

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/46102

IB/ 81671

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética

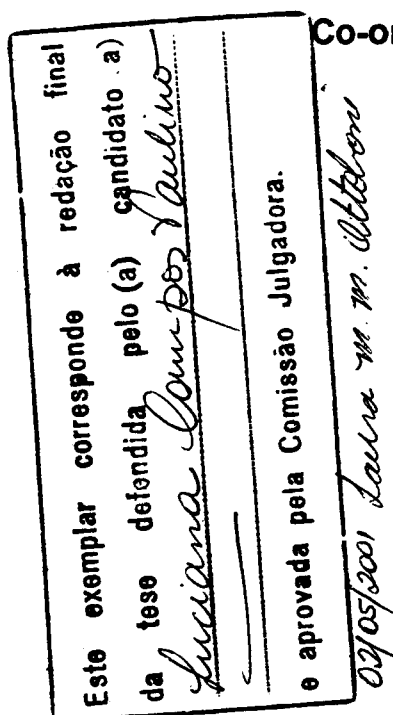


Taxonomia Polifásica e Caracterização da Expressão Gênica Diferencial na Presença de Cobre em *Acidithiobacillus* spp.

Luciana Campos Paulino

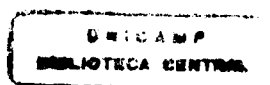
Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Co-orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Genética de Microorganismos

Campinas, 2001



UNIDADE I 12/81671
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
P283t
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 46102
 PROC. 16-392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 16-02-01
 N.º CPD

CM00158820-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Paulino, Luciana Campos
P283t Taxonomia polifásica e caracterização da expressão gênica
 diferencial na presença de cobre em *Acidithiobacillus* spp/
 Luciana Campos Paulino. - - Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
 131f: illus.

Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni
 Co-Orientadora: Maricilda Palandi de Mello
 Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto
 de Biologia.

1. Taxonomia. 2. Cobre. 3. Bactéria. 4. Diversidade molecular.
 I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Mello, Maricilda Palandi de. III.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Defesa pública: Campinas, 02 de maio de 2001.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (orientadora) *Laura m. m. Ottoboni*

Dr. Gilson Paulo Manfio *Gilson P. Manfio*

Dra. Maria Inês Zanoli Sato *Maria Inês Zanoli Sato*

Profa. Dra. Christine Hackel *Christine Hackel*

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini *Vera Nisaka Solferini*

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

A coisa mais bela que o homem pode experimentar
é o mistério. É esta a emoção fundamental que está
na raiz de toda a ciência e arte.

Albert Einstein

Ao Sergio,

que compartilha comigo a emoção
de cada nova descoberta,

dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni, pela orientação deste trabalho e importante contribuição à minha formação científica;

À Profa. Dra. Maricilda P. de Mello, pela co-orientação, amizade e apoio desde o meu mestrado;

Ao Dr. Gilson P. Manfio, pela participação na banca examinadora, leitura criteriosa da tese na pré-banca e pelas discussões ao longo do trabalho que tanto contribuíram para enriquecê-lo;

À Dra. Maria Inês Z. Sato, Profa. Dra. Christine Hackel e Profa. Dra. Vera N. Solferini, pela participação na banca examinadora;

Ao Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira, pela participação como suplente na banca examinadora;

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela discussão e valiosas sugestões na pré-banca e por participar como suplente da banca examinadora;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr., pela leitura criteriosa do trabalho na pré-banca e por ceder as linhagens de *Acidithiobacillus* utilizadas neste trabalho;

À Dra. Maria Teresa M. Novo, por introduzir no laboratório a linha de pesquisa com *Acidithiobacillus* e por realizar o estudo que forneceu o embasamento para o presente trabalho;

Ao Marcos, Anderson e Andréa do laboratório do Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira, pela grande ajuda no seqüenciamento dos produtos de RAP-PCR, apresentados no artigo 2;

Ao Dr. Gilson P. Manfio e Dra. Valéria Maia, pelo apoio no seqüenciamento do gene de rDNA 16S, apresentado no artigo 1;

Aos técnicos Wilson e Marcos, que em diferentes etapas deste trabalho contribuíram muito para sua realização;

Ao Ed e à Ângela, pela ajuda com o programa NTSYS-pc e com os experimentos de hibridização DNA-DNA apresentados no artigo 1;

Ao Rogério, que divide comigo o estudo de *Acidithiobacillus*, pelo auxílio no cultivo das linhagens, obtenção de amostras DNA e RNA e colaboração em várias etapas deste trabalho;

Às secretárias do CBMEG Sandra, Tânia, Fabiana e Patrícia e à Teresa e Zaira, secretárias do Depto. de Genética e Evolução, pela eficiência e simpatia;

Aos companheiros do laboratório e do CBMEG, por compartilharem comigo os momentos alegres e pelo apoio nas dificuldades encontradas no decorrer deste trabalho;

Aos meus amigos da Biologia, pelo incentivo e apoio que desde o início da minha incursão pelo mundo da ciência, há 10 anos atrás, tornam mais suave o meu caminho;

À minha família, pelo amor e estímulo que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui e à memória do meu querido avô, que me incentivou durante toda minha vida e que infelizmente não pode testemunhar este novo passo;

Ao Sergio, pelo seu amor, dedicação e paciência, sempre ao meu lado nos momentos difíceis e comemorando comigo cada vitória conquistada;

À FAPESP, pelo apoio financeiro (bolsa de doutorado 97/12549-2, projeto científico 97/1069-0 e programa BIOTA/FAPESP 98/05068-0).

ÍNDICE

RESUMO	01
SUMMARY	05
INTRODUÇÃO	08
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1. <i>Acidithiobacillus</i> sp.	10
1.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	11
2. Variabilidade genética em <i>Acidithiobacillus</i> sp.	12
3. Resistência a metais	14
3.1. Resistência a metais em bactérias	14
3.2. Resistência a metais em <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	15
4. Estudo da resposta a fatores de estresse por “fingerprinting” de RNA.....	18
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 1. Taxonomia polifásica de <i>Acidithiobacillus</i> spp.	23
Artigo 1: Molecular characterization of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> and <i>A. thiooxidans</i> strains isolated from mine wastes in Brazil	24
CAPÍTULO 2. Caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	50
Artigo 2: Differential gene expression in response to copper in <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> by RNA arbitrarily primed PCR	51

Apêndice. Sequências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cobre em <i>A. ferrooxidans</i>	74
CAPÍTULO 3. Expressão gênica sob vários fatores de estresse de produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cobre e análise da presença/ausência dos genes em diferentes linhagens	77
CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

