGATTG TCTTGATATCG
121 TTTTTATTTT TTGAGATCGC GCGGTTGTAT TTTAGTGTCA ATTGTTGCTT TATTAGTTAT
181 TTTGAGTTTT TTTGTTGGAT ATTGAGATTT GTTTGTTATA AGATTATTGA TACATGGGTC
241 AGTTTTATCG TATTTGCGAG TCGTTTTTTT TGCATATCTG CGGAACGAA

```

> 5J06Zn

```

1  TCGTTCCGCA TCCAGTACCG CACCGCCGGT CACCCCAACG TCCACCCCGT GGGCAGCATT
61 CAGGTTGAGC GAGGTAAGGC CAGCGCGCAA AGTATGTATG GCCGCAGCAG CAGGCTCCAG
121 AGACTTGTA TCCAGGGCAG GCTGAATAAT GACGAAGCGT TGCGACGGCC CCATTCGGGC
181 CAGATCGCCG CCCATGAGTG TACCCACGA AATGGTATAG GATTTGCCCT GCATCTGCGC
241 CGTGAGCGCC TGATCCAGAG CAGAAAAAAT AGCCGTCAAT CCGGGCAGTT GCACACCATT
301 GGTCAAGCGT TGCCCAATCG CCATGCTCAA CAGGCTGCTG AGGCCGTTCA GTTTCGGTTC
361 GGCAGAGAGC CTCGCGATGA GCGGCTGCGC ATCGGTTATG CGGTTGGCAA AATCCTGTAC
421 TTGTTTGGGG GAGAGATACA AGAGGCCGNT ACGCTGGAAA AAAGGCCCGC CCGCCGGCAC
481 ATACCACCGT TTTGAAAAGA TTGTGGCCGG GCGCGCAGCC CAAGTACTGG AGGCATCGA
541 CGGGCTTGTA TCCGTAAGAA TTCCGGTCAG CGCCCTGGGA GGACCCACCA CAATCGTGT
601 TTTATCCTGC GGAACGA

```

Sequências nucleotídicas obtidas na ausência de 600 mM de sulfato de zinco

> 13J06C

```

1 TCGTTCCGCA AGATTCTGGA TCAGGGGCAG GCCGGAGACA ACGTCGGGGT ACTGCTGCGC
61 GGCACGAAGA AAGATGATGT GGAGCGTGGT CAGGTACTGG CCAAGCCGGG CAGCATCAAG
121 CCGCATAACG GTTTTGAAGC GGAAGTATAT GTGTTGTCTG AAGAGGAAGG GGGTCGACAC
181 ACGCCGTTTT TCAATGGTTA CCGCCCGCAG TTTTACTTTC GTACCACTGA CGTGACGGGT
241 GCGGTGGAGT TGCCGGAAGG TGTGGAGATG GTGATGCCGG GCGACAATAT ATTGTTCAAG
301 GTCGCGTTGA TTGCGCCGAT TGCATGGAG GAAGGTCTGC GTTTCGCGGT GCGCGAAGGC
361 GGCCATACCG TTGGCGCCGG CGTCGTCTCC AAGGTGGTCG AATAATGGAC AAGTTCCAAG
421 ATTCGCATCC GTCTTAAATC ATATGATTAT CGCATGCTCG ATATTTCCCG CTTGCGGAAC
481 GA

```

> 14J06C

```

1 TCGTTCCGCA CGGCAGAATA TCAGCAGGGT GTTTAGCAAA ATCCACCTGT AATTGTGGAA
61 ATTTAGCGGT TTACCAGGCA ACCAATAAAA ACCAATTTTG CAATGGTTTG CGGTCTGTGC
121 AATATGCGCT ATTTAAPTAT ATATAATTTG AGTTAGCACA TAGGCTAGGG AGCAAACAGC
181 AATAAACATA AGCTCCAAGT ACCTCCAATT TACTCTCCTT TTAAGTAGCG CGGCATTCCA
241 GTTATTGGCT TTTATGGCTT TGATAGCAAA AAAATGCGTC ACATATAATA AGTGTCAATTA
301 TTGAAGACGC AAAAAATGAT AAATAAATAG TGAATAAATT GTATATTTTT AAATACCTAG
361 GACTGTCAAG TGTATGCATA ACCATGCTTG AGAAAGACAG AAATAATATA AATGGCAATA
421 AATTCAATGG CCGATAATAT CTCTCTCCTA TCGCTAAATA TGCGBAACGA A

```

> 10J06C

```

1 TCGTTCCGCA CAGGTACGTT CAATGCGCCG TCCCAGTCTC TCGCCTATTT TGGCAAGGCG
61 GTGAAGACCT TCCGGAGTGG CACCTTCAGC CTTGGCGGCT ATGTCGACAG TTCGCGCGAG
121 TTCAGGCCCA ATTTCATACC GGTACCCCG ATACAGGGCA TCACCACCCA GGGCCTGAAC
181 GCCAATGCGC CTTTGTATAG CCAACAGACC AGCGGGTTTT ACGCATCACT GCCTGAGTCC
241 ATCTGGTTTA AGCAATTGAA AGTGCAAGGC TACATGCTGT ACTCCAAGCT GAACCTCCGC
301 CTCAGCAGGG ACGTCACGCT GCACGAAATG GCCTGGTATC GCCATGGCCA CCGGGTGCAT
361 TACCGCATCA CCAACTTTGT ACCAGGAAGC AGCGTAAATT CCGAGTATTA CAACCCGAGC
421 TCGGATACTT ATGGGGACAA GCTGTATTTT GACTGGCGCC TGCCTATGAA CCTCGTGAAG
481 GCCGGAGGGT CATGGATTCA TCAGCAATAC ACCACACCTT ATGCGGAACG A

```

> 17J06C

```

1 TCGTTCCGCA GAGGGGCGTT GTAGGGGGTT TGAATCGTTC TTTGTGTCTG TGGGGTTGGG
61 TTTGGTGAGG TGTTGGTTTG TGTTGGTCTT TTGGTTTTTT GTTAAATTGG GCCTGGATAG
121 TCTTTGTCTT GTGTCTCTTG ATGGAGTGGT TTAATTGATG AGATAGTTGT CCATGGTTGG
181 CTCCGGCTGG GGTAGTTAT GCGGAACGAA

```

> 16J06C

```

1 TCGTTCCGCA AGGATGGAAG ATTGGCGCTT TCTGGCATTG TGACATTTGG AACAGAAGCG
61 CAATCCATCA TTAATGACAT GACGCCAGAG AAACAAAATG CAGTTTTCCG TAAGATCGCA
121 GAACGCACTG CAAAGCTGGC CGATCGTGAA TTGATTAGTC TGGTTGTGCA TCGTGATGAA
181 TCCGCACCGC ATGCTCATTT TATGTTGAGA AGCTATAAGC ATGACCAAGA GACGGGCCAT
241 GAAATCCCCA TGAATTTGGC TGCCGTTGAT CTGCGGATGT TGCAGGATGT GGCCGGGAAT
301 GAAGTGTCCG ACTTGGGTAT CACCAGAGGC AAGAGCAAAA AAAAGAGAAT CGCAGACGGT
361 GAAGAACCCG CTAATGGAT ACATTCGATC AGTAAAGCAG CTTTATGAAA CGCTTCCTGC
421 CGACATTGCC AAGGTTGCGG AACGA

```

> 7J06C

```

1 TCGTTCCGCA TATCCAATAG CACCCTCTTA TTCCGATGTT TACCTCTCTT CTTTTTCTTC
61 TTTTGTGATCT TAGTCCTTTT TTGTTGTTTG ATGTTTATTC ACCTTCGTTT TCACGCCCCCT
121 CGTCGTCCAT CAGAATCACC ATCCGACCGG CAGCGATGTC GCGATGATC TCCTCTGCGG
181 AACGAATCCG GTGGTCTAGG TACTGCGGAA CGA

```

> 1J04C

```

1 CCGAACACGG CAATCCCAGA AATTGAAACA AGAAGGAGGA CCTCAGCTCG AGGTAGCAGT
61 ATTAGAAATA ATAGATTGCT AAATCATGT TGCCATACTA ATTTAGAGGG CAGAAAAGGT
121 AAAAAAAGA GAGAGAAACG GTTGCTTGAG CAATGGTCTG GAGAAAGTAA GGGTAGCGGG
181 GGATGTATAA AGAGAAAAGG CAAAAATAAA GGATATTTTA ACTTGGAATA GTTAAGATCC
241 AAGAAAGTAA TTGGACTAGT GAGAGAACAC CTGCACGATA AGAGAAGTTT TGGGGCTGTA
301 GAAGATAAGA AAAAATTCTG TGCAAGAGAA AGAGGATACA GTTAAAAAAT AGGTAGTAAA
361 AGGCTGGTAA AAAGTATACC TAAAAAAGAG GTATTAATGT TCTAAGATAG AATCACTTTT
421 GTTGATAATT ACATTTAAGA AGGTAAGTAA GTGGAGTAGT TACAAAAGAT GGAGAGAATG
481 TTTATTAAGG AGATAGTCCT TACCCGTAAG TTAAACGTGT ATAGGAGTAA GCCGTATTAA
541 AGTATCTGGT GCTTATTTTA CCGAGTTCCG GA

```

> 12J04C