RESUMO

Acidithiobacillus sp. compreende bactérias Gram-negativas, acidofílicas e quimiolitotróficas obrigatórias, que obtêm energia a partir da oxidação de compostos reduzidos de enxofre (Kelly & Wood, 2000). Tendo em vista o alto grau de diversidade genética do gênero *Acidithiobacillus* (Harrison, 1982; Lane *et al.*, 1992; Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996; Novo *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998), o Capítulo 1 do presente trabalho apresenta a caracterização molecular de linhagens brasileiras de *Acidithiobacillus* spp., (isoladas em minas de cobre, carvão, ouro e urânio de diversas localidades do Brasil; Garcia, 1991) através de ribotipagem, BOX e ERIC-PCR e hibridização DNA-DNA. Os métodos de ribotipagem, BOX e ERIC-PCR revelaram uma grande divergência entre as linhagens estudadas e particularmente entre SSP e PCE (isoladas respectivamente em minas de carvão e urânio), até então classificadas como *A. ferrooxidans*, com relação às demais linhagens desta espécie.

Experimentos de hibridização DNA-DNA demonstraram que a homologia entre SSP e a linhagem tipo da espécie *A. ferrooxidans* é de apenas 40,7%. Uma vez que se convencionou considerar 70% como a porcentagem de homologia limite para inclusão de uma linhagem em uma determinada espécie (Wayne *et al.*, 1987), a linhagem SSP deve ser excluída da espécie *A. ferrooxidans*, sendo referida a partir de então como *Acidithiobacillus* sp. SSP, até que análises adicionais sejam realizadas. A porcentagem de homologia da linhagem PCE com relação à linhagem tipo foi de aproximadamente 77,6%, permitindo a inclusão da linhagem na espécie *A. ferrooxidans*.

As seqüências de rDNA 16S de *Acidithiobacillus* sp. SSP e da linhagem tipo de *A. ferrooxidans* foram obtidas e comparadas com as seqüências de outras linhagens de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* e *A. caldus*. A análise filogenética resultante desses dados revelou que *Acidithiobacillus* sp. SSP é relacionada a *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*.

Tem sido observado que *A. ferrooxidans* apresenta níveis elevados de resistência a diversos metais pesados, como por exemplo cobre, zinco, arsênio e

urânio (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994). Com exceção da resistência ao mercúrio (Shiratori *et al.*, 1989) e ao arsênio (Butcher *et al.*, 2000), as bases genéticas da resistência a metais em *A. ferrooxidans* permanecem desconhecidas. No Capítulo 2 é apresentada a caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em uma linhagem brasileira de *A. ferrooxidans* resistente ao metal (Novo *et al.*, 2000), através de RAP-PCR (Welsh *et al.*, 1992). O método de RAP-PCR é baseado na síntese de cDNA a partir de RNA obtido em duas situações a serem comparadas e amplificação por PCR utilizando “primers” arbitrários. Os padrões gerados são comparados, permitindo a detecção de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas condições.

Utilizando 8 “primers” arbitrários, foram isolados 104 produtos de RAP-PCR expressos diferencialmente na presença de cobre. A expressão diferencial de 99 deles foi testada através de hibridização em “Slot blot” de DNA, sendo que aproximadamente 70% dos produtos testados foram confirmados. Os produtos que apresentaram os maiores coeficientes de indução por cobre foram clonados, seqüenciados e as seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados. O fragmento com o maior grau de indução por cobre mostrou-se significativamente homólogo ao gene do citocromo c de *A. ferrooxidans* (Guiliani *et al.*, 1995).

Um produto de RAP-PCR reprimido por cobre apresentou homologia significativa com o operon carboxissomo de *A. ferrooxidans*, que inclui a enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (RUBISCO, Kusano *et al.*, 1991).

Foi identificado ainda um fragmento induzido por cobre homólogo ao gene *thiC*, envolvido na biossíntese de tiamina em *Deinococcus radiodurans* (White *et al.*, 1999).

Dez produtos de RAP-PCR analisados não apresentaram homologia significativa com nenhuma seqüência disponível no banco de dados e 4 produtos revelaram similaridade com genes que codificam proteínas cuja função é desconhecida.

Dentre os produtos de RAP-PCR com os maiores coeficientes de indução por cobre ou com homologia significativa com seqüências conhecidas, foram

selecionados 5 para o estudo da expressão gênica em outros fatores de estresse e outra linhagem, além da análise da presença ou ausência dos genes em diversas linhagens de *acidithiobacilli*. Os resultados obtidos estão apresentados no Capítulo 3. Quatro destes produtos são induzidos e um é reprimido por cobre. A expressão gênica na presença de 200 mM de sulfato de cobre foi comparada com a expressão em 50 e 100 mM de sulfato de cobre, 600 mM de sulfato de zinco, 60 mM de sulfato de cádmio, temperatura e pH em valores acima das condições ótimas de crescimento de *A. ferrooxidans*.

Os produtos de RAP-PCR induzidos por cobre revelaram níveis de expressão gênica mais baixos em 50 mM de sulfato de cobre, elevando-se em 100 mM e atingindo o ponto mais alto em 200 mM. O produto reprimido por cobre apresentou níveis de expressão equivalentes em 50 e 100 mM de sulfato de cobre, mais altos em relação a 200 mM.

Todos os produtos de RAP-PCR testados apresentam níveis de expressão gênica mais baixos na presença de zinco em relação a 200 mM de sulfato de cobre. O mesmo ocorreu com cádmio, exceto no caso de um dos fragmentos induzidos e do reprimido por cobre.

Os níveis de expressão gênica dos produtos de RAP-PCR em pH mais alto que o ótimo para o crescimento de *A. ferrooxidans* foram mais baixos em relação à expressão em cobre para todos os produtos testados. Já no caso do estresse térmico foram observadas variações nos padrões dos diferentes produtos: 2 deles apresentaram níveis de expressão mais altos sob estresse térmico em relação ao cobre, em 2 a expressão foi menor e em outro manteve-se constante.

A comparação da expressão gênica entre a linhagem LR, dos quais os produtos foram isolados, e uma segunda linhagem também resistente a cobre (CMV) revelou que 3 produtos induzidos por cobre apresentam níveis de expressão mais altos em LR e em um produto a expressão foi aproximadamente igual nas duas linhagens. No caso do produto reprimido por cobre, a expressão gênica na linhagem LR foi menor em relação à segunda linhagem.