```

1 CCGAACACGG AAGACCGAGG CTGCTGGAAA AAGCAATTCA GTGTACAACA TAATCTAGAT
61 GCCGTGAACG AGGTCCTGTT AGAAGCAGGT TAATAGATAA TAAGTGCAAG TAATATAGCG
121 CTAGGGGGGA TAGAGGGTAT ACTCAGACCA GTTATATTAA GCACAGGGTA CTTAATTTAA
181 GGTATAGCTC AAATGCTAAA CATGGCCGTG TTCGGA

```

Expressão diferencial de genes na presença de cádmio em *A. ferrooxidans*

Capítulo II

1. INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria Gram-negativa, não patogênica que obtém a energia necessária para o seu crescimento pela oxidação de substratos inorgânicos. Esta bactéria tem despertado interesse por ser o principal microrganismo responsável pela biolixiviação de metais. *A. ferrooxidans* é resistente a altas concentrações de metais como alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio (Brierley, 1978; Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). Esta característica peculiar tem estimulado vários estudos genéticos envolvendo este microrganismo. As bases genéticas da resistência a metais em *A. ferrooxidans* ainda são pouco conhecidas, com exceção da resistência ao mercúrio, cujos genes envolvidos foram clonados e sequenciados por Shiratori *et al.*, (1989) e arsênio cujos genes foram clonados e sequenciados por Butcher *et al.*, (2000).

A contaminação do meio ambiente por metais, em particular por metais pesados (densidade $\geq 5 \text{ g/cm}^3$), e seu efeito tóxico em uma grande variedade de organismos vem sendo relatado (Trevors *et al.*, 1986; Silver, 1996). Vários microrganismos têm se adaptado à presença constante de metais no meio ambiente desenvolvendo assim, mecanismos de resistência (Bruins *et al.*, 2000).

Alguns metais como cobalto, cobre, níquel são utilizados pelos microrganismos como micronutrientes servindo também como estabilizadores de moléculas através de interações eletrostáticas, como componentes de várias enzimas e como reguladores da pressão osmótica (Bruins *et al.*, 2000). Contudo, a maioria dos metais não são essenciais. Estes metais são potencialmente tóxicos interagindo com os componentes celulares através de ligações iônicas e covalentes (Bruins *et al.*, 2000). Quando presentes em altas concentrações, tanto os metais essenciais quanto os não essenciais, podem causar danos na membrana celular, alterar a especificidade das enzimas, causar alterações nas funções celulares e causar lesões na estrutura do DNA (Bruins *et al.*, 2000).

O cádmio por exemplo, é um metal não essencial que em altas concentrações torna-se extremamente tóxico para diversos organismos. Na biosfera ele é encontrado na concentração aproximada de 0,01 a 1,8 ppm (Bruins *et al.*, 2000). Este metal pode entrar

no meio ambiente através da refinação do zinco, combustão do carvão, fertilizantes, pesticidas e outros (Trevors *et al.*, 1986; Nies, 1992).

Neste capítulo, são apresentados os resultados da identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente na presença de cádmio em *A. ferrooxidans*. Os cinco genes que apresentaram os maiores coeficientes de similaridade, com seqüências presentes em bancos de dados, foram selecionados para análise da expressão em diferentes concentrações de cádmio através de *Slot blot* de RNA. A presença ou ausência destes genes em outras espécies de bactérias foi verificado através de experimentos de *Southern blot*.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Linhagens de bactérias

A linhagem de *A. ferrooxidans* utilizada nos experimentos de RAP-PCR e *Slot blot* de RNA foi a LR. Esta linhagem foi isolada pelo Dr. O. Garcia Jr., UNESP – Araraquara, de efluente ácido de coluna de lixiviação de minério de urânio em Lagoa Real, Bahia. Esta linhagem foi selecionada por apresentar resistência elevada a altas concentrações de metal (Novo *et al.*, 2000).

Nos experimentos de *Southern blot*, para investigação da presença ou ausência de algumas bandas de RAP-PCR em outras linhagens e espécies de bactérias, foram utilizadas: *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP, *A. thiooxidans* ATCC 19377^T e DAMS; *E. coli* ATCC 25922^T. As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho, bem como sua procedência, estão apresentadas na Tabela 1 do Capítulo I.

2.2. Crescimento das linhagens

O meio de cultura utilizado para o crescimento das linhagens de *A. ferrooxidans* foi o T&K líquido (Tuovinen & Kelly, 1972), com pequenas modificações. A composição e o modo de preparo deste meio são descritos a seguir:

Solução A: K_2HPO_41,0 g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$1,0 g
 $(NH_4)_2SO_4$1,0 g
 água destilada.....q.s.p. 1000 ml

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

Solução B: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$167 g
 água destilada.....q.s.p. 500 ml

O pH foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado e a solução foi esterelizada por filtração em membrana (Millipore - 0,45 μ m).

Após o resfriamento da solução A, o meio foi preparado através da mistura das soluções A e B na proporção de 4:1 (A e B, respectivamente).

O meio utilizado para o crescimento das linhagens de *A. thiooxidans* foi o meio líquido T&K descrito acima, sendo que a solução B de sulfato ferroso foi substituída por enxofre (1g/100 ml de meio), o qual foi esterilizado separadamente a 110°C por 20-30 min. O meio de cultura utilizado para *E. coli* foi o LB (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3. Crescimento na presença de metal e obtenção de massa celular

Para os experimentos de RAP-PCR e *Slot blot* de DNA, a linhagem LR foi inoculada (5 a 10 % v/v) em meio T&K contendo 60 mM de sulfato de cádmio. A bactéria foi inoculada também em meio sem metal (controle). Para os experimentos de *Slot blot* de RNA a linhagem foi inoculada em meio contendo 0, 10, 30 e 60 mM de sulfato de cádmio. Para o isolamento de DNA as diferentes linhagens de bactéria foram inoculadas em meio sem metal. As linhagens de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* foram inoculadas em 600 ml de meio e incubadas a 30°C, 300 rpm. Após o crescimento, as culturas foram filtradas em papel de filtro comum e as células foram coletadas através de filtração em membrana Millipore (0,45 μ m). As células foram lavadas e armazenadas a

-70°C. A linhagem de *E. coli* foi inoculada em 2 ml de meio LB e incubada a 37°C, 300 rpm, durante a noite. As células foram coletadas por centrifugação.

2.4. RAP-PCR

Os experimentos de RAP-PCR foram realizados segundo metodologia descrita por Welsh *et al.*, (1992) e Wong & McClelland (1994), com modificações. A metodologia utilizada no isolamento de RNA foi a descrita por Winderickx & Castro (1994), com modificações. Estas metodologias estão descritas em detalhes nos Materiais e Métodos do Capítulo I. Uma representação esquemática, da estratégia utilizada na identificação de genes expressos diferencialmente na presença de cádmio é mostrada na Figura 1.

2.5. Confirmação da expressão diferencial através de *Slot blot* de DNA

A confirmação da expressão diferencial das bandas isoladas através de RAP-PCR foi realizada através de *Slot blot* de DNA. Os experimentos de *Slot blot* de DNA foram realizados segundo metodologia descrita por Mou *et al.*, (1994) e Xu *et al.*, (1997), com modificações. Para isto, 10 ng de DNA das bandas de RAP-PCR foram diluídas separadamente em TE (volume final 200 µl) e desnaturado a 95°C por 10 min. A seguir, as amostras foram misturas com 200 µl de SSC 20 x e transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham) da maneira descrita nos Materiais e Métodos do Capítulo I. As membranas foram hibridizadas com aproximadamente 30 ng de cDNA total sintetizado a partir de RNA isolado de células crescidas na ausência e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. As condições de hibridização e lavagem das membranas estão descritas no Capítulo I. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os sinais de hibridização obtidos para cada banda foram quantificados através da utilização do programa CrazyQuant v. 1,3 e a análise dos dados foi realizada segundo Gill *et al.* (1999), com modificações, como descrito no Capítulo I.

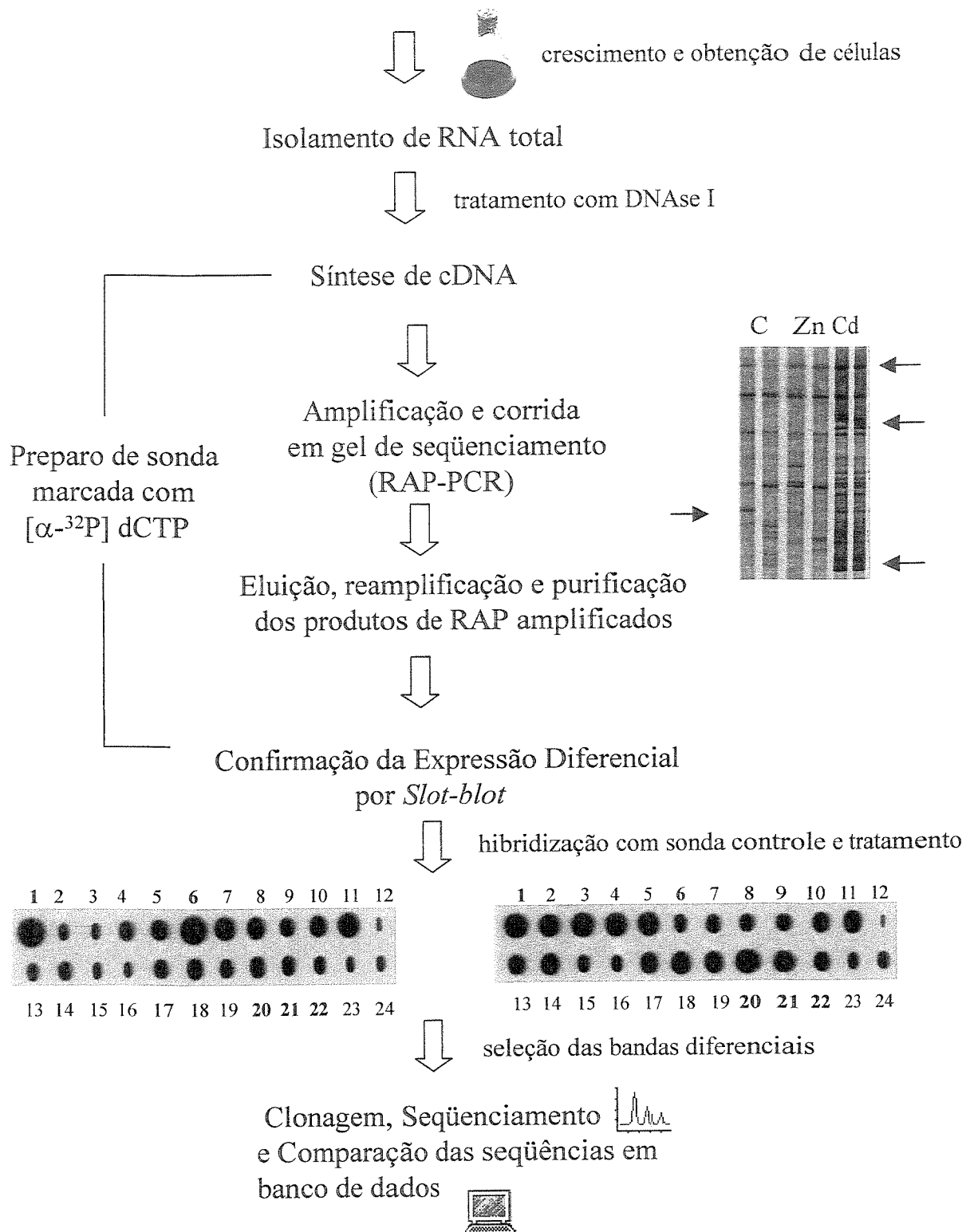


Fig. 1. Representação esquemática da estratégia utilizada para a identificação das bandas diferenciais isoladas na presença de metal.

2.6. Clonagem e seqüenciamento das bandas diferenciais

Dentre todas as bandas cuja expressão diferencial foi confirmada pelo método de *Slot blot*, foram selecionadas para clonagem, seqüenciamento e análises posteriores aquelas que apresentaram os 10 maiores (bandas induzidas pelo metal) e os 10 menores (bandas reprimidas pelo metal) coeficientes de indução (CI). As amostras foram amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T *Easy* (Promega), seguindo-se as especificações do fabricante. Os clones foram seqüenciados em um seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados utilizando-se o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>), função BLASTX 2.1.1.

2.7. *Slot blot* de RNA

Algumas bandas de RAP-PCR, cuja seqüência apresentou homologia com seqüências disponíveis em bancos de dados, foram selecionadas para análise da expressão na presença de outras concentrações de sulfato de cádmio: 0, 10, 30 e 60 mM. Os experimentos de *Slot blot* de RNA foram realizados segundo metodologia descrita por Fleming *et al.*, (1998), com modificações. Assim sendo, 3 µg de RNA isolado de células da linhagem LR crescidas na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de sulfato de cádmio foram transferidos para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham) e hidridizados com sondas radioativas obtidas a partir das bandas de RAP-PCR: 17F03Cd, 17J04Cd, 5J06Cd e 20J04Cd (induzidas por cádmio) e 1J05C (reprimida por cádmio), seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para zinco no Capítulo 1. As membranas foram expostas a filmes de raio-X para visualização dos resultados. A intensidade dos sinais obtidos foram quantificados com o programa CrazyQuant v. 1,3 e os resultados foram apresentados em porcentagens. A quantidade de RNA nas membranas foi normalizada através de hibridização com o gene de rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR.

2.8. Análise das bandas de RAP-PCR através de *Southern blot*

Cinco µg de DNA genômico isolado como descrito por Goss *et al.*, (1990) com modificações e digerido com *Bam*H I e *Hind* III, foram transferidos para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham) e hidridizados com as bandas de RAP-PCR: 17F03Cd, 17J04Cd, 5J06Cd e 20J04Cd (induzidas por cádmio) e 1J05C (reprimida por cádmio), marcadas com radioatividade. Nestes experimentos foram analisadas as linhagens apresentadas na Tabela 1 do Capítulo I. As membranas foram expostas a filmes de raio-X para a visualização dos resultados.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. Isolamento através de RAP-PCR de genes expressos diferencialmente na presença de 60 mM de sulfato de cádmio

A. ferrooxidans é uma bactéria altamente resistente a elevadas concentrações de metais (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). Contudo, até o momento o(s) gene(s) e o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resistência a metal são pouco conhecidos.

Os métodos de *fingerprinting* de RNA, como RAP-PCR e *display* diferencial de mRNA, vem sendo muito utilizados no isolamento de genes expressos diferencialmente em diversos organismos (Wong & McClelland, 1994; Gong *et al.*, 1996; Thies *et al.*, 1998; Shepard & Gilmore, 1999). A utilização de *Slot blot* ou *Dot blot* na confirmação da expressão diferencial de genes também vem sendo amplamente utilizado (Chuang *et al.*, 1993; Mou *et al.*, 1994; Gill *et al.*, 1999).

Para a realização dos experimentos de RAP-PCR, células de *A. ferrooxidans* LR foram crescidas na ausência e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. Foi observado, que o período de crescimento da linhagem em meio sem metal e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio aumentou, de 48 h para 96 h, indicando que este metal provocava um estresse sobre as células.

O RNA obtido das células crescidas na presença e ausência de 60 mM de sulfato de cádmio, foi utilizado nos experimentos de RAP-PCR. Para a síntese de cDNA foi

utilizado o kit *ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham pharmacia). Foram utilizados nos experimentos 6 *primers* arbitrários (Tabela 1) que resultaram no isolamento de um total de 107 bandas diferenciais, sendo 22 bandas isoladas na ausência e 85 na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. Experimentos de *display* diferencial de mRNA e RAP-PCR realizados por outros integrantes do laboratório, sem a utilização das *beads*, resultaram no isolamento de um número muito menor de bandas diferenciais. Assim sendo, optamos pela utilização do kit em nossos experimentos.

Um exemplo dos *fingerprintings* de RNA, obtidos com o *primer* OPJ06 é apresentado na Figura 2A. Algumas das bandas diferenciais observadas estão indicadas na Figura 2A por setas.

Dos 6 *primers* utilizados nos experimentos de RAP-PCR, os que resultaram no isolamento de um maior número de bandas foram: OPJ06 (34 bandas diferenciais), OPF03 (23 bandas) e OPJ04 (22 bandas). Foram isoladas 12 bandas diferenciais com cada um dos *primers* OPJ05 e OPJ08. Com o *primer* OPJ01 foram isoladas 4 bandas diferenciais (Tabela 1). A expressão diferencial destas bandas foi confirmada através de *Slot blot* de DNA.

3.2. Confirmação e análise da expressão diferencial das bandas de RAP-PCR

A expressão diferencial, das bandas isoladas nos experimentos de RAP-PCR, foi confirmada através de *Slot blot* de DNA. Para isto, 10 ng de DNA das bandas diferenciais foram transferidos para membranas de nylon com o auxílio de um *Slot blot*. As membranas foram hibridizadas com sondas de cDNAs obtidos a partir de RNA de células crescidas na ausência e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. Os sinais de hibridização obtidos foram quantificados, como descrito em Materiais e Métodos, do Capítulo I. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Inicialmente, foi proposto o método de *Northern blot* para a confirmação da expressão diferencial. Entretanto, devido ao grande número de bandas diferenciais isoladas (107), nos experimentos de RAP-PCR, optamos pela utilização de *Slot blot* de DNA, pois este método permite a confirmação da expressão diferencial de um grande número de bandas de uma só vez (Xu *et al.*, 1997).

A Figura 2 (B a F) mostra um exemplo dos resultados das hibridizações das membranas de *Slot blot* e as análises realizadas para a confirmação ou não da expressão diferencial das bandas de RAP-PCR. As Figuras 2B e 2C mostram as bandas diferenciais isoladas na ausência (1, 6, 7, 8, 9 e 11) e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio (2, 3, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 e 32). Estas bandas, obtidas com o *primer* OPJ-06, foram hibridizadas com cDNAs sintetizados a partir de RNA de células crescidas na ausência (Figura 2B) e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio (Figura 2C). As médias, entre as repetições dos sinais de hibridização de cada banda, são mostradas na Figura 2D. Os dados mostrados na Figura 2D foram normalizados e comparados para a realização da análise de dispersão (Figura 2E). Como mostra a Figura 2E, a maioria das bandas obtidas com o *primer* OPJ-06, ficou acima da reta normal e foram consideradas diferenciais na presença de cádmio. Estas bandas representam genes induzidos pelo metal. Algumas dessas bandas estão indicadas na Figura 2E (2, 3, 4, 5 e 20). Por outro lado, as bandas 1, 6, 7, 8 e 11, isoladas na ausência de metal, ficaram posicionadas abaixo da reta normal confirmando a sua expressão diferencial. Essas bandas representam genes reprimidos na presença de cádmio. As bandas que ficaram próximas ou na reta normal são aquelas cuja expressão diferencial não foi confirmada. Algumas dessas bandas (9, 10, 12 e 26) estão indicadas no gráfico da Figura 2E. Duas bandas isoladas de cádmio (27 e 28) ficaram situadas abaixo da reta normal (Figura 2E). Essas bandas foram descartadas por apresentarem um comportamento anômalo. Se a expressão diferencial dessas bandas fosse confirmada ou não, esperaria-se que elas ficassem acima ou sobre a reta normal, respectivamente.

Os dados mostrados na Figura 2E foram utilizados no cálculo dos coeficientes de indução (Figura 2F). As bandas que apresentaram os maiores coeficientes de indução foram a 2 e 3. O coeficiente de indução dessas bandas foi acima de 2 (2,54 e 2,28, respectivamente). Dentre as bandas reprimidas pelo metal, expressão mais acentuada no controle, a que apresentou menor coeficiente de indução (0,34) foi a 6.

A Tabela 1 apresenta um resumo do número de bandas de RAP-PCR que tiveram a expressão diferencial confirmada por *Slot blot* de DNA. Como pode ser observado nesta tabela, um grande número de bandas de RAP-PCR tiveram a expressão diferencial confirmada nos experimentos de *Slot blot* de DNA. De um total de 107 bandas

diferenciais analisadas, 62 (58%) foram confirmadas como sendo diferencialmente expressas. Das 62 bandas cuja expressão diferencial foi confirmada, 16 foram isoladas na ausência de metal e 46 na presença (Tabela 1).

As bandas cuja expressão diferencial não foi confirmada são falsos positivos. A ocorrência desse tipo de banda em experimentos de RAP-PCR e *display* diferencial de mRNA é amplamente documentado na literatura (Liang *et al.*, 1993, 1995; Callard *et al.*, 1994; Liang & Pardee, 1995; Zhao *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 1998).

É a primeira vez que uma grande quantidade de cDNAs, expressos diferencialmente na presença de cádmio, são isolados em *A. ferrooxidans*.

3.3. Clonagem e seqüenciamento das bandas isoladas por RAP-PCR

Em virtude do grande número de bandas com expressão diferencial confirmada pelo método de *Slot-blot* com os diferentes *primers* utilizados nos experimentos de RAP-PCR (Tabela 1), foram selecionadas, para clonagem e seqüenciamento, as 10 bandas que apresentaram os maiores (genes induzidos por metal) e as 10 bandas que apresentaram os menores coeficientes de indução (CI) (genes reprimidos). Foram selecionadas apenas as bandas que apresentaram um coeficiente de indução acima de 2,0 no caso das bandas induzidas por metal e um número abaixo de 1,0 para as bandas reprimidas por metal. Estas bandas foram clonadas no vetor pGEM-T *easy* (Promega). Foram seqüenciados pelo menos 3 clones de cada banda, para confirmação das seqüências obtidas. As seqüências foram comparadas com as disponíveis em bancos de dados com o auxílio do algoritmo BLAST, função BLASTX. As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados das análises das seqüências das bandas de RAP-PCR induzidas e reprimidas por cádmio, respectivamente. Três bandas reprimidas por cádmio apresentaram seqüências idênticas restando assim, um total de 7 bandas (Tabela 3).

Como pode ser visto nas tabelas o tamanho das bandas variaram de 206 a 684 pb. Na tabela 2 pode-se observar que, dentre todas as bandas induzidas por metal analisadas, as que apresentaram os maiores tamanhos foram isoladas com o *primers* OPJ06 e OPJ04. Os valores dos coeficientes de indução destas bandas variaram de 3,75 a 2,13.

Entre as bandas isoladas na ausência de metal, foram obtidos os maiores tamanhos com os *primers* OPJ06, OPJ05 e OPJ01 (Tabela 3). Com estes mesmos *primers* foram obtidos os menores coeficientes de indução (Tabela 3).

Das 10 bandas induzidas por cádmio, 8 apresentaram silmilaridade com seqüências encontradas em bancos de dados (Tabela 2). Entre as 7 bandas reprimidas por cádmio, 3 apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados (Tabela 3).

A banda 16F03Cd apresentou similaridade de 67% com uma provável transposase B de *A. ferrooxidans* (Oppon *et al.*, 1998) (Tabela 3). Este gene faz parte do transposon Tn5468 de *A. ferrooxidans* que é similar ao transposon Tn7 descrito para *E. coli* (Oppon *et al.*, 1998). A banda 17J04Cd, de 555 pb, também apresentou similaridade (74%) com uma transposase de *A. ferrooxidans*.

A banda 17F03Cd apresentou similaridade de 77% com uma ribonuclease III de *E. coli* (Tabela 3). O gene da ribonuclease III foi isolado de *E. coli* por March *et al.*, (1985). A ribonuclease III está envolvida no processamento de precursores de rRNA e mRNA.

A banda 18F03Cd apresentou similaridade de 60% com o transposon Tn5053 de uma linhagem de *Xanthomonas* isolada de mina de mercúrio (Tabela 3). Este transposon possui o operon *mer* responsável pela conversão de íons tóxicos de mercúrio para formas menos tóxicas (Kholodii *et al.*, 1993). Lee *et al.*, (2001) clonaram um fragmento cromossômico de uma linhagem de *Pseudomonas putida* que era responsável pela resistência a cádmio. A análise da seqüência do fragmento revelou que um dos genes, *cadR*, apresentava similaridade com a família MerR que controlam a destoxificação ao mercúrio. A banda 5J06Cd apresentou similaridade de 86% com o gene *nif* A de *Rhodobacter capsulatus*, uma bactéria fixadora de nitrogênio (Masepohl *et al.*, 1988) (Tabela 3). Estes autores encontraram duas cópias deste gene no genoma da bactéria. Estes genes fazem parte de um sistema que regula a fixação de nitrogênio. O fragmento 20J04Cd apresentou similaridade de 68% com uma putativo oligossarídeo transferase transmembrana de *Pyrococcus abyssi* (submissão direta).

O fragmento 23J04Cd apresentou similaridade de 58% com um provável componente do sistema ABC de transporte ligado a ATP em *Pseudomonas aeruginosa*

(Stover *et al.*, 2000) (Tabela 3). A banda 24J04Cd apresentou similaridade com o mesmo componente ABC ligado a ATP de *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996).

Das 7 bandas reprimidas por cádmio, 3 apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados. O fragmento 4J08C apresentou similaridade de 56% com uma proteína hipotética de *Carnorhabditis elegans* (Submissão direta). A banda 2J01C apresentou 93% e a banda 1J05C apresentou 100%, de similaridade com o gene *resB* e com uma proteína putativa precursora do citocromo-c1, respectivamente, ambas isoladas de *A. ferrooxidans* (Cabrejos *et al.*, 1999).

3.4. Análise das bandas de RAP-PCR em presença de outras concentrações de cádmio

Algumas bandas induzidas (17F03Cd, 17J04Cd, 5J06Cd e 20J04Cd) e reprimida (1J05C) por cádmio tiveram a expressão analisada na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de cádmio (Figura 3 e 4), estas bandas foram escolhidas, pois apresentaram os maiores coeficientes de similaridade. Para isto, 3 µg de RNA isolados de células crescidas na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de sulfato de cádmio foram transferidos para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham) e hibridizados com as bandas de RAP-PCR selecionadas, marcadas com radioatividade.