Através de análises por "Southern blot", foram comparados os padrões de hibridização do DNA genômico de 6 linhagens de *Acidithiobacillus* spp. e uma

linhagem de *E. coli* digerido com *BamH* I e *Hind* III, utilizando como sonda os produtos de RAP-PCR. Não foi detectado sinal de hibridização de nenhum dos produtos testados com o DNA das linhagens de *A. thiooxidans* e *E. coli* nas condições de estringência utilizadas nos experimentos. A linhagem de *Acidithiobacillus* sp. SSP revelou sinal de hibridização apenas com 2 produtos de RAP-PCR.

A maioria dos padrões correspondentes à linhagem LR de *A. ferrooxidans*, da qual foram isolados os produtos de RAP-PCR utilizados como sondas, foi semelhante aos padrões da linhagem tipo de *A. ferrooxidans*. Já a linhagem de *A. ferrooxidans* CMV apresentou na maioria dos casos padrões distintos das demais linhagens, indicando provavelmente diferenças na localização dos genes no cromossomo bacteriano.

SUMMARY

The genus *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood, 2000) accommodates a group of Gram-negative, acidophilic, rod-shaped bacteria that derive energy from the oxidation of reduced sulfur compounds. A high genetic diversity has been observed in this genus (Harrison, 1982; Lane *et al.*, 1992; Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996; Novo *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998). Thus, the Chapter 1 of the present study shows the data of molecular characterization of Brazilian *Acidithiobacillus* strains isolated from coal, copper, gold and uranium mines in Brazil (Garcia, 1991), using ribotyping, BOX and ERIC-PCR and DNA-DNA relatedness assays. A high genetic variability was found among the strains tested. *A. ferrooxidans* SSP and PCE (isolated from acid coal mine waste and uranium mine effluent, respectively) were readily distinguished from the remaining *A. ferrooxidans* strains.

According to the DNA-DNA hybridization data, strain SSP showed DNA similarity value of 40.7% against reference DNA from the *A. ferrooxidans* type strain, which is below the 70% cut-off point for inclusion in this species (Wayne *et al.*, 1987). Therefore, strain SSP should be referred to as *Acidithiobacillus* sp. The DNA relatedness between strain PCE and the *A. ferrooxidans* type strain was 77.6%, supporting its allocation to the same genomic species.

Nearly complete 16S rDNA sequences were obtained for *A. ferrooxidans* type strain and *Acidithiobacillus* sp. SSP. In the phylogenetic sequence analysis, *Acidithiobacillus* sp. SSP was recovered in a separate cluster from most *A. ferrooxidans* strains. These data suggest that *Acidithiobacillus* sp. SSP may represent a phylogenetically distinct *Acidithiobacillus* species, related to *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* species.

A. ferrooxidans presents a inherent resistance to high concentrations of heavy metals, such as copper, zinc, arsenic and uranium (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994). The genetic basis of metal resistance in *A. ferrooxidans* is still unknown, except for mercuric (Shiratori *et al.*, 1989) and arsenic resistance (Butcher *et al.*, 2000). The Chapter 2 presents the

characterization of the differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans* strain LR, using RNA arbitrarily primed PCR (Welsh *et al.*, 1992). This technique is based on the isolation of RNA from cellular samples under two conditions to be compared, reverse transcription of the RNA (RT-PCR) using arbitrary primers and separation of the cDNA bands on a sequencing electrophoresis gel.

Eight arbitrary primers were used to generate the RAP-PCR profiles and a total of 104 differentially expressed fragments were identified. The differential gene expression of 99 RAP-PCR products was tested using DNA Slot blot hybridization assays and approximately 70% of these were confirmed. The RAP-PCR products that presented the highest values of induction ratio were cloned and sequenced. The sequences obtained were compared with GenBank sequences. The RAP-PCR product with the highest induction ratio demonstrated significant homology with cytochrome c from *A. ferrooxidans* (Guiliani *et al.*, 1995).

One of the RAP-PCR products repressed by copper showed significant homology with the carboxysome operon from *A. ferrooxidans*, that includes both small and large subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (RUBISCO, Kusano *et al.*, 1991). In addition, we found a product with homology to the thiamin biosynthesis gene *thiC* from *Deinococcus radiodurans* (White *et al.*, 1999). Ten RAP-PCR products analyzed did not reveal significant homology with sequences in the database and 4 products presented similarity with hypothetical or unknown proteins.

Five RAP-PCR products with high induction ratio or significant homology with known sequences were selected for additional gene expression analyses using a different strain and under other stress conditions. In addition, the presence or absence of the RAP-PCR products were analyzed for several acidithiobacilli strains. Four RAP-PCR products were induced by copper and one was repressed by copper. The results were present in the Chapter 3.

The gene expression of the RAP-PCR products in response to 200 mM of copper sulfate was compared with the gene expression in response to 50 and

100 mM of copper sulfate, 600 mM of zinc sulfate, 60 mM of cadmium sulfate, higher-than-optimum temperature and pH.

The RAP-PCR products induced by copper presented increasing levels of gene expression from 50 to 200 mM of copper sulfate. The RAP-PCR product repressed by copper showed the same level of gene expression under 50 and 100 mM of copper sulfate, lower than the level of gene expression under 200 mM.

All the RAP-PCR products presented a lower level of gene expression under zinc and high pH when compared with copper gene expression. The same result was observed with cadmium, except for the RAP-PCR product repressed by copper and one product induced by copper. The gene expression of 2 RAP-PCR products at high temperature was higher compared to copper stress conditions. In contrast, 2 RAP-PCR products were lower expressed in response to temperature stress compared to copper stress and another one presented the same level of gene expression under copper and temperature stress.

Additionally, the gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans* strain CMV was compared with strain LR. The CMV and the LR strains are highly resistant to copper (Novo *et al.*, 2000), but the LR gene expression of 3 RAP-PCR products induced by copper was lower than CMV gene expression. One RAP-PCR product induced by copper showed the same level of gene expression in both LR and CMV strains. The RAP-PCR product repressed by copper presented a lower level of gene expression in the CMV strain compared with the LR strain.

Southern blot analyses were performed in order to compare the hybridization profiles of 6 *Acidithiobacillus* strains and one *E. coli* strain digested separately with either *Bam*H I or *Hind* III enzymes. The RAP-PCR products were used as probes. There was no detectable hybridization signal in the *A. thiooxidans* and *E. coli* strains with the 5 probes, under the stringent conditions used in the experiments. *Acidithiobacillus* sp. SSP presented hybridization signals with only 2 probes. Most LR profiles was similar to the *A. ferrooxidans* type strain profiles. In contrast, *A. ferrooxidans* CMV showed distinct profiles compared to the other strains.