As bandas 17F03Cd, 17J04Cd e 20J04Cd, isoladas na presença de 60 mM de cádmio, apresentaram uma expressão mais acentuada em 10 mM de sulfato de cádmio (Figura 3A e B e 4A). A expressão destas bandas diminuiu na presença de 30 mM de sulfato de cádmio e tornou a aumentar na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. A banda 5J06Cd, induzida por cádmio, apresentou um aumento progressivo da expressão na presença de 0, 10, 30 e 60 mM de sulfato de cádmio (Figura 3C). A banda 1J05C, reprimida por cádmio, apresentou uma diminuição da expressão na presença de 10 mM de sulfato de cádmio (Figura 4B). Esta expressão aumentou na presença de 30 mM e tornou a diminuir na presença de 60 mM de sulfato de cádmio. Contudo, a expressão na ausência do metal foi, como esperado, maior do que em qualquer concentração de cádmio utilizada.

3.5. Análise das bandas de RAP-PCR através de *Southern blot*

As bandas utilizadas nos experimentos de *Slot blot* de RNA foram utilizadas como sonda em hibridizações com o DNA genômico, digerido com *Bam*H I e *Hind* III, das linhagens: *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, LR, FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP; *A. thiooxidans* ATCC 19377^T e DAMS e *E. coli* ATCC 25922. As bandas 20J04Cd e 1J05C hibridizaram somente com o DNA das 3 linhagens de *A. ferrooxidans* (Figura 6A e B). A banda 17F03Cd hibridizou com o DNA das 3 linhagens de *A. ferrooxidans* e com *Acidithiobacillus* sp. SSP (Paulino *et al.*, no prelo) (Figura 5A). Já as bandas 17J04Cd e 5J05Cd hibridizaram com o DNA das 3 linhagens de *A. ferrooxidans* e com *A. thiooxidans* DAMS (Figura 5B e C). A banda 17J04Cd hibridizou também com a linhagem de *A. thiooxidans* ATCC 19377^T (Figura 5B).

Tabela 1. Número de bandas diferenciais confirmadas nos experimentos de *Slot blot* de DNA

<i>Primer</i>	Total de bandas analisadas	Total de bandas confirmadas		Total de bandas confirmadas
		Controle	Cd 60 mM	
OPJ-01	4	2	0	2
OPJ-04	22	1	8	9
OPJ-05	12	2	7	9
OPJ-06	34	6	22	28
OPJ-08	12	5	0	5
OPF-03	23	0	9	9
Total	107	16	46	62

Tabela 2. Análise dos produtos de RAP-PCR induzidos por metal em resposta a cádmio

Produto de RAP-PCR	Primer	Tamanho (bp)	Coefficiente de indução	Similaridade (número de acesso)	Porcentagem de similaridade
16F03Cd	OPF-03	360	3,75	Provável transposase B de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (T45495)	67%
17F03Cd	OPF-03	337	2,90	Ribonuclease III de <i>Escherichia coli</i> (P05797)	77%
17J04Cd	OPJ-04	555	2,81	Proteína semelhante a transposase de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (AAC80182)	74%
5J06Cd	OPJ-06	684	2,54	gene <i>nif</i> A de <i>Rhodobacter capsulatus</i> (P08544)	86%
23J04Cd	OPJ-04	225	2,44	Provável componente do transporte ABC ligado a ATP <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AAG06407)	58%
24J04Cd	OPJ-04	228	2,27	Componente Putativo do transporte ABC ligado a ATP de <i>Streptomyces coelicolor</i> (CAB56127)	58%
20J04Cd	OPJ-04	235	2,28	Putativo Oligosacarídeo transferase transmembrana <i>Pyrococcus abyssi</i> (CAB50367)	68%
18F03Cd	OPF-03	360	2,18	Transposon Tn5053 de <i>Xanthomonas sp</i> (S70152)	60%
26J04Cd	OPJ-04	206	2,21	Sem similaridade	-
15J05Cd	OPJ-05	281	2,13	Sem similaridade	-

Tabela 3. Análise dos produtos de RAP-PCR reprimidos por metal em resposta a cádmio

Produto de RAP-PCR	Primer	Tamanho (bp)	Coefficiente de indução	Similaridade (número de acesso)	Porcentagem de similaridade
3J08C	OPJ-08	375	0,76	Sem similaridade	-
5J08C	OPJ-08	330	0,60	Sem similaridade	-
4J08C	OPJ-08	333	0,58	Proteína hipotética de <i>Caenorhabditis elegans</i> (T20486)	56%
9J06C	OPJ-06	602	0,34	Sem similaridade	-
1J05C	OPJ-05	592	0,31	Putativo precursor do citocromo c1 de <i>Acithiobacillus ferrooxidans</i> (AF220499)	100%
1J01C	OPJ-01	565	0,24	Sem similaridade	-
2J01C	OPJ-01	595	0,24	Putativo gene <i>res B</i> de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (AAC68692)	93%

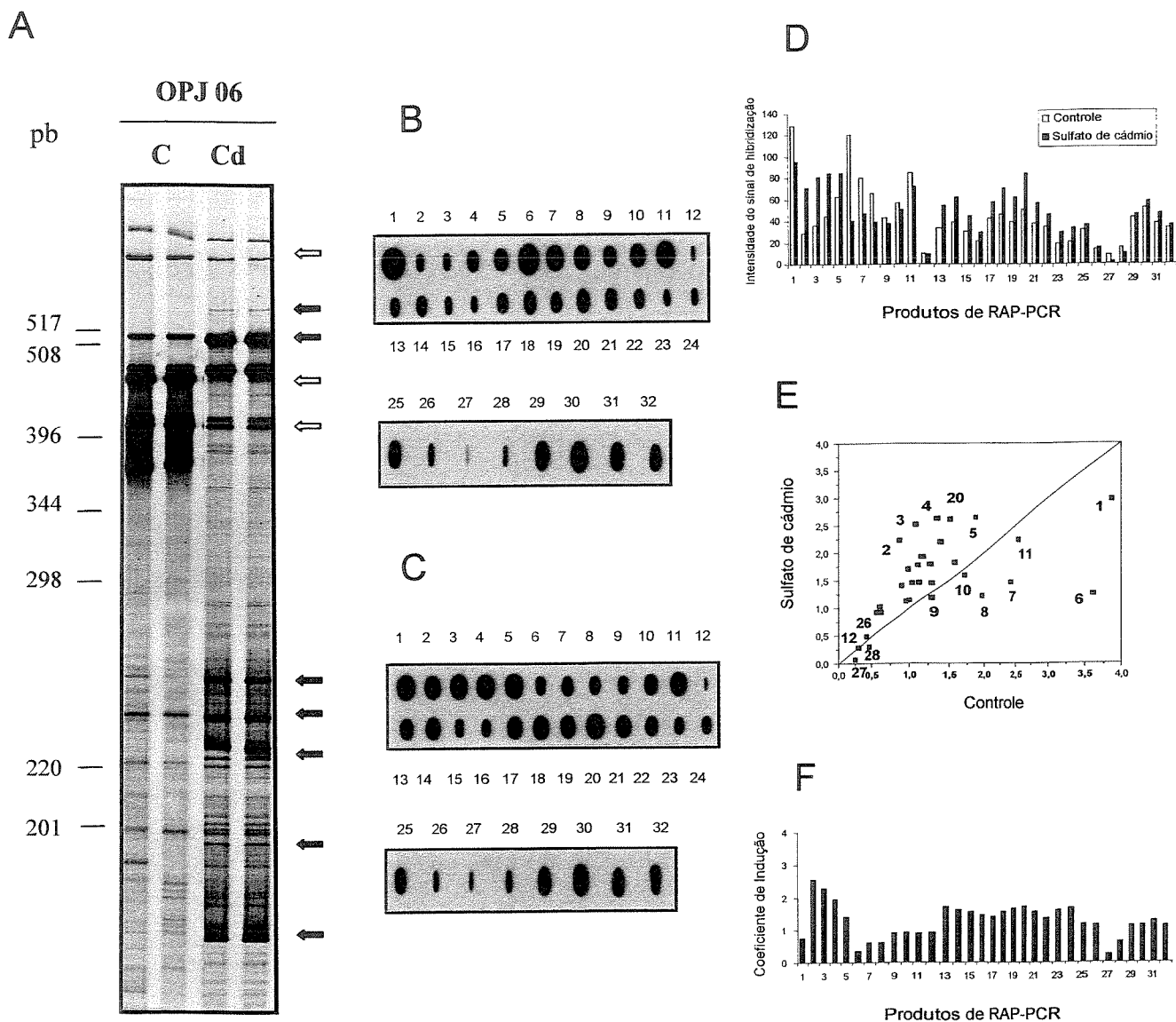


Fig. 2. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* LR tratadas ou não com 60 mM de sulfato de cádmio e confirmação da expressão diferencial por *Slot-blot* de DNA das bandas isoladas. No experimento de RAP-PCR (A) foi utilizado o *primer* arbitrário OPJ-06 (Operon). Algumas das bandas diferenciais estão indicadas na figura por uma seta. As setas em preto indicam as bandas induzidas na presença do metal e as em branco as bandas reprimidas pelo metal. (B) amostras hibridizadas com a sonda de cDNA obtido na ausência e (C) presença de 60 mM de sulfato de cádmio. (D) Histograma representativo da intensidade do sinal de hibridização. (E) Análise de dispersão dos dados mostrados em (D), algumas destas bandas são mostradas na figura. (F) Coeficiente de indução dos produtos de RAP-PCR testados.

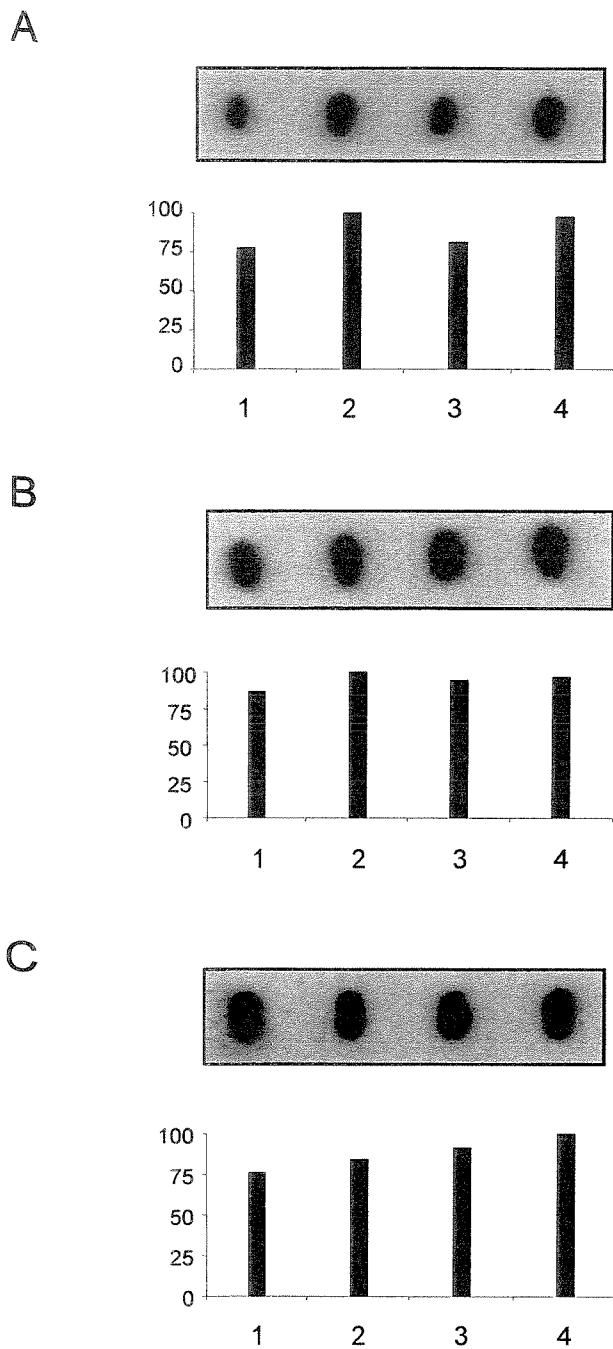


Fig. 3. Hibridização do *Slot blot* de RNA. Três μ g de RNA de células crescidas na presença de 0 (1), 10 (2), 30 (3) e 60 (4) mM de sulfato de cádmio foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 17F03Cd, (B) 17J04Cd e (C) 5J06Cd, marcadas com radioatividade.

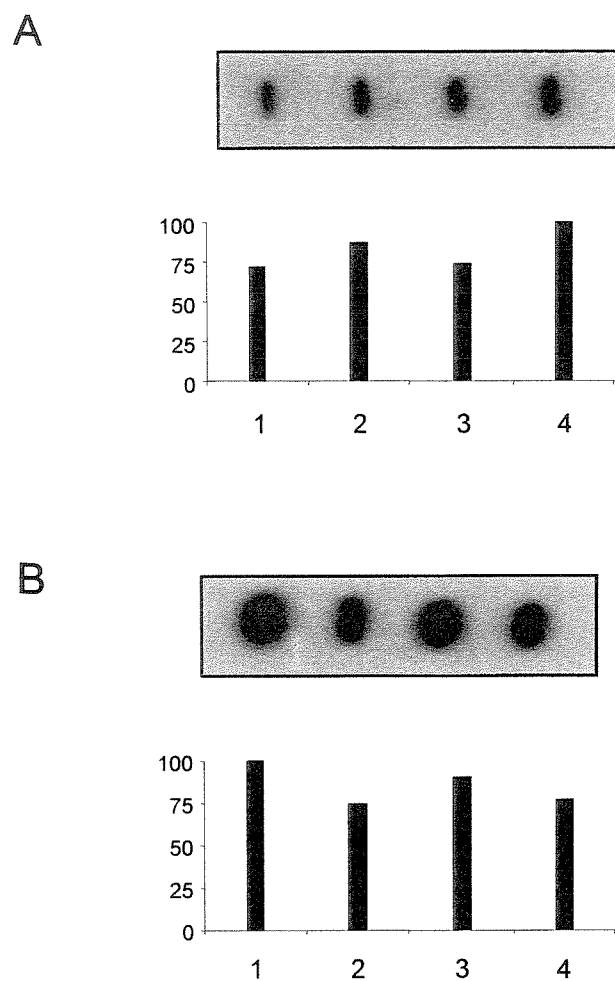


Fig. 4. Hibridização do *Slot blot* de RNA. Três μ g de RNA de células crescidas na presença de 0 (1), 10 (2), 30 (3) e 60 (4) mM de sulfato de cádmio foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 20J04Cd e (B) 1J05C, marcadas com radioatividade.

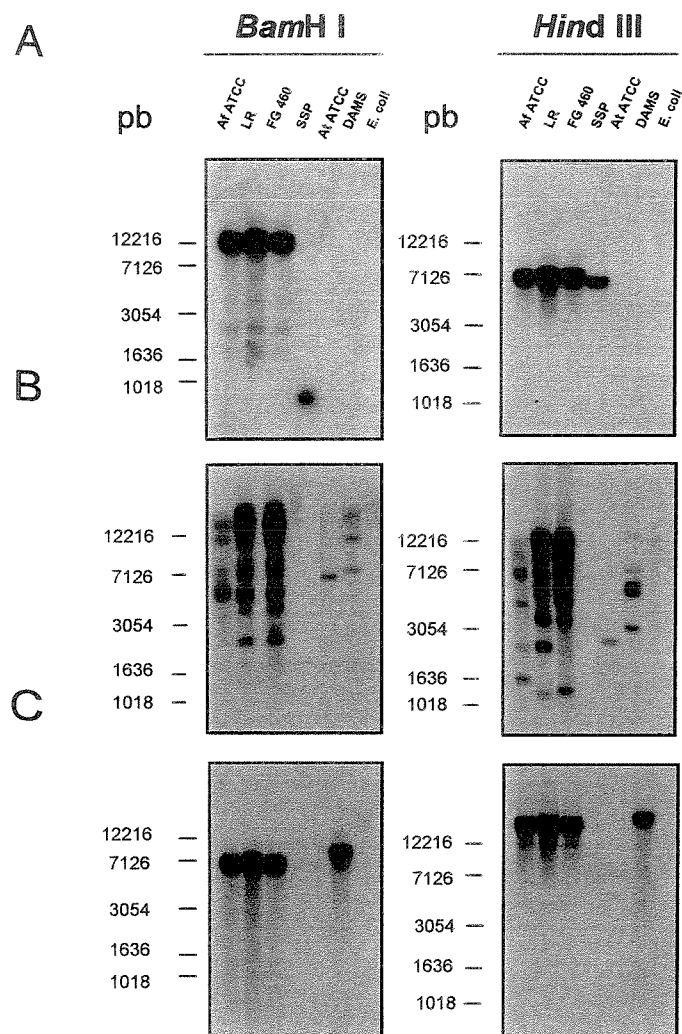


Fig. 5. Hibridização do Southern blot. Cinco μ g de DNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP; *A. thiooxidans* ATCC 19377^T e *A. thiooxidans* DAMS e *E. coli* ATCC 25922^T foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 17F03Cd, (B) 17J04Cd e (C) 5J06Cd, marcadas com radioatividade.

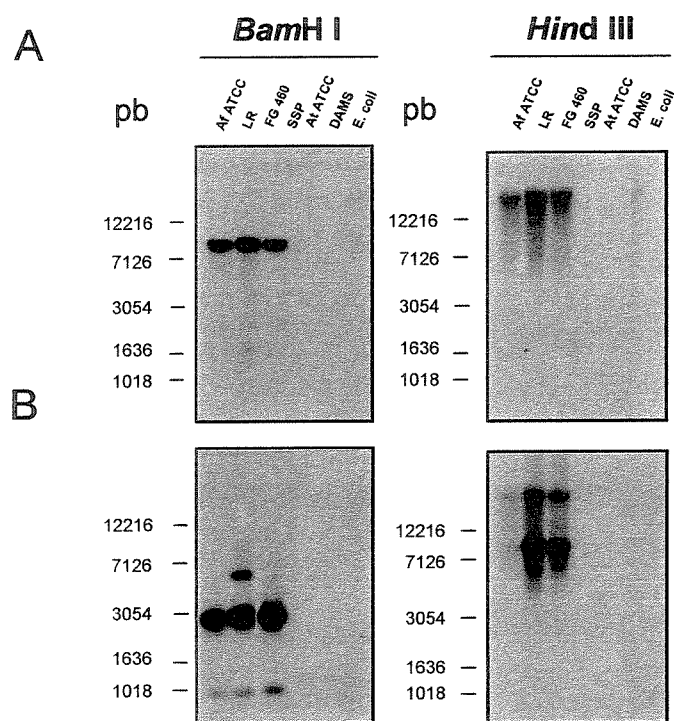


Fig. 6. Hibridização do *Southern blot*. Cinco μ g de DNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, *A. ferrooxidans* LR, *A. ferrooxidans* FG460; *Acidithiobacillus* sp. SSP; *A. thiooxidans* ATCC 19377^T e *A. thiooxidans* DAMS e *E. coli* ATCC 25922^T foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 20J04Cd e (B) 1J05C, marcadas com radioatividade.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brieley, C.L. (1978). Bacterial leaching. *Critical Review of Microbiology*, **6**: 207-262.
- Butcher, B.G., Deane, S.M., and 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*. *Appl. Environ. Microbiology*, **66**: 1826-1833.
- Bruins, M.R.; Kapil, S., Oehme, and F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**:198-207.
- Cabrejos, M.E., Zhao, H.L., Guacucano, M., Bueno, S., Levican, G., Garcia, E., Jedlicki, E. and Holmes, D.S. (1999). ISTI insertional inactivation of the *resB* gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol.* **175**:223-229
- Callard, D., Lescure, B., and Mazzolini, L. (1994). A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques*, **16**: 1098-1103.
- Chuang, S.E., Daniels, D. L., and Blattner, F.R. (1993). Global regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **175**: 2026-2036.
- Fleming, J.T., Yao, W.H., and Saylor, G.S. (1998). Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3698-3706.
- Gill, R.T., Valdes, J.J., and Bentley, W.E. (1999). Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 5386-5393.
- Gong, T.W., Hegeman, A.D., Shin, J.J., Adler, H.J., Raphael, Y., and Lomax, M.I. (1996). Identification of genes expressed after noise exposure in the chick basilar papilla. *Hear Res.*, **96**: 20-32.
- Goss, T.J., O'hara, G.W., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R. (1990). Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. *J. Bacteriol.*, **172**: 5173-5179.

- Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brieley, J.A., and Brieley, C.L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, **40**: 311-336.
- Kholodii, G.Ya., Yurieva, O.V., Lomovskaya, O.L., Gorlenko, Zh. M., Mindlin, S.Z. and Nikiforov, V.G. (1993). Tn5053, a Mercury Resistance Transposon with Integron's Ends. *J. Mol. Biol.*, **230**:1103-1107
- Lee, S.W., Glickmann, E. and Cooksey, D.A. (2001). Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1437-1444.
- Liang, P., Averboukh, L., and Pardee, A.B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 3269-3275.
- Liang, P and Pardee, A.B. (1995). Recent Advances In Differential Display. *Curr. Opin. Immunol.*; **7**: 274-280.
- Liang, P., Bauer, D., Averboukh, L., Warthoe, P., Rohrwild, M., Muller, H., Strauss, M., and Pardee, A.B. (1995). Analysis Of Altered Gene Expression By Differential Display. *Methods Enzymol.*, **254**: 304-321.
- Lundgren, D.G. and Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **34**: 263-283.
- March, P.E., Ahn, J. and Inouye, M. (1985) The DNA sequence of gene (*rnc*) encoding ribonuclease III of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 4677-4685.
- Masepohl, B., Klipp, Werner and Pühler. (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.*, **212**: 27-37.
- Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E., and Chalifour, L. (1994). Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**: 564-569.
- Nies, D. H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*, **27**: 17-28.
- Novo, M.T.M., Silva, A.C., Moreto, R., Cabral, P.C.P., Costacurta, A., Garcia Jr., O., and Ottoboni, L.M.M. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other

- heavy metals: growth, protein synthesis and phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**(2): 187-195.
- Oppon, J.C., Sarnovsky, R.J., Craig, N.L. and Rawlings, D.E. (1998) A *tn7*-like transposon is present in the *glmUS* region of the obligately chemoautolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **180**(11): 3007-3012.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A. Cullum, J., Kinashi, H., and Hopwood, D.A. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**(1), 77-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shepard, B.D. and Gilmore, M.S. (1999). Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 1470-1476.
- Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., and Kitagawa, Y. (1989). Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**: 3458-3464.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., and Paulsen, I.T. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**(6799): 959-964.
- Silver, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. *Gene*, **179**: 9-19.
- Thies, F.L., Hartung, H.P., and Giegerich, G. (1998). Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* *lon* gene detected by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Microbiol. Lett.*, **165**: 329-334.
- Trevors, J.T., Stratton, G.W., and Gadd, G.M. (1986). Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* **32**: 447-464
- Tuovinen, O.H. and Kelly, D.P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. *Z. Allg. Mikrobiologie*, **12**: 311-346.

- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M. (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Research*, **20**: 4965-4970.
- Winderickx, J. and Castro, J.M. (1994). *Practical course in molecular biology of microorganisms*. Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February 11, pp. 59.
- Wong, K.K. and McClelland, M. (1994). Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**: 639- 643.
- Xu, N., Johns, B., Pullman, G., and 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 Mol. Biol. Reporter* **15**: 377-391.
- Zhao, S., Ooi, S.L., Yang, F.C., and Pardee, A.B. (1996). Three methods for identification of true positive cloned cDNA fragment in differential display. *Biotechniques*, **20**: 400-404.

APÊNDICE

Sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cádmio em *A. ferrooxidans*

As sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR apresentados nas tabelas 2 e 3 estão relacionados abaixo:

Sequências nucleotídicas obtidas na presença de 60 mM de sulfato de cádmio

> 16F03Cd

```

1 CCTGATCACC GGA CTGTATG TGGGGCTTGA AGGACCGAGC TGGTTAGGTG CGATGATGGC
61 GTTAGCTAAT GCGGCAAGCG ATAAAAAGGC GTTTTGCAGC AAATATGGAA TCTCCATATC
121 GGATGAGGAC TGGCCGTGCA AGAATCTTCC TATGGAGATC CTTGCGGATC GCGGCGAATT
181 ACTGAGTAGG CACGCCGATG AATTGACAGA TTCGTTAAAC ATTACGGTGG CGAATGCGCC
241 GCCCTTTCGT GCCGACTGGA AGGGTATAGT GGAGCAGCAG TTCCGAATTG CCAATGAACG
301 AGTGATCCAT TGGGTACCTG GGGCCGTGCG GCGTGTGCGA AGAAAACGTG GTGATCAGGA

```

> 17F03Cd

```

1 CCTGATCACC GTCAGTTATG ACAAGATCGT GCCATTGGTT GGCAATGTCA GTTTGTTACT
61 GCATTTTGAC GCCGCAGGGC ATTGAAAATC TTTTAGGTAT ATGATGCAGT TCTTCTTCCC
121 ATTTTAAATG CCTGAGTCGA TGC GTTTATG GATGTTTTAG AATCTCTGCA ACAGTCGGTC
181 GGCTATCAAT TCCGTGAGCA GTCCCTGCTG TTGCAGGCGC TGACCCATCG AAGTCGGGGC
241 GCGCGGCACA ATGAACGGCT GGAGTTTCTG GGGGACGCGG CACTGAATTT TGTAGTAGCG
301 GCAAACTCT TCGCCCGCTT TCCAAGGTG ATCAGGA

```

> 17J04Cd

```

1 CCGAACACGG ACGGCATCGT AGCTTTGCCT GGTGCCACCA GGACGGCACT CCCTACTCAG
61 AGTGCCGGGA CTACGATTCA TGATCCTGGA CAAGGCTCTC AAGCTCTGCC CAGCATTCAG
121 TCCTCTCTGC AGCTGATTCC GCTCATCCAC ACTCAACTGA TGGTACCTTT CGCCCATATT
181 CCACCACCTC CGGCCCCATT GGACCATAGG TGTGCACTT CATTCTTGAG CGCGCCATGC
241 CATCAATTGT ACCACGATAT GTGTTTAAAT GGCTTGGGCA AACGTTTGTA CCGTTATCCC
301 ACAATGATAC GGCTAAAGTC CTAAGATCTG AAGCCTCATT ATTTACTTCA AAGAGAACTT
421 TTGAATGGCT CTTGTCGGA TTGAGTGGGT AGGGGGTAGA ATGCTGTGGA GCAGTTGCGT
481 CCCGAATAGG AGTTAGCTGA TGGTCCCAGA AGATCTGTTT TCTCTCGCGT TAGGGTTGGT
541 ACCGCCGTGT TCGGA

```

> 5J06Cd

```

1 TCGTTCCGCA AACATGTGAA AAATGATGGA ACATTTACCG GCGCCGATAT TGGCGAGGTG
61 ATTGTTACCA AAGGCGATAT CGGTTTTATC ATCAGTATCG GCACCTACTT GCAGCAATTT
121 TATATTTATG GTGTGGATTT TTATGAGCGT GGTCACTGCG TCGGCATGAA GGGCCGTGAA
181 CTGGATCTGA TCGAAAGCAA TCCGGTTCAG GAGGAGAGAA TCCCATGATG GATTTACGTC
241 TACCCCGATT TGATTGGGGC CTAACGGTAC GGGCTTGC GA TGATATTTT AATGACGGGA
301 CTTATCCTGG GGAGGCCGAA GGGGCCCTGC TGGTAGCCAA GGACAGTCCG GGAGAAATCG
361 TGCGGGTAGG ACATCACGAA GAGGGCAACA TGCCGCTCTA CCTCGTGGAA GTTTGCCAAT

```

```

421 GGCATGGGTG GTCGGTTGCC TGGAAAGAGGA AATTCTACCC GTCGAAGGGC AAGAAGCCAT
481 GAACATGACG CGCAGCATTT ATCTCGATAA CAATGCGACA ACGGCCTTGG CGCCGGCGGC
541 ACTTGGACGC TATGCTACCC TATTTATCCA CGGGAATATG CCAATCCTTT CAGCGCCTCC
601 GCAGCGGGTG TAAGTGTCAA GAAAGCGTTG GGTGAGGCGC GGGTCGCGGT GGCCAAGTTG
661 TTGGGCTCCT CACCTGCGGA ACGA

```

> 23J04cd

```

1 CCGAACACGG GACAATGCAG AGAAGATTCC AGGTGGTCCA TCGCAAGAT ATTGGCCCCG
61 CAAGCCTCCA CGAACGCAGC GTCATGGCTC GCAAACAGCG CCAAACCCTC CAGACCACGT
121 AACCTGATGC GCTGGGCTAG GATTTCTCGG GCATGGTTGT CCAGCCCATTT GCTCGGCTCA
181 TCCAGCAGCA TCACCTGCGG GTCGCCGATC CAGGCCGTGT TCGGA

```

> 24J04cd

```

1 CCGAACACGG GAATTCGATT CGGCGACCCG CAGGTGATGC TGCTGGAGGA GCCGAGCAAT
61 GGGCTGGACA ACCATGCCCC AGAAATCCTA GCCCAGCGCA TCAGGTTACG TGGTCTGGAG
121 GGTTCGGCGC TGTTTGCGAG CCATGACGCT GCGTTCGTGG AGGCTTGCGG GGCCAATATC
181 TTGCGGATGG ACCACCTGGA ATCTTCTCTG CATTGTCCCG TGTTCGGA

```

> 20J04cd

```

1 CCGAACACGG GACACATCGA ACAGCGCAGC CGCAGAAAAG GGGAGAAGCC ACAGAAAGTC
61 GTGGTGTCTT GGCTTTAACC ATATAAAATA TAGATGGAGC GCTATTTTGC CACCAAAATC
121 CTTATATGGT CACATACTCC TCAGAACTCT ATTGACCGAT CCATATTTTC TTCTGAGGTT
181 GTCGGCACAA AACTAAGAC CAACATCAGA AGCTAGATTT TTGGCCGTGT TCGGA

```

> 18F03cd

```

1 CCTGATCACC ACGTTCTCTT GCGACACGCC GCACGGCCCC AGGTACCCAA TGGATCACTC
61 GTTCATTGGC AATTCGGAAC TGCTGCTCCA CTATACCCCT CCAGTCGGCA CGAAAGGGCG
121 GCGCATTCGC CACCGTAATG TTTAACGAAT CTGTCAATTC ATCGGCGTGC CTACTCAGTA
181 ATTCGCCGCG ATCCGCAAGG ATCTCCATAG GAAGATTCTT GCACGGCCAG TCCTCATCCG
241 ATATGGAGAT TCCATATTTG CTGCAAAACG CCTTTTATC GCTTGCCGCA TTAGCTAATG
301 CCATCATCGC ACCTAACCAG CTCGGTCCTT CAAGCCCCAC ATACAGTCCG GTGATCAGGA

```

> 26J04cd

```

1 CCGAACACGG GAACCAAATA AATGACGAAC AACTTAAACA AATAAGTGCA GGTATAAATA
61 AATAATCACA AAGGATCTAA AAAATAAAGA GACTTAAAT ATACAATATA TGATTAATG
121 TAGGAGGGCG GGTGCTTCGG TAGGTTGTGG TGCTAAGGTG AGTGGAAGGG CAAAGAAGGG
181 AGGAGTAGGC ATAAGGCCGT GTTCGG

```

> 15J05cd

```

1 CTCCATGGGG GGGGCTATTA TGGAGGAAGG GGAGAAGGAT GGCATCACGG TGAAGATCAC
61 TGATTGCAAC GGTCTGGTGT CAATGCATCA ATGATGGCTG TCAAATATTG TTGACGTATA
121 TTTTGGTAT AGGTGGAATC ATATGAGAAA AAAACTGGCC ATGATGCCGT TGGTCATCCT
181 CGGGCTGACG TTTTCCGTTG CCCAGGATGG ATTTGCTGAC CACAGGGAAT ATGCTGATCA
241 TTAATATACG AAGTATCCGG CTTACTATGG CCCCATGGAG A

```

Sequências nucleotídicas obtidas na ausência de 60 mM de sulfato de cádmio

> 3J08C

```

1  CATACCGTGG CTTTAGGTAA TGTTAATTAG TTGCTGTCGC ATCAGAGAGA GTCATGTTCA
61  GCGTAGTTGG GTTTTGTTTG GTCTCCAGT CCTCGTGACG ATACTTACTC TCTATCTACT
121 TACGTTTTTCG TGTATTGTGT GGTTCTCTTG TTGTCTGCTT GACTTTTTTT TAGCATTTCC
181 ATTAGTGTAT GGTCTCGCTA TTGGTGCCGT GTTTCTTTTT CTATGGATAC TGCATGTTTA
241 CTCGGTTTTTG ATGTTTTTTT TGGGAGTTTT TCTTTCCTTC AGGGGTGGAT TTGTTGTTGC
301 TTATAGTCGG ATTTTCGTTA GTTCCCCCA CATGTTGCTT GGTCTTTTTT GTTATTCCC
361 TGGTCCCACG GTATG

```

> 5J08C

```

1  CATACCGTGG GCAAGGACCA GGGACTCCAT CCCTTTGCGG GACAAACCAG TAAAAAATAA
61  AACTAAATTG TAATAACTAA ACTAGCTAAA ACTTAAAGA TTATCCTAAA AAAATAAAAA
121 TAACAAAAAA AATAAAGATC TAAACTAAA TATTTAGGCA TAAACAACCTC TTTAAGAAAG
181 AAAAAACCTA ATAATAAATG TATAATTATA AAAAAACATT TTTGAATAAT GTAACGAAAT
241 AATAAACTAA TTAGAAGTTA TTTAAATAAT AAAAATCAAT TTGATAATCT TTATAAACTA
301 AGAAAAATTA TTTGGTAGTC CACGGTATGA

```

> 4J08C

```

1  CATACCGTGG ATGAAAACAA GGACCAAGAT AGTGGGTACA GCAAACATAG GGGTAGAGAA
61  GGTAAACAG AAGGAAGGAA TCGGGGAGGA AGCCCATACA TAAGAAAGAT TTTAGATTAA
121 CAAAAGAACT TACTTATTTA AACTAAAAAA GATAAAAGTA AAGAATATGG ACTAATAAAG
181 AATAATCATA TACATGAGAG TAACTCCGTC CATAAGTAGA CAGAAAATAT ATAGAACCAA
241 CAGATATAAA AAACACAAGG AAACGAGATA CTCCAAGAAA AAAACTTACT CAAAACAATA
301 AAAGACGCTT ATAATATGAA CACCACGGTA TGA

```

> 9J06C

```

1  TCGTTCCGCA CGACTACTAT AGGGCGAATT GGGCCCGACG TCGCATGCTC CCGGCCGCCA
61  TGGCGGCCGC GGAATTCGA TTCAATGCGC CGTCCAGTC TCTCGCCTAT TTTGGCAAGG
121 CGGTGAAGAC CTTCCGGAGT GGCACCTTCA GCCTTGGCGG CTATGTCGAC AGTTCGCGCG
181 AGTTCAGGCC CAATTTTATA CCGGTTACCC CGATACAGGG CATCACCACC CAGGGCCTGA
241 ACGCCAATGC GCCTTTGTAT AGCCAACAGA CCAGCGGGTT TTACGCATCA CTGCCTGAGT
301 CCATCTGGTT TAAGCAATTG AAAGTGCAAG GCTACATGCT GTACTCCAAG CTGAACCTCC
361 GCCTCAGAGG GGACCGTCAC GCTGCACGAA ATGGCCTGGG TATCGCCATG GCCACCGGGT
421 GCATTACCGC ATCACCACCT TTGTACCAGG AAGCAGCGTA AATTCCCGAG GTATTACAAC
481 CCGAGCTCGG ATCTTAATGG GGACAAAGCT TGTATTTTGA CTGGCGCCTG CCTATGAACC
541 TCGTGAAGGC GGAAGGGTA TTGGGGATTC ATCAGCAATA CACCACACCT TATGCGGAAC
601 GA

```

> 1J05C

```

1  CTCCATGGGG CGGTACGGTT GGGTCAAAGG GGCAAGTAAT TTTTCCCGGA AGACTTTCTC
61  CTGCCAAGTA TCACCAAAAT GTTGCGAGAT TCGTGGCGTT CCTTCGGTAC GCCTCGGATC
121 CTTCGTATTT TACAAGAATG GCTATCGGCC CATATGTCAT TGGCATAATG GTACTATTCA
181 CCATTCCTTG TTTATTTTCTC AAGACAGCAT ATTGGATTGA TCTGAAGAAA AAACGTAGTA
241 ATACCCATAC AAAGGGCTAG TGGTTCCTA CCTGTTGTAT GCCGGGCATG AAGATGGCCC
301 GCCTGACCAG CGCGTTTTTA GGGGTCTGGC GGGTTTTTCG ACATGAACGC GCGGTGTTAG
361 TTTGCCCGG TGTGGGCTCG CTATGCTCCG TCGCCAACAA CGTTGCGCGG TAAAGAGATA
421 TGATTTATTA GTGGGTGGTA ACATATTGAT ATAATGATGA GTGCTGATGC CGATGTCGAG
481 GATGCTGCGT TCTCGCCAAA GCGGAACCTC CAGCGCCTGA CAGGGTCTCA TTCCAGGGAT
541 CTTCGGGGCG GCTCCGGGAG ATCGCGATGC AGGGCTTGAT TGCCCATGG AG

```

> 1J01c

```

1 CCCGGCATAA AAAACAAAAT AGAAAAACGAA AAAATAAAGA ACTAGCAAAA CAAAAAGACA
61 AATCGAAAAG AATAAAACAA TAAAATGAAA AAGGAAGAAA ACGTAAAAAT AGAAAAAGGG
121 ACAACGAGAA ACAGACAAAA TGCAAAAAAA GGAGAAGTAA AGCAGAAATT AAAACAAATT
181 GGCTAAAAAA CACAACGAAA AAAGAAAGCA ACAAAATAAA AAGAAACGAA CTAAACCATA
241 AATAAGAAAT AAAATAAAAC AAAACCTAAA AAAAAAGAAA CGGAAGAAAT CAACTATAAA
301 AAATAAGAA GATAGAAGAT TTAAAGGAGT ATAAAAAAA AAACCAAAA TTAAAAAAA
361 AAATTTGAAC AAAAAAAGG AAAAAAAAC AAAAAACGA ACGATAAAC TGATAAAAA
421 AAAGACGGGC AAAAAAGAA CAACACATAA AAAACACTCC TTTCGAACAA ATCGGAAAGA
481 GAAAATTGAA CTTAGTTAAA CCGCTCATAG AGGAGGGGGT TTTCCGGGG AAGGATTGGC
541 ATCTCAATGG ATGGTAGGTC ATGCC

```

> 2J01c