INTRODUÇÃO

O gênero *Acidithiobacillus* compreende bactérias Gram-negativas, acidofílicas e quimiolitotróficas obrigatórias, que obtêm energia a partir da oxidação de compostos reduzidos de enxofre (Kelly & Wood, 2000).

A. ferrooxidans é a única espécie do gênero capaz de obter energia através da oxidação de íon ferroso, além de compostos reduzidos de enxofre (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings & Kusano, 1994). *A. ferrooxidans* é um dos principais microrganismos que atuam na biolixiviação de metais, podendo ser utilizado em processos industriais para obtenção de cobre, urânio ou metais preciosos, a partir de minérios de baixos teores (Hutchins *et al.*, 1986). Por outro lado, *A. ferrooxidans* pode ser empregado na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados, sendo uma alternativa econômica e rápida em comparação com métodos convencionais (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995), exercendo assim um papel de importância econômica e ao mesmo tempo ambiental.

Tem sido observado um alto grau de diversidade genética entre linhagens do gênero *Acidithiobacillus* em diversos métodos de caracterização molecular (Harrison, 1982; Lane *et al.*, 1992; Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996; Novo *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998). A variabilidade genética em populações naturais é uma característica interessante, pois permite a seleção de linhagens mais adequadas para a utilização industrial. Os estudos deste gênero no Brasil são importantes para a identificação e caracterização das linhagens brasileiras. Sendo assim, o Capítulo 1 do presente trabalho apresenta o resultado da taxonomia polifásica de *Acidithiobacillus* spp., no qual linhagens brasileiras foram caracterizadas utilizando as metodologias de ribotipagem, BOX e ERIC-PCR e hibridização DNA-DNA.

Uma característica fisiológica muito interessante de *A. ferrooxidans* é a sua alta resistência a diversos metais pesados, como por exemplo cobre, zinco, arsênio e urânio (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). As bases genéticas da resistência a metais em *A. ferrooxidans* ainda são desconhecidas,

com exceção da resistência ao mercúrio (Shiratori *et al.*, 1989) e ao arsênio (Butcher *et al.*, 2000). Com o objetivo de ampliar nossos conhecimentos sobre a resistência a metais em *A. ferrooxidans*, visando uma possível aplicação futura em processos industriais e ambientais, o Capítulo 2 deste trabalho apresenta a caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em uma linhagem brasileira de *A. ferrooxidans* resistente ao metal, através do método de RAP-PCR (Welsh *et al.*, 1992).

Este estudo teve início a partir dos dados relatados por Novo *et al.* (2000), que observaram alterações no perfil de proteínas totais da linhagem LR de *A. ferrooxidans* cultivada na presença de diversos metais pesados. Dentre eles, o cobre determinou as alterações mais significativas, tanto induzindo como reprimindo a expressão de várias proteínas. A linhagem LR foi selecionada por apresentar os maiores níveis de tolerância a cobre (Novo *et al.*, 2000). Com base nestes achados, foi proposta a hipótese de que a análise do “fingerprinting” de RNA fosse capaz de trazer mais informações sobre os genes expressos diferencialmente na presença de cobre em *A. ferrooxidans* LR.

O Capítulo 3 apresenta a análise dos produtos de RAP-PCR com expressão diferencial na presença de cobre, em outros fatores de estresse e diversas linhagens. A expressão desses fragmentos gênicos na presença do cobre foi comparada com a expressão na presença de zinco, cádmio, temperatura e pH acima das condições ótimas de crescimento de *A. ferrooxidans*. Além disso, a expressão dos produtos de RAP-PCR na linhagem *A. ferrooxidans* LR na presença de cobre foi comparada com a expressão gênica em uma segunda linhagem também tolerante a cobre. Ainda neste capítulo são apresentadas as análises por “Southern blot” do DNA genômico de diversas linhagens de acidithiobacilli digerido com duas enzimas de restrição e hibridizado utilizando como sonda os produtos de RAP-PCR.

Em resumo, o presente trabalho, apresentado em três capítulos, tem por objetivo a caracterização molecular de linhagens brasileiras de *Acidithiobacillus* spp. e a análise do perfil da expressão gênica diferencial na presença de cobre em *A. ferrooxidans*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Acidithiobacillus* sp.

O gênero *Acidithiobacillus* compreende bactérias Gram-negativas, acidofílicas e quimiolitotróficas obrigatórias, que obtêm energia a partir da oxidação de compostos reduzidos de enxofre. O carbono para sua constituição celular é captado através da fixação do dióxido de carbono atmosférico (Kelly & Wood, 2000).

As quatro espécies pertencentes a este gênero estavam anteriormente alocadas no gênero *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904). Entretanto, a grande diversidade com relação às condições de crescimento, seqüências de rDNA 16S, conteúdo de C+G e propriedades fisiológicas, suscitou discussões sobre a classificação das espécies incluídas no gênero (Rawlings & Kusano, 1994; McDonald *et al.*, 1997; Hiraishi *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998).

Em 2000, foram reclassificadas nove espécies até então pertencentes ao gênero *Thiobacillus*. Kelly & Wood (2000) incluíram oito espécies em três novos gêneros: *Acidithiobacillus*, composto por espécies acidofílicas (com pH ótimo de crescimento menor que 4,0); *Thermithiobacillus*, composto pela espécie moderadamente termofílica *T. tepidarius*; e *Halothiobacillus*, que inclui as espécies tolerantes a altas concentrações salinas *H. halophilus*, *H. hydrothermalis* e *H. neopolitanus*. Com base na seqüência de rDNA 16S, Kelly *et al.* (2000) propuseram a criação do gênero *Starkeya* para alocar a espécie anteriormente denominada *Thiobacillus novellus*.

No gênero *Acidithiobacillus* foram incluídas as espécies *A. albertensis* (Bryant *et al.*, 1983) Kelly & Wood (2000), *A. caldus* (Hallberg & Lindström, 1994) Kelly & Wood (2000), *A. ferrooxidans* (Temple & Colmer, 1951) Kelly & Wood (2000) e *A. thiooxidans* (Waksman & Joffe, 1922) Kelly & Wood (2000), a espécie tipo do gênero.

1.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans é a única espécie do gênero capaz de obter energia a partir da oxidação de íon ferroso, além de compostos reduzidos de enxofre (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings & Kusano, 1994).