```

1 CCCGGCATAA TCGATAGCCT ATAAAGCTTA CAAAAGAAAA AAAGAAAACG AAAA ACTATA
61 GTCATAAAAA AAAAAAGAG GAAAAAAAAA AAAGAAATAA AAATAGAAAT CTAAGATAAA
121 ATATTAAAA CGAGAAAAAA TTAAGACTAT ACTAACAAAA ACAACAAAA TGAAGGATGA
181 GGCTATGAGT TAAGAAAGCA CAATTAAGAA GTAACAAAA GACTGTACAA CAATCAATAT
241 CAAAAGAAAT AAATCTCGTA AACTTGATAA TAGAAAAAGA GAGCAAAAAG TGCAGGGGAA
301 GTAGAAATAT AACCAATATA AACTCAGGAA AGCTATAAGT AGTAGAACTA AAAACGAGC
361 ATAGAAAAAC ACCGAAAAAA AAGGGACTAC CAACAGGGAG AAATGGGTGT TTAGTAAAT
421 AATAATAGGA TTGGGGGGGG TCCCTCGGCA AATACAATAG GGAAATGCC CCAACCGGAA
481 TTTGGCCGGG TGGGTCTTG GGTACGATCC CGCGAGGGAT GGTGAATAAT ACGAAAATGT
541 TCTCGCCATT AGCCATCCAG TCCGCAAGTA ACATGGTGGT AGCAGTTATG CCGGG

```

**Caracterização dos produtos de RAP-PCR
isolados em resposta a cádmio e zinco na
linhagem FG460 e na linhagem LR submetida
a outros fatores de estresse**

Capítulo III

1. INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria não patogênica, Gram-negativa, que obtém energia através da oxidação de compostos reduzidos de enxofre (Leduc & Ferroni, 1994). Os estudos fisiológicos e bioquímicos referentes a essa espécie têm se intensificado pelo fato da bactéria ser um dos microrganismos responsáveis pela lixiviação bacteriana de metais, ou biolixiviação. *A. ferrooxidans* possui também importância ambiental, pois pode ser utilizada na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995)

Uma característica interessante de *A. ferrooxidans* é a sua resistência a diversos metais pesados, como por exemplo cobre, zinco, arsênio e urânio (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994).

Além de metais pesados, o efeito de pH e temperatura têm sido estudado em *A. ferrooxidans* (Suzuki *et al.*, 1999; Modak *et al.*, 1996). Lombardi & Garcia (1999) analisaram alterações do pH e da temperatura em *A. ferrooxidans* verificando que estes dois fatores afetavam tanto o crescimento quanto a solubilização dos metais, pela bactéria, durante o processo de biolixiviação. O fato da biolixiviação ocorrer muitas vezes em pH e temperatura acima das condições ótimas de crescimento de *A. ferrooxidans* (Modak *et al.*, 1996) faz com que o estudo da expressão gênica nestas condições seja interessante já que os resultados podem contribuir para obtenção de linhagens de *A. ferrooxidans* mais adequadas para biolixiviação.

Neste capítulo, estão sendo apresentados os resultados da caracterização da expressão dos produtos de RAP-PCR, selecionados nos Capítulo I e II, em condições de estresse de temperatura e pH e em outra linhagem de *A. ferrooxidans*, FG460, crescida na presença de 60 mM de sulfato cádmio e 600 mM de sulfato de zinco.

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1. Linhagens de bactérias e condições de crescimento

As linhagens de *A. ferrooxidans* LR e FG460 foram utilizadas nos experimentos, de comparação da expressão gênica, por serem linhagens que apresentaram resistência elevada a metais pesados. A procedência destas linhagens está descrita na Tabela 1 do Capítulo I. A linhagem LR foi cultivada na presença de outro metal, sulfato de cobre (200 mM), sob estresse de temperatura, 37°C (a condição ótima de cultivo é 30°C), em meio T&K com pH 2,5 (o pH ideal é 1,8). A linhagem foi cultivada também, em condições controle. A massa celular obtida foi utilizada para o isolamento de RNA. A linhagem FG460 foi cultivada na ausência (controle) e na presença de 60 mM de sulfato de cádmio e 600 mM de sulfato de zinco. A massa celular obtida foi utilizada no isolamento de RNA.

2.2. Isolamento de RNA e transferência para membranas de nylon

O RNA foi isolado de células da linhagem LR e FG460 de acordo com a metodologia descrita por Winderickx & Castro (1994), como descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo I. Após tratamento com DNase (Sambrook *et al.*, 1989), o RNA foi quantificado e 3 µg do RNA de cada amostra foram transferidos, em duplicata, para membranas de nylon com o auxílio de um *Slot blot* (Capítulo I).

2.3. Hibridização das membranas

As membranas foram hibridizadas com as bandas de RAP-PCR isoladas dos experimentos com 600 mM de sulfato de zinco: 7F03Zn, 7J04Zn e 6J04Zn (induzidas pelo metal) e 13J06C, 16J06C e 7J06C (reprimidos pelo metal). As membranas foram hibridizadas também, com as bandas 1J05C (reprimido pelo metal) e 17J04Cd, 20J04Cd, 17F03Cd e 5J06Cd (induzidas pelo metal), isoladas dos experimentos de RAP-PCR com

60 mM de sulfato de cádmio. As condições de hibridização foram as mesmas descritas nos experimentos de *Slot blot* de RNA do Capítulo I.

2.4. Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de *Slot blot* de RNA

A intensidade dos sinais de hibridização obtidos foi quantificada utilizando-se o programa CrazyQuant v. 1,3 e os resultados foram expressos na forma de porcentagem. A quantidade de RNA nas membranas foi normalizada através de hibridização com o gene de rDNA 16S de *A. ferrooxidans* LR.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1. Análise do padrão de expressão das bandas diferenciais induzidas e reprimidas por 600 mM de sulfato de zinco em outras condições de estresse e na linhagem FG460

Como mostra a Figura 1, duas bandas induzidas por zinco, 7F03Zn e 7J04Zn apresentaram expressão mais acentuada na presença de 200 mM de sulfato de cobre (figura 1B e C). A banda 7F03Zn apresentou similaridade com o gene *tnsB* do transposon Tn7 e 7J04Zn apresentou baixa similaridade com uma proteína hipotética de *Deinococcus radiodurans* (Capítulo I). Aparentemente a expressão destes dois genes, 7F03Zn e 7J04Zn, é mais induzida em *A. ferrooxidans* LR na presença de metal do que em outras situações de estresse. A outra banda de RAP-PCR induzida por zinco testada, 6J04Zn, apresentou expressão mais acentuada na presença de estresse a temperatura (37°C) (Figura 1A). No entanto, a expressão desta banda foi mais acentuada na presença de 200 mM de sulfato de cobre do que no controle (ausência de metal) indicando que este gene também é induzido na presença de cobre. Este gene também é induzido por aumento no pH (Figura 1A). Os resultados obtidos indicam que o gene 6J04Zn pode desempenhar um papel importante em situações de estresse em *A. ferrooxidans* LR.

Todas as bandas induzidas por 600 mM de sulfato de zinco apresentaram expressão mais acentuada na linhagem FG460 tratada com 600 mM de zinco (Figura 5). A expressão na presença de 60 mM de sulfato de cádmio foi menor do que no controle (ausência de metal) para todas as bandas testadas (Figura 5).

A Figura 2 mostra as hibridizações com as bandas de RAP-PCR reprimidas por 600 mM de sulfato de zinco (13J06C, 16J06C e 7J06C). Duas bandas, 13J06C e 16J06C, apresentaram expressão mais acentuada no controle do que nas diferentes situações de estresse (Figura 2A e B). A banda 7J06C apresentou expressão mais acentuada no controle do que nos estresse a temperatura (37°C) e 200 mM de sulfato de cobre (Figura 2C). Já no caso do estresse ao pH, a expressão desta banda foi mais acentuada em pH 2,5 (Figura 2C, amostra 4) do que no controle (Figura 2C, amostra 3), indicando que a expressão do gene é induzida na presença de estresse ao pH, apesar de ser reprimida por metal.

Todas as bandas reprimidas por 600 mM de sulfato de zinco apresentaram expressão mais acentuada na linhagem FG460 na ausência de metal (Figura 6). A expressão na presença de 60 mM de sulfato de cádmio foi menor do que no controle (ausência de metal) para todas as bandas testadas (Figura 6).

3.2. Análise do padrão de expressão das bandas diferenciais induzidas e reprimidas por 60 mM de sulfato de cádmio em outras condições de estresse e na linhagem FG460

Devido a grande quantidade de produtos de RAP-PCR que apresentaram similaridade com seqüências depositadas em banco de dados, tivemos que optar pela escolha (baseada na porcentagem de similaridade apresentada, Tabela 2 e 3 do Capítulo II) de algumas dessas seqüências para análise da expressão em outras situações de estresse e na linhagem FG460. Assim sendo, foram escolhidas as bandas: 1J05C, reprimida por metal, e 17J04Cd, 20J04Cd, 17F03Cd e 5J06Cd, induzidas por 60 mM de sulfato de cádmio.

As Figuras 3 e 4 mostram os sinais de hibridização das bandas utilizadas com o RNA controle de temperatura e metal (amostra 1), RNA de células cultivadas a 37°C (amostra 2), RNA de células cultivadas na presença de 200 mM de cobre (amostra 5),

RNA controle de pH (amostra 3) e RNA de células cultivadas em pH 2,5 (amostra 4). A razão do experimento de pH ter seu próprio controle é que a composição do meio T&K tem que ser alterada (a quantidade de fosfato no meio tem que ser diminuída) para não ocorrer precipitação em pH 2,5.