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus*, *A. ferrooxidans* é uma das mais estudadas devido à sua importância na lixiviação de metais. A lixiviação é o processo que permite a obtenção de metais de interesse econômico através da dissolução de minérios de baixos teores (Hutchins *et al.*, 1986). *A. ferrooxidans*, em associação com *A. thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* (espécie também acidofílica, capaz de oxidar ferro), vem sendo empregada neste processo (Curutchet *et al.*, 1996; Bosecker, 1997; Bacelar-Nicolau & Johnson, 1999; Nagaoka *et al.*, 1999; Schippers & Sand, 1999; Harahuc *et al.*, 2000).

A biolixiviação, ou lixiviação mediada por microrganismos, pode ocorrer através de dois mecanismos principais: biolixiviação direta e indireta. O segundo caso envolve a produção de sulfato férrico pela bactéria, um forte oxidante capaz de solubilizar minério contendo formas reduzidas de enxofre. Já a biolixiviação direta se dá pelo ataque direto do microrganismo ao minério, sem a ação do sulfato férrico (Hutchins *et al.*, 1986).

A biolixiviação vem sendo utilizada em escala industrial para obtenção de cobre, urânio e ouro, porém há perspectivas de que o processo se torne comercialmente importante no futuro para a obtenção de zinco, níquel, cobalto e molibidênio (Bosecker, 1997).

Além do interesse industrial, *A. ferrooxidans* possui também importância ambiental, podendo ser utilizado na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados. Os métodos convencionais normalmente apresentam custos elevados, e o emprego de *A. ferrooxidans* é uma alternativa mais econômica e rápida, com benefícios para o meio ambiente (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995). Além disso, a capacidade de metabolização de compostos de enxofre possibilita a utilização de *A. ferrooxidans* em filtros para a

eliminação do dióxido de enxofre, um importante poluente ambiental emitido por vários tipos de indústrias (Bonaventura & Johnson, 1997).

2. Variabilidade genética em *Acidithiobacillus* sp.

Tem sido observada uma grande variabilidade genética no gênero *Acidithiobacillus*, e particularmente entre linhagens de *A. ferrooxidans*; detectada através de diversas metodologias, como hibridização DNA-DNA e determinação do conteúdo de C+G (Harrison, 1982); análises por RAPD (Novo *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998); PCR dos elementos repetitivos BOX e ERIC (Selenska-Pobell *et al.*, 1998), seqüenciamento de rDNA 16S (Lane *et al.*, 1992; Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996) e polimorfismo da região espaçadora entre os genes de rDNA 16S e 23S (Pizarro *et al.*, 1996; Selenska-Pobell *et al.*, 1998).

Harrison (1982) compararam a homologia do DNA de 23 linhagens de *A. ferrooxidans*, através da hibridização DNA-DNA e da determinação do conteúdo de C+G, agrupando-as em sete diferentes grupos de homologia. Não foi possível correlacionar os grupos de homologia com as regiões geográficas onde foram isoladas as linhagens, mas sim com características fisiológicas, como temperatura de crescimento; sugerindo a seleção dos genomas dentro de cada micro-ambiente.

Experimentos de hibridização DNA-DNA foram determinantes na reclassificação taxonômica dos organismos do antigo gênero *Thiobacillus* (Hiraishi *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 1998). A hibridização entre amostras de DNA genômico provenientes de duas linhagens bacterianas permite determinar o grau de homologia existente entre elas e, caso apresentem homologia igual ou superior a 70% são consideradas pertencentes a uma mesma espécie genômica (Wayne *et al.*, 1987).

A análise de seqüências do gene de rDNA 16S tem sido amplamente utilizada tanto para identificação como em estudos filogenéticos de acidithiobacilli. Lane *et al.* (1992) determinaram seqüências parciais de rDNA 16S de 37

linhagens pertencentes a oito gêneros de bactérias que metabolizam ferro e enxofre. As relações filogenéticas resultantes desses dados classificaram espécies do gênero *Acidithiobacillus* e mesmo linhagens de *A. ferrooxidans* em subgrupos distintos. Por outro lado, duas linhagens de *A. thiooxidans* foram incluídas no principal subgrupo de *A. ferrooxidans*.

Goebel & Stackebrandt (1994) analisaram a sequência total ou parcial de rDNA 16S de linhagens que metabolizam ferro, isoladas a partir de ambientes naturais ácidos ou biorreatores. Os resultados obtidos foram comparados com os dados de Lane *et al.* (1992), que incluem linhagens de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. Oito linhagens isoladas de ambientes naturais foram agrupadas em 3 “clusters” distintos, sendo que cada um deles incluiu também linhagens de *A. ferrooxidans* cujas seqüências foram publicadas por Lane *et al.* (1992). As linhagens alocadas em diferentes “clusters” apresentaram similaridade de DNA menor que 50 %.

A análise de seqüências parciais de rDNA 16S, além do polimorfismo de tamanho da região espaçadora entre os genes de rDNA 16S e 23S, foram os métodos utilizados por Pizarro *et al.* (1996) para identificar e caracterizar as espécies que compõem a população bacteriana presente em amostras de minério de cobre após biolixiviação. A comparação do tamanho das regiões espaçadoras com os padrões de espécies conhecidas permitiu a identificação de linhagens pertencentes às espécies *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*, além de *Leptospirillum ferrooxidans*. Algumas linhagens que mostraram padrões desconhecidos foram identificadas com base nas seqüências parciais de rDNA 16S, que apresentaram similaridade com as seqüências descritas por Lane *et al.* (1992) e Goebel & Stackebrandt (1994).

Através do método de RAPD, Novo *et al.* (1996) analisaram 8 linhagens de *A. ferrooxidans*, sendo 6 brasileiras. As linhagens foram divididas em 2 grupos principais, com apenas 0,5 % de similaridade entre eles.

Selenska-Pobell *et al.* (1998) utilizaram a amplificação dos elementos repetitivos ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”, Hulton *et al.*, 1991) e BOX (Martin *et al.*, 1992), além de RAPD, para classificação e

identificação de linhagens pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus*. Os dados obtidos pelos métodos de BOX e ERIC-PCR, que foram concordantes com os resultados fornecidos por RAPD, revelaram um alto grau de dissimilaridade de uma das linhagens de *A. ferrooxidans* em relação às demais linhagens pertencentes a mesma espécie. Além disso, as linhagens de *A. thiooxidans* apresentaram grande divergência em relação a *A. ferrooxidans*.

De acordo com Rawlings & Kusano (1994), a variabilidade genética existente entre as diversas linhagens de *A. ferrooxidans* justificaria a subdivisão em várias espécies.