Como mostra a Figura 3A e B, as bandas 17J04Cd e 20J04Cd hibridizaram de maneira mais acentuada na presença de todos os estresses testados do que nos controles indicando, que estes genes são induzidos por estresse de uma maneira geral. As outras duas bandas induzidas por cádmio, 17F03Cd e 5J06Cd (Figura 3C e 4B), apresentaram expressão mais acentuada na presença de cobre e pH, apesar da diferença entre o controle e pH 2,5 ser pequena. Estas duas bandas apresentaram repressão da expressão a 37°C (Figura 3C e 4B). A banda reprimida por cádmio, 1J05C (Figura 4A), apresentou diminuição da expressão na presença de todos os fatores de estresse testados, indicando que este gene é reprimido por estresse de uma maneira geral.

As bandas 17F03Cd e 20J04Cd, induzidas por cádmio na linhagem LR, também apresentaram expressão mais acentuada na presença de 60 mM de sulfato de cádmio na linhagem FG460 (Figura 7A e B). A expressão da banda 17F03Cd na linhagem FG460 foi menor na presença de 600 mM de sulfato de zinco do que no controle (Figura 7A). As outras duas bandas induzidas por cádmio na linhagem LR, 17J04Cd (Figura 7C) e 5J06Cd (Figura 8B), apresentaram expressão mais acentuada no controle da linhagem FG460 do que na presença de cádmio e zinco. Comportamento semelhante, ao das bandas 17J04Cd e 5J06Cd foi observado para banda 1J05C, reprimida por cádmio na linhagem LR (Figura 8A).

O ajuste correto das condições de pH e temperatura são condições essenciais que influenciam no processo de biolixiviação (Bosecker, 1997). O efeito de fatores de estresse como pH e temperatura mais elevados que as condições ótimas de crescimento da bactéria, têm sido estudado em *A. ferrooxidans*. Amaro *et al.* (1991) cultivaram bactérias em pH 1,5 e 3,5. A análise do perfil eletroforético de proteínas demonstrou um aumento da síntese de várias proteínas quando as bactérias eram transferidas de uma condição de cultivo para outra, comprovando que a alteração do pH de cultivo promove alteração da síntese de proteínas. Hubert *et al.* (1995) e Jerez (1988) observaram a

expressão diferencial de proteínas em resposta a elevação de temperatura em linhagens de *A. ferrooxidans*.

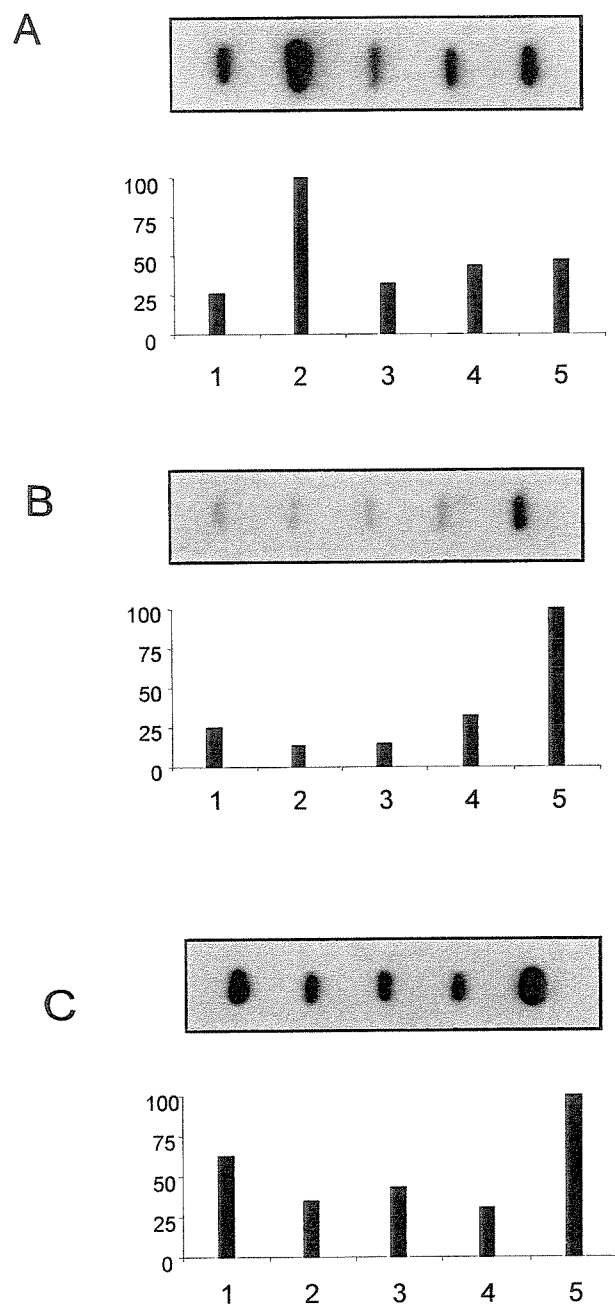


Fig. 1. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* LR crescida sob várias condições de estresse: ausência de metal (1), 37°C (2), controle pH (3), pH 2,5 (4) e 200 mM (5) de sulfato de cobre. Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 6J04Zn, (B) 7F03Zn e (C) 7J04Zn, marcadas com radioatividade.

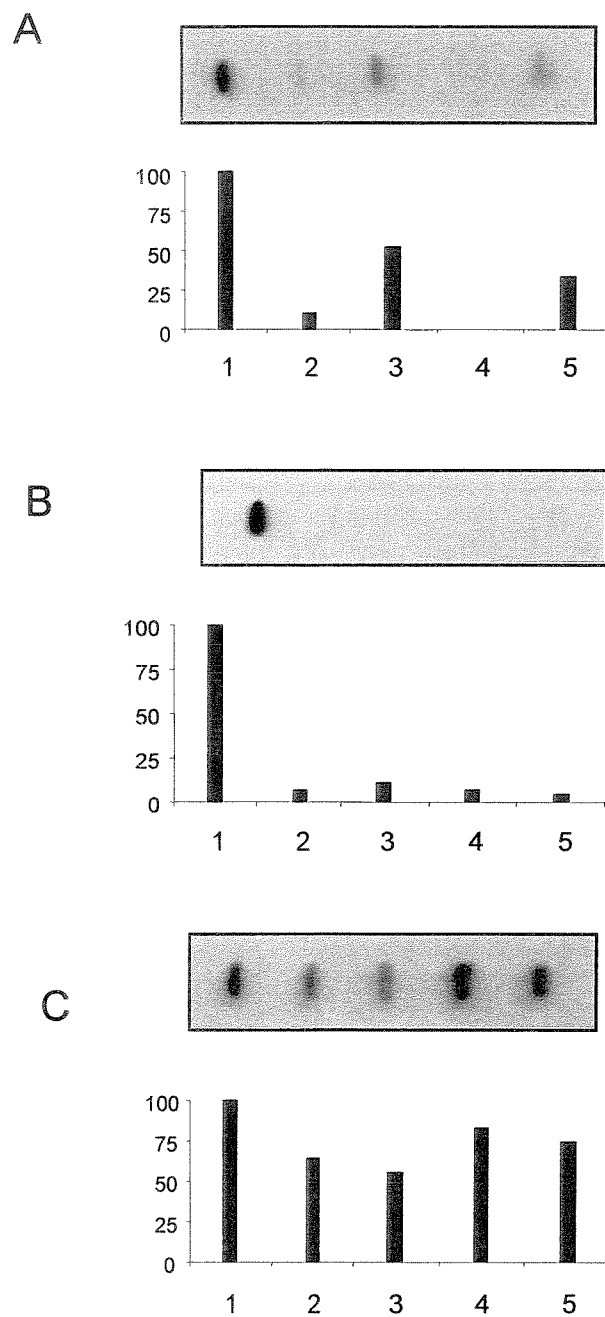


Fig. 2. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* LR crescida sob várias condições de estresse: ausência de metal (1), 37°C (2), controle pH (3) pH 2,5 (4) e 200 mM (5) de sulfato de cobre. Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 13J06C, (B) 16J06C e (C) 7J06C, marcadas com radioatividade.

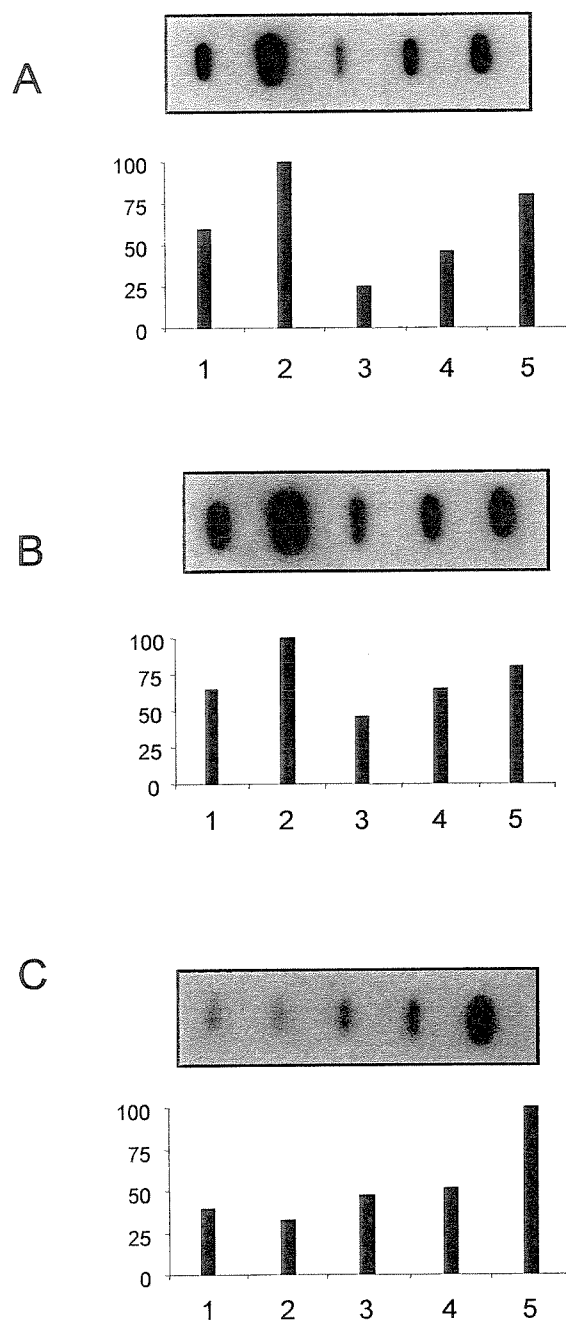


Fig. 3. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* LR crescida sob várias condições de estresse: ausência de metal (1), 37°C (2), controle pH (3) pH 2,5 (4) e 200 mM (5) de sulfato de cobre. Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 17J04Cd, (B) 20J04Cd e (C) 17F03Cd, marcadas com radioatividade.

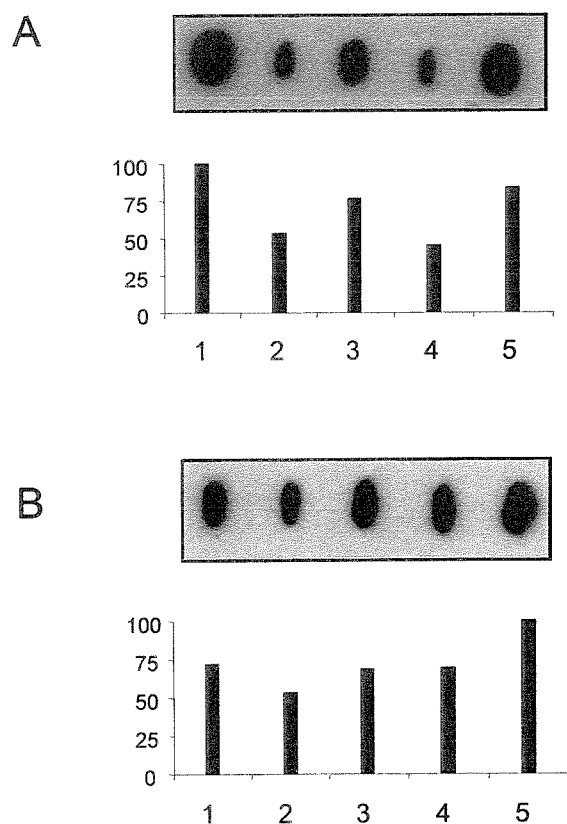


Fig. 4. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* LR crescida sob várias condições de estresse: ausência de metal (1), 37°C (2), controle pH (3) pH 2,5 (4) e 200 mM (5) de sulfato de cobre. Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 1J05C e (B) 5J06Cd, marcadas com radioatividade.

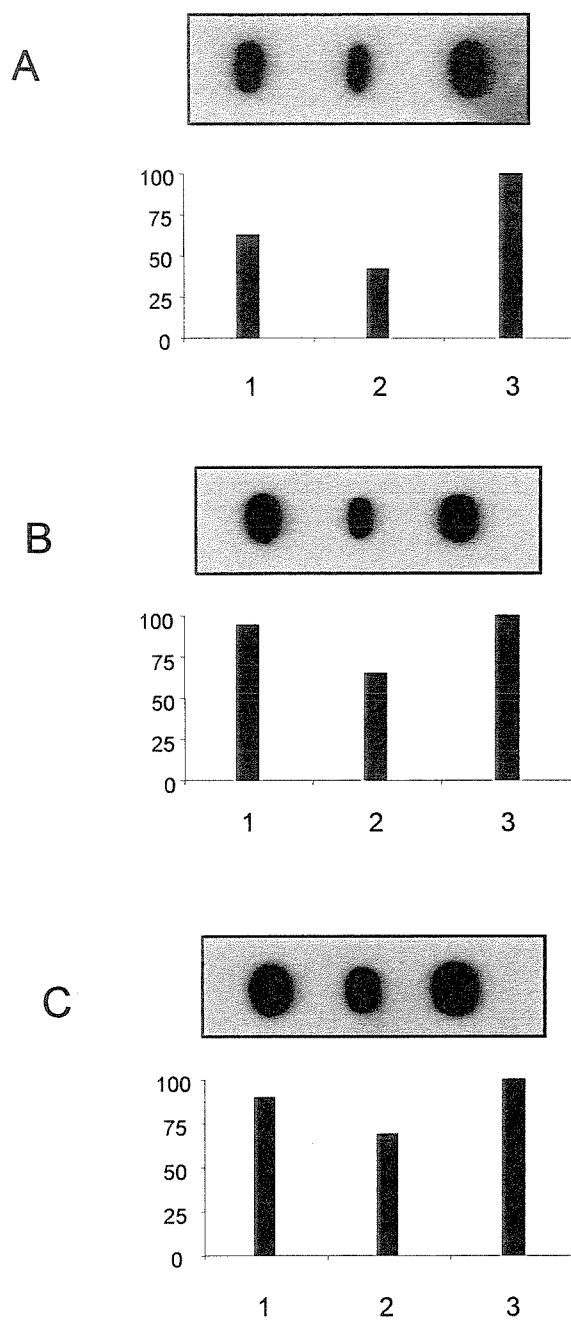


Fig. 5. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 crescida na ausência de metal (1), 60 mM de sulfato de cádmio (2) e 600 mM de sulfato de zinco (3). Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 6J04Zn, (B) 7F03Zn e (C) 7J04Zn, marcadas com radioatividade.

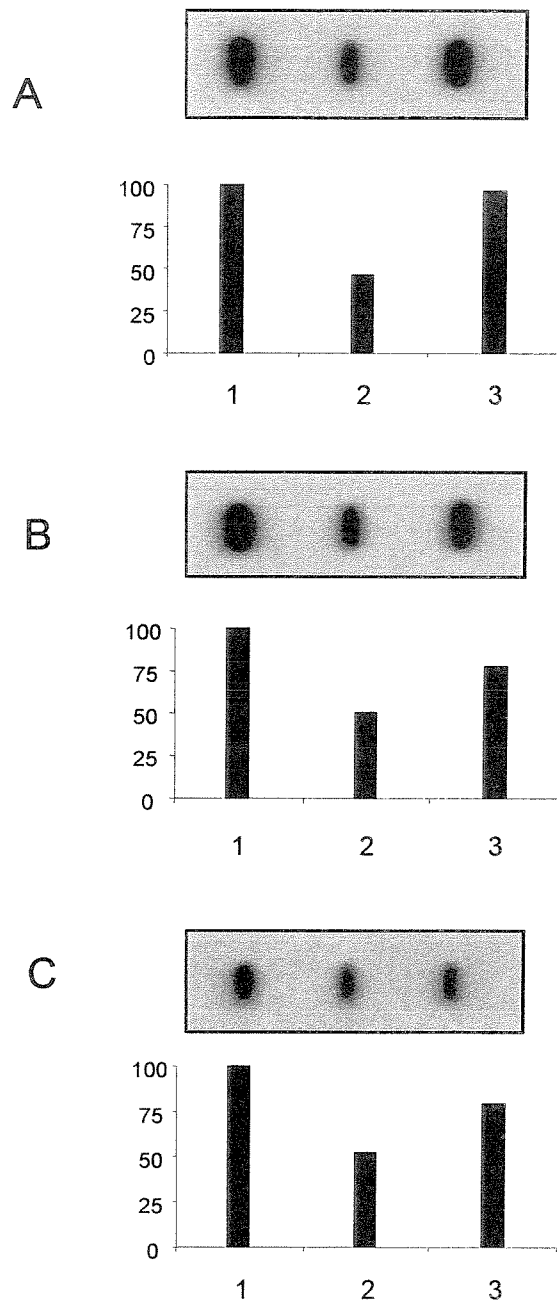


Fig. 6. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 crescida na ausência de metal (1), 60 mM de sulfato de cádmio (2) e 600 mM de sulfato de zinco (3). Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 13J06C, (B) 7J06C e (C) 16J06C, marcadas com radioatividade.

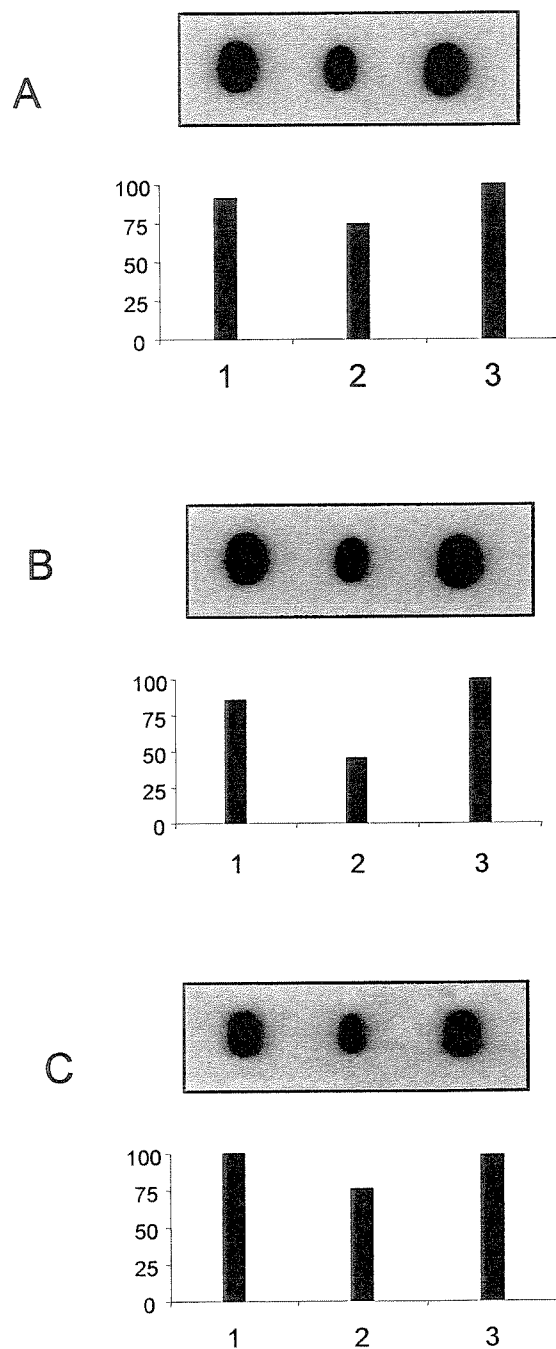


Fig. 7. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 crescida na ausência de metal (1), 600 mM de sulfato de zinco (2) e 60 mM de sulfato de cádmio (3). Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 17F03Cd, (B) 20J04Cd e (C) 17J04Cd, marcadas com radioatividade.

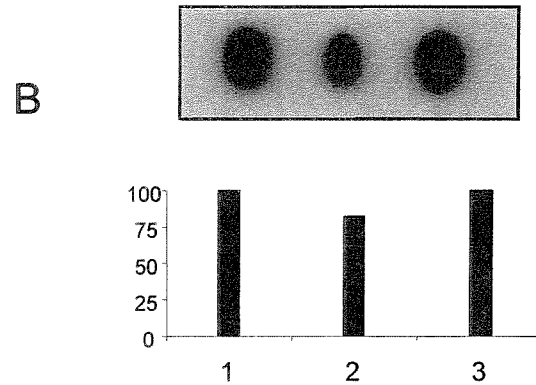
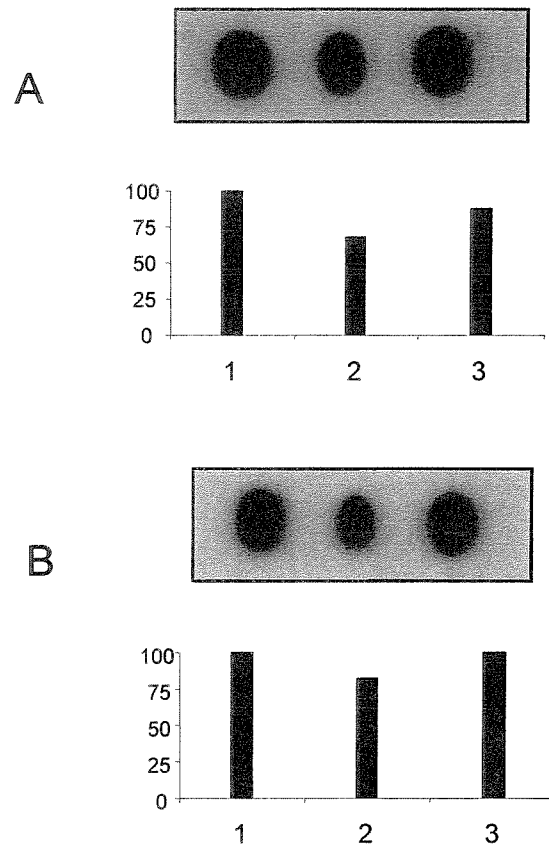


Fig. 8. *Slot blot* contendo 3 μ g de RNA de células da linhagem de *A. ferrooxidans* FG460 crescida na ausência de metal (1), 600 mM de sulfato de zinco (2) e 60 mM de sulfato de cádmio (3). Os *Slot blots* foram hibridizados com sondas das bandas de RAP-PCR: (A) 1J05C e (B) 5J06Cd, marcadas com radioatividade.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaro, A. M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Perano, I., Jerez, C. A. 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **173**: 910-915.
- Bosecker, K. 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **20**: 591-604.
- Hubert, W.A., Leduc, L.G., and Ferroni, G. D. (1995). Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.*, **31**: 10-14.
- Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brierley, J.A., and Brierley, C.L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, **40**: 311-336.
- Jerez, C. A. 1988. The heat shock response in meso and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **56**: 289-294.
- Leduc, L.G. and Ferroni, G.D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**: 103-120.
- Lombardi, A.T. and Garcia Jr. O. (1999). An Evaluation into the Potencial of Biological Processing for the Removal of Metal from Sewage Sludges. *Critical Reviews in Microbiology*, **25**(4): 275-288.
- Lundgren, D.G. and Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **34**: 263-283.
- Modak, J.M., Natarajan, K.A. and Mukhopadhyay, S. (1996). Development of temperature-tolerant strains of *thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetics. *Hydrometallurgy* **42**: 51-61.
- Rawlings, D.E. and Kusano, T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.*, **58**: 39-55.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shiratori, T. and Sonta, H. (1993). Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**: 165-174.

- Suzuki, I., Lee, D., Mackay, Byron, Harahuc, L. and OH, J.K. (1999). Effect of Various Ions, pH and Osmotic Pressure on Oxidation of Elemental Sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied and Env. Microbiol.* **65**: 5163-5168.
- Winderickx, J. and Castro, J. M. (1994). *Practical course in molecular biology of microorganisms*. Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February 11, pp. 59.

CONCLUSÕES GERAIS:

1. Experimentos de RAP-PCR na presença de cádmio e zinco permitiu a identificação de 175 bandas diferenciais, sendo 107 bandas diferenciais isoladas no tratamento com 60 mM de sulfato de cádmio (22 reprimidas e 85 induzidas) e 68 bandas diferenciais isoladas no tratamento com 60 e 600 mM de sulfato de zinco (12 reprimidas e 56 induzidas).
2. Das 107 bandas isoladas nos experimentos de RAP-PCR com sulfato de cádmio, 62 (58%) tiveram a expressão diferencial confirmada e das 68 bandas diferenciais isoladas nos experimentos com sulfato de zinco, 32 (47%) tiveram a expressão diferencial confirmada através de *Slot blot* de DNA. Nenhuma das bandas isoladas nos experimentos com 60 mM de sulfato de zinco teve a expressão diferencial confirmada, mostrando que esta concentração de metal não causa estresse na bactéria.
3. Entre os produtos de RAP-PCR isolados nos experimentos com sulfato de zinco, foram encontradas seqüências que apresentaram similaridade com: (1) o gene *tnsB* do transposon Tn7 (banda 7F03Zn), (2) uma proteína hipotética de *Deinococcus radiodurans* (banda 7J04Zn), (3) uma provável proteína secretora de *Pseudomonas aeruginosa* (banda 6J04Zn), (4) o fator de elongação Tu (EF-Tu) de *P. aeruginosa* (banda 13J06C), (5) a proteína RLX de *Staphylococcus aureus* (banda 16J06C) e (6) uma GTP ciclodrolase de *Photobacterium leignathi* (banda 7J06C).
4. Entre os produtos de RAP-PCR isolados nos experimentos com sulfato de cádmio, foram encontrados seqüências que apresentaram similaridade com: (1) uma provável transposase B de *A. ferrooxidans* (banda 16F03Cd), (2) a ribonuclease III de *E. coli*, (banda 17F03Cd), (3) uma proteína semelhante a transposase de *A. ferrooxidans* (banda 17J04Cd), (4) o gene *nif A* de *Rhodobacter capsulatus* (banda 5J06Cd), (5) um provável componente do transporte ABC ligado a ATP de *P. aeruginosa* (banda 23J04Cd), (6) um componente putativo do transporte ABC ligado a ATP de *Streptomyces coelicolor* (banda 24J04Cd), (7) uma putativo oligosacarideo transferase transmembrana

de *Pyrococcus abyssi* (banda 20J04Cd), (8) o transposon Tn5053 de *Xanthomonas sp* (banda 18F03Cd), (9) uma proteína hipotética de *Caenorhabditis elegans* (banda 4J08C), (10) um precursor putativo do citocromo c1 de *A. ferrooxidans* (banda 1J05C) e (11) o gene *resB* putativo de *A. ferrooxidans* (banda 2J01C).