A variabilidade genética no gênero *Acidithiobacillus*, e especialmente entre linhagens de *A. ferrooxidans* é uma característica muito interessante pois permite a seleção das linhagens mais adequadas para os estudos de mecanismos de resistência, isolamento de genes de resistência e utilização em processos de biolixiviação. Por outro lado, esta gama de aplicações torna necessária a otimização de metodologias que possibilitem identificação e classificação de linhagens e espécies.

3. Resistência a metais

3.1. Resistência a metais em bactérias

A ocorrência de resistência natural de bactérias a metais pesados; tais como cobre, arsênio, mercúrio, cádmio ou chumbo, tem sido atribuída à presença de íons metálicos nos ambientes naturais dos microrganismos, o que levaria à seleção de populações resistentes (Ji & Silver, 1995).

A resistência a metais pode ser determinada por diversos mecanismos (revisado por Bruins *et al.*, 2000; Silver, 1996, 1998; Silver & Phung, 1996). "O sistema mais freqüentemente encontrado é o efluxo do íon tóxico, por exemplo através de ATPases (Silver, 1996; Bruins *et al.*, 2000). Além deste, têm sido identificados também sistemas de exclusão do íon metálico através de alterações na permeabilidade celular; seqüestro intracelular ou extracelular do metal;

alteração da sensibilidade celular ao metal e detoxificação enzimática do metal, que é convertido em uma forma menos tóxica (Bruins *et al.*, 2000).

Os mecanismos de resistência a um determinado metal não são necessariamente os mesmos nos diversos grupos de bactérias. Enquanto o sistema de resistência ao mercúrio é altamente conservado entre os microrganismos, tanto em relação à estrutura do operon como na homologia entre os genes, o mecanismo de resistência ao arsênio apresenta um grau menor de homologia, com variações entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; e a resistência ao cádmio é determinada por mecanismos diferentes nestes dois grupos, possivelmente com origens evolutivas independentes (Ji & Silver, 1995).

A resistência ao cobre tem sido relacionada ao sistema de efluxo do íon para o exterior da célula bacteriana através de ATPase (Bruins *et al.*, 2000). Genes associados à resistência a cobre foram inicialmente caracterizados em *Pseudomonas syringae*, compondo o operon *cop* de localização plasmidial (Bender & Cooksey, 1986, 1987; Silver, 1998).

Posteriormente, genes homólogos aos genes do operon *cop* foram identificados em outros procariotos, como por exemplo *Escherichia coli* (Brown *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 2000), *Helicobacter pylori* e *H. felis* (Bayle *et al.*, 1998) e *Xanthomonas campestris* (Lee *et al.*, 1992).

Além dos mecanismos de resistência a cobre codificados por genes plasmidiais, foi identificado em *E. coli* um sistema de efluxo do cobre através de ATPase, codificado por genes do cromossomo bacteriano (operon *cut*, Lee *et al.*, 1990). Os autores propõem que as proteínas codificadas pelos genes do operon *cut* devam interagir com o sistema de resistência ao cobre mediado por plasmídios para regular a homeostase do cobre nas células.

3.2. Resistência a metais em *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A. ferrooxidans apresenta resistência a diversos metais, como por exemplo cobre, alumínio, zinco, arsênio e urânio, em níveis mais elevados que a maioria

das bactérias heterotróficas (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994).

Até o momento, não são conhecidas as bases genéticas da resistência a metais em *A. ferrooxidans*, com exceção da resistência ao mercúrio e ao arsênio. Os genes envolvidos no mecanismo de resistência ao mercúrio em *A. ferrooxidans* foram clonados e expressos em *E. coli* por Shiratori *et al.* (1989). Os autores demonstraram que em *A. ferrooxidans* a resistência ao mercúrio é determinada pelo operon *mer*, cujos genes estão localizados no cromossomo bacteriano. O operon *mer*, que codifica um sistema de resistência por detoxificação enzimática (Bruins *et al.*, 2000), apresenta homologia parcial em várias espécies de bactérias, embora em muitos casos seja codificado por genes plasmidiais (Silver & Phung, 1996).

Os genes envolvidos no mecanismo de resistência ao arsênio em *A. ferrooxidans* foram clonados e seqüenciados por Butcher *et al.* (2000). Células de *E. coli* transformadas com os genes de *A. ferrooxidans* adquiriram aumento de resistência a compostos de arsênio e a antimônio. A exemplo dos genes de resistência ao mercúrio, neste caso os genes são também cromossomais. O mecanismo de resistência ao arsênio identificado em *A. ferrooxidans* é um sistema de efluxo de íons através de ATPase (Butcher *et al.*, 2000).

Rawlings & Kusano (1994) sugeriram que os genes de resistência a mercúrio em *A. ferrooxidans* foram inseridos no cromossomo devido a eventos de transposição múltipla, com base nas observações de que o “codon usage” do gene *merA* (mercúrio redutase) é similar ao de genes de resistência presentes no transposon Tn501 e plasmídio R100, e substancialmente diferente do “codon usage” de outros genes cromossômicos de *A. ferrooxidans* (Inoue *et al.*, 1989). Apoiando esta hipótese, Ji & Silver (1995) afirmaram que genes de resistência a metais em vários microrganismos têm sido identificados primeiramente em plasmídios e depois no DNA cromossomal, sugerindo que esta mobilidade esteja relacionada a seqüências de inserção e transposons.

A presença de plasmídios foi verificada em várias linhagens de *A. ferrooxidans* (Martin *et al.*, 1981; Visca *et al.*, 1986; Shiratori *et al.*, 1991;

Rawlings *et al.*, 1993; Dominy *et al.*, 1997; Aparicio *et al.*, 2000), porém até o momento não foi correlacionada com mecanismos de resistência. Pelo contrário, Pramila *et al.* (1996) verificaram uma relação negativa entre a resistência a cobre e mercúrio e plasmídios em uma linhagem de *A. ferrooxidans*. Os autores observaram uma redução significativa no número de cópias de plasmídios em linhagem adaptada a cobre e a mercúrio. Quando a linhagem foi cultivada na ausência dos metais e perdeu a resistência, o número de cópias inicial foi restaurado. De acordo com os autores, os dados sugerem que os genes relacionados à resistência ao cobre são codificados pelo DNA cromossomal da bactéria, o que já foi confirmado no caso da resistência ao mercúrio e ao arsênio (Shiratori *et al.*, 1989; Butcher *et al.*, 2000).