5. A análise dos produtos de RAP-PCR em resposta a três concentrações de sulfato de zinco revelou que os produtos induzidos por metal, 7F03Zn e 6J04Zn (gene *tnsB* do transposon Tn7 e provável proteína secretora de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente) apresentaram níveis crescentes de expressão gênica em 100, 300 e 600 mM. Apenas a banda 7J04Zn (proteína hipotética de *Deinococcus radiodurans*) apresentou um nível maior de expressão em 300 mM de sulfato de zinco. Entre os produtos reprimidos por zinco, a banda 13J06C (fator de alongação Tu de *P. aeruginosa*) apresentou expressão mais elevada que em 100 mM do metal do que no controle, indicando uma indução do gene nesta concentração do metal, seguida por uma repressão nas concentrações de 300 e 600 mM de sulfato de zinco. As bandas 16J06C e 7J06C (proteína RLX de *Staphylococcus aureus* e GTP ciclohidrolase de *Photobacterium leignathi*, respectivamente) apresentaram expressão menor que no controle em todas as concentrações de sulfato de zinco testadas.
6. A análise dos produtos de RAP-PCR em resposta a três concentrações de sulfato de cádmio (0, 10, 30 e 60 mM) revelou níveis variados de expressão gênica em relação ao controle, demonstrando a ocorrência de genes que apresentam respostas distintas nas diferentes concentrações de sulfato de cádmio testadas.
7. A expressão dos produtos de RAP-PCR na presença de outros fatores de estresse mostrou níveis diferentes de expressão gênica. Algumas bandas apresentaram níveis de expressão mais acentuados em 200 mM de sulfato de cobre, enquanto que outras apresentaram níveis mais acentuados de expressão em todas as condições de estresse testadas.

8. Todas as bandas que foram induzidas ou reprimidas por sulfato de cádmio e zinco na linhagem LR também foram induzidas ou reprimidas por estes metais na linhagem FG460.
9. Análise através de *Southern blot* revelou que todas as bandas de RAP-PCR testadas hibridizaram com as três linhagens de *A. ferrooxidans*. Somente a banda 16J06C, reprimida por zinco, hibridizou com o DNA de todas as linhagens.

Referências Bibliográficas

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babai, Reuven and Ron, Eliora Z., (1998). Na *Escherichia coli* gene responsive to heavy metals. *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**: 107-111.
- Bender, C.L. and Cooksey, D.A. (1987). Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.*, **169**: 470-474.
- Brieley, C. L. (1978). Bacterial leaching. *Critical Review of Microbiology*, **6**: 207-262.
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, **20**: 591-604.
- Butcher, B.G., Deane, S.M., and 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*. *Appl. Environ. Microbiology*, **66**: 1826-1833.
- Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **45**:198-207.
- Cervantes, C and Silver, S. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*, **27**: 65-71.
- Cervantes, C. and Gutierrez-Corona, F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**: 121-137.
- Crupper, S.S., Worrell, V., Stewart, G.C., and Iandolo, J.J. (1999). Cloning and Expression of *cadD*, a New Cadmium Resistance Gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **181**: 4071-4075.
- Dispirito, A.A. and Tuovinen, O.H. (1982). Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.*, **133**: 33-37.
- Edet, E.Udo, Latha E. and Jacob, B. M. (2000). A cadmium resistance plasmid, pXU5, in *staphylococcus aureus*, strain ATCC25923. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**: 79-80.
- Frattini, C.J., Leduc, L.G. and Ferroni, G.D. (2000). Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**: 57-64.

- Garcia Jr., O. and Silva, L.L. (1991). Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnol. Lett.*, **13**: 567-570.
- Ghosh, Anjali, Singh, Amarika, Ramteke, P.W. and Singh, V.P. (2000). Characterization of Large Plasmids Encoding Resistance to toxic Heavy Metal in *Salmonella abortus equi*. *Bioch. and Biophys. Res. Comm.*, **272**: 6-11
- Groudeva, V.I., Markov, K.I., and Gentchev, G.J. (1978a). Survival of *Thiobacillus ferrooxidans* after UV Irradiation. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, **31**: 599-602.
- Groudev, S.N. (1980a). Differences between *Thiobacillus ferrooxidans* strains with respect to their ability to oxidize covellite. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, **33**: 659-662.
- Groudev, S.N. (1980b). Leaching of sphalerite with different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, **33**: 1119-1122.
- Harrison, Jr., A. P. (1982). Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.*, **131**: 68-76.
- Hassan, M.T., Lelie van der D., Springael, D., Romling, U., Ahmed, N., and Mergeay, M. (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, **238**: 417-425.
- Hubert, W.A., Leduc, L.G., and Ferroni, G.D. (1995). Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.*, **31**: 10-14.
- Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brieley, J.A., and Brieley, C.L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, **40**: 311-336.
- Inoue, C, Sugawara, K., Shiratori, T., Kusano, T., and Kitagawa, Y. (1989). Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase. *Gene*, **84**: 47-54.
- Kaur, P. and Rosen, B.P. (1992). Plasmid - encoded resistance to arsenic and antimony. *Plasmid*, **27**: 29-40.

- Kelly, D.P. and 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 2**: 511-516.
- Kondratyeva, T.F., Muntyan, L.N., and Karavaiko, G.I. (1995). Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology*, **141**: 1157-1162.
- Kuenen, J.G., Robertson, L.A., and Tuovinen, O.H. (1992). The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospora*, and *Thiosphaera*, In: A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 2638-2657
- Lee, S.W., Glickmann, E. and Cooksey, D.A. (2001). Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1437-1444.
- Leduc, L.G. and Ferroni, G.D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **14**: 103-120.
- Lombardi, A.T. and Garcia Jr. O, (1999). An Evaluation into the Potencial of Biological Processing for the Removal of Metal from Sewage Sludges. *Critical Reviews in Microbiology*, **25(4)**: 275-288.
- Lopez L.A., Exposito, E., Anton, J., Rodriguez-Valera, F., and Aldaz, A. (1999). Use of *Thiobacillus ferrooxidans* in a coupled microbiological-electrochemical system for wastewater detoxification. *Biotechnol. Bioeng*, **63(1)**: 79-86.
- Lundgren, D.G. and Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **34**: 263-283.
- Misra, T.K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, **27**: 4-16.
- Natarajan, K.A., Sudeesha, K., and Rao, R. (1994). Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**: 303-306.
- Nies, D.H., Mergeay, M., Friedrich, B., Schlegel, H.G. (1987). Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* **169**: 4865-4868.

- Nies, D. H. (1992). Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid*, **27**: 17-28.
- Novo, M.T.M., Souza, O Garcia, Jr., and Ottoboni, L.M.M. (1996). RAPD genomic fingerprints differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System. Appl. Microbiol.*, **19**: 91-95.
- Novo, M.T.M., Silva, A.C., Moreto, R., Cabral, P.C.P., Costacurta, A., Garcia Jr., O., and Ottoboni, L.M.M. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**(2): 187-195.
- Rouch, D. A., Lee, B.T.O., and Morby, A.P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Industrial Microbiology*, **14**: 132-141.
- Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., and Kitagawa, Y. (1989). Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**: 3458-3464.
- Shiratori, T. and Sonta, H. (1993). Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**: 165-174.
- Silver, M. and Torma, A. E. (1974) Oxidation of metal sulfides by *T. ferrooxidans* grown on different substrates. *Can. J. Microbiol.* **20**: 141-147.
- Silver, S. and Misra T.K. (1984). Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. *In Genetic control of environmental pollutants*. Edited by G. S. Omenn and A. Hollaender. Plenum Press, New York.
- Silver, S. and Misra, T.K. (1988). Plasmid - mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.*, **42**: 717-743.
- Silver, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. *Gene*, **179**: 9-19.
- Silver, S., (1998). Genes for all metals-a bacterial view of the periodic table the 1996 thom award lecture. *J. of Industrial Microbiol. & Biotechnology*, **20**: 141-147.
- Trevors, J.T., Stratton, G.W., and Gadd, G.M. (1986). Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* **32**: 447-464

- Tuovinen, O.H., Niemela, S.I., and Gyllenberg, H.G. (1971). Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leeuwenhoek*, **37**: 489- 496.
- Walter, E.G. and Taylor, D.E. (1992). Plasmid- mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid*, **27**: 52-64.
- Yoon, K.P. and Silver, S. (1991). A second gene in the *Staphylococcus aureus cadA* cadmium resistance determinant. Submitted for publication.