Posteriormente, Chisholm *et al.* (1998) analisaram o perfil plasmidial de linhagens de *A. ferrooxidans* isoladas em ambientes ricos em cobre e níquel. A fim de averiguar o papel dos plasmídios no mecanismo de resistência a cobre, uma linhagem de *E. coli* foi transformada com um subclone originário de plasmídio isolado a partir de uma das linhagens com maior nível de resistência a cobre e os transformantes foram cultivados na presença do metal. A presença do plasmídio não contribuiu para o aumento da resistência a cobre em *E. coli*, sendo que em um dos transformantes aparentemente produziu um efeito deletério para o crescimento na presença do metal. De acordo com os autores, estes resultados apontam para três hipóteses: a clivagem do plasmídio levou à inativação de um possível gene associado ao mecanismo de resistência, o gene de resistência não é expresso em *E. coli* ou o plasmídio analisado não carrega gene de resistência, o que remete a um mecanismo de resistência codificado por genes cromossomais.

Como ressalta Natarajan *et al.* (1994), a resistência de *A. ferrooxidans* a metais pesados é importante para sua utilização na biolixiviação, já que durante este processo metais pesados são acumulados no meio, causando a morte de linhagens sensíveis. O estudo dos mecanismos genéticos de resistência a metais pode contribuir para o desenvolvimento de linhagens mais resistentes e portanto mais adequadas para a biolixiviação.

4. Estudo da resposta a fatores de estresse por “fingerprinting” de RNA

Os estudos dos genes relacionados à resposta a fatores de estresse em diversos grupos de organismos têm utilizado análises de “fingerprinting” de RNA (Thélu *et al.*, 1994; Wong & McClelland, 1994; Gong *et al.*, 1996; Corton & Gustafsson, 1997; Fleming *et al.*, 1998; Mathieu-Daudé *et al.*, 1998; Thies *et al.*, 1998; Shepard & Gilmore, 1999; Alemany *et al.*, 2000).

O “fingerprinting” de RNA pode ser obtido através de duas técnicas correlacionadas: RAP-PCR (“RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction”, Welsh *et al.*, 1992) e “display” diferencial (Liang & Pardee, 1992). Os métodos baseiam-se na síntese de cDNA a partir de RNA obtido em duas situações a serem comparadas e amplificação por PCR utilizando “primers” arbitrários no caso do RAP-PCR ou “primers” arbitrários associados com oligonucleotídeos (d)T no “display” diferencial. Os padrões gerados são comparados, permitindo a detecção de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas condições, como por exemplo uma situação de estresse em comparação com a condição controle (Perucho *et al.*, 1995).

Após a identificação e isolamento dos fragmentos gênicos expressos diferencialmente é necessário realizar a confirmação da expressão diferencial, já que é freqüente a ocorrência de falsos positivos (Liang *et al.*, 1993, 1995; Callard *et al.*, 1994; Liang & Pardee, 1995; Fleming *et al.*, 1998; Shepard & Gilmore, 1999).

O método inicialmente proposto para a confirmação da expressão diferencial de fragmentos isolados por “display” diferencial ou RAP-PCR foi o “Northern blot” (Liang & Pardee, 1992; Welsh *et al.*, 1992), que consiste em transferir amostras de RNA de gel de agarose para membrana de nylon e hibridizar utilizando como sonda os fragmentos a serem testados. O “Northern blot” envolve um procedimento laborioso, principalmente em se tratando de um grande número de fragmentos a serem analisados (Liang & Pardee, 1995).

Em vista desta dificuldade, foi proposta a metodologia de “Slot blot” de DNA (Mou *et al.*, 1994). Neste método, os fragmentos são transferidos para membrana

de nylon através do sistema de “Slot blot” e hibridizados com amostras de cDNA obtidas nas condições que se deseja comparar. Mou *et al.* (1994) descreveu a utilização do “Slot blot” de DNA para confirmação da expressão diferencial de fragmentos isolados por “display” diferencial em um estudo comparativo da expressão gênica em células de coração de camundongo em diferentes estágios do desenvolvimento fetal e neonatal. Os autores compararam os resultados obtidos com dados gerados por “Northern blot”, ressaltando as vantagens do “Slot blot”.

O método de RAP-PCR foi utilizado pela primeira vez no estudo da resposta a um fator de estresse em bactéria por Wong & McClelland (1994). Os autores analisaram a resposta ao tratamento com peróxido em *Salmonella typhimurium*. Foi identificado um produto de RAP induzido pelo tratamento ao peróxido, cuja expressão diferencial foi confirmada através de “Northern blot”. O produto foi então mapeado no cromossomo bacteriano, sendo identificadas duas cópias gênicas. Wong & McClelland (1994) destacam que o RAP-PCR é adequado para os estudos em procariotos, já que não utiliza oligonucleotídeos (d)T como “primers”, que anelam na cauda poli(A) dos mRNAs de eucariotos.

Thies *et al.* (1998) utilizaram o método de RAP-PCR para analisar a resposta ao choque térmico em *Campylobacter jejuni*. A confirmação da expressão diferencial do gene identificado foi realizada através de “Northern blot” e “Dot blot” de RNA. Este último método é semelhante ao “Northern blot”, porém neste caso as amostras de RNA são transferidas para membrana de nylon utilizando aparato de “Dot blot” ou “Slot blot”.

Outro exemplo de utilização do RAP-PCR no estudo da resposta a fatores de estresse em procariotos é apresentado por Shepard & Gilmore (1999), que identificaram genes induzidos nas condições de aerobiose e anaerobiose em *Enterococcus faecalis*. Os autores utilizaram o método de RT-PCR para a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos isolados, que consiste em amplificar amostras de cDNA obtidas nas condições a serem comparadas utilizando como “primers” seqüências homólogas aos fragmentos. A ocorrência de produto de amplificação confirma, portanto, a expressão diferencial.

Até o momento, não há relatos de estudos de “fingerprinting” de RNA em *Acidithiobacillus* sp. Uma vez que *A. ferrooxidans* apresenta altos níveis de resistência a metais (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994), as análises do “fingerprinting” de RNA podem ser utilizadas para identificação de fragmentos gênicos induzidos ou reprimidos em resposta a metais presentes no meio de cultivo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da diversidade genética de linhagens de *Acidithiobacillus* isoladas de minas e a caracterização do perfil da expressão gênica diferencial na presença de cobre em *A. ferrooxidans*.

Objetivos específicos

Capítulo 1. Taxonomia polifásica de *Acidithiobacillus* spp.

Artigo 1: Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil

- Análise da diversidade genética de linhagens de *Acidithiobacillus* spp. através de ribotipagem, BOX e ERIC-PCR e hibridização DNA-DNA;
- Análise filogenética de seqüências do gene de rDNA 16S em linhagens de *Acidithiobacillus* spp.;

Capítulo 2. Caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Artigo 2: Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* by RNA arbitrarily primed PCR

- Identificação de seqüências expressas diferencialmente na presença de cobre através da técnica de RAP-PCR;

- Confirmação da expressão diferencial através de experimentos de “Slot blot” de DNA;
- Clonagem e seqüenciamento dos fragmentos diferenciais e comparação com seqüências disponíveis em bancos de dados;

Capítulo 3. Expressão gênica sob vários fatores de estresse de produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cobre e análise da presença/ausência dos genes em diferentes linhagens

- Comparação por “Slot blot” de RNA da expressão dos produtos de RAP-PCR em uma linhagem de *A. ferrooxidans* submetida a diversas situações de estresse, como presença de zinco, cádmio, alteração no pH do meio e na temperatura;
- Comparação dos padrões de expressão das seqüências diferenciais através de “Slot blot” de RNA entre duas linhagens;
- Comparação dos padrões de hibridização por “Southern blot” dos produtos de RAP-PCR em várias linhagens de *Acidithiobacillus* spp.

Taxonomía polifásica de
***Acidithiobacillus* spp.**

Artigo 1

Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil

Aceito para publicação na revista Antonie Van Leeuwenhoek

Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil

Luciana Campos Paulino¹, Rogério Faria Bergamo¹, Maricilda P. de Mello¹,
Oswaldo Garcia Jr.², Gilson P. Manfio³ & 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

³Coleção de Culturas Tropical (CCT), Fundação André Tosello, Campinas, 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

Abstract

Nineteen strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*, including 12 strains isolated from coal, copper, gold and uranium mines in Brazil, strains isolated from similar sources in other countries and the type strains of the two species were characterized together with the type strain of *A. caldus* by using a combination of molecular systematic methods, namely ribotyping, BOX- and ERIC-PCR and DNA-DNA hybridization assays. Data derived from the molecular fingerprinting analyses showed that the tested strains encompassed a high degree of genetic variability. Two of the Brazilian *A. ferrooxidans* organisms (strains SSP and PCE) isolated from acid coal mine waste and uranium mine effluent, respectively, and *A. thiooxidans* strain DAMS, isolated from uranium mine effluent, were the most genetically divergent organisms. The DNA-DNA hybridization data did not support the allocation of *Acidithiobacillus* strain SSP to the *A. ferrooxidans* genomic species, as it shared only just over 40% DNA relatedness with the type strain of the species. *Acidithiobacillus* strain SSP was not clearly related to *A. ferrooxidans* in the 16S rDNA tree.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, DNA-DNA homology, genetic diversity, rep-PCR, ribotyping, 16S rDNA sequence analysis

Introduction

The genus *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood 2000) accommodates a polyphyletic group of Gram-negative, rod-shaped bacteria which derive energy from the oxidation of reduced sulfur compounds. *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Colmer et al. 1950; Temple & Colmer 1951) is the only species of the genus that is also capable of deriving energy from ferrous iron. These obligatory acidophilic, ubiquitously distributed bacteria have been isolated from a wide range of sulfur-containing mineral deposits (Leduc & Ferroni 1994; Rawlings & Kusano 1994). *Acidithiobacillus thiooxidans* (Hutchins et al. 1986) accommodates a group of morphologically and physiologically diverse sulfur-oxidizing bacteria which probably belong to more than one species (Harrison 1982, 1984). *A. ferrooxidans* strains are considered to have an important role in metal bioleaching processes (Hutchins et al. 1986) though other ferrous or sulfur oxidizing bacteria may play significant roles in these processes (Pizarro et al. 1996).

Industrial heap bioleaching, targeting mainly copper and uranium recovery, and stirred reactor processes for the recovery of valuable metals (e.g., gold and silver) represent a global market estimated to be about US\$ 10 billion in 1998 (Johnson 1999). The optimization of such processes requires knowledge of the key microbial species involved in and associated with bioleaching processes. Moreover, taxonomic and physiological characterization of microorganisms involved in oxidative dissolution of metallic sulfides is also extremely important for understanding perturbations in natural environments resulting from acid mine drainage (Brierley 1999; Bruhn et al. 1999; Kondratyeva et al. 1999; Rawlings 1999; Rawlings et al. 1999).

In Brazil, recovery of gold from sulfide minerals using bacterial oxidation processes is used by private companies, such as São Bento Mineração, a subsidiary of the South African company Gencor established in 1990's. By 1998, the production of gold by bacterial treatment reached 30% of the total production (around 4 tons/year). However, very little is known about the Brazilian strains of acidithiobacilli involved in these processes. A few reports have focused on the

genetic characterization of acidithiobacilli isolated from mine wastes by using different molecular systematic methods, including DNA-DNA hybridization, determination of the G+C content of DNA, and phylogenetic analysis of 16S rDNA (Harrison 1982; Lane et al. 1992; Pizarro et al. 1996). Among these, PCR based methods, including RAPD (Novo et al. 1996; Selenska-Pobell et al. 1998), polymorphism analysis of 16S-23S rDNA spacer regions (Pizarro et al. 1996), BOX- and ERIC-PCR (Selenska-Pobell et al. 1998) have been shown to be particularly useful for both specific and infra-specific discrimination of strains.

The primary aim of the present study was to determine the genetic diversity of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains, isolated from coal, copper, gold and uranium mine wastes in Brazil, using a combination of molecular systematic methods, notably ribotyping, BOX- and ERIC-PCR and DNA-DNA relatedness assays. In addition, comparison with the diversity of *Acidithiobacillus* strains isolated from similar sources in other countries was accomplished. A 16S rDNA sequence analysis was performed to demonstrate the taxonomic status of the strain SSP, originally assigned to *A. ferrooxidans*.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The source and strain histories of the acidithiobacilli are shown in Table 1. The *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains were grown at 30°C in modified T&K medium supplemented with either Fe²⁺ or elemental sulfur as energy sources for growth (Tuovinen & Kelly 1973). *A. caldus* DSM 8584^T was cultivated at 45°C in modified T&K medium supplemented with elemental sulfur.

Isolation of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from the tested strains using DNAzol reagent (Gibco BRL) following the specifications of the manufacturer. The DNA was stored at 4°C.

Ribotyping

Genomic DNA preparations (2 µg) were digested either with *Bam*H I or *Hind* III, as recommended by the manufacturer (Gibco BRL). The resultant fragments were separated by electrophoresis on 0.8% agarose 1 X TAE gels and transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham), as previously described (Sambrook et al. 1989). 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 µg/ml denatured salmon sperm DNA, and 10 X Denhardt's solution (Sambrook et al. 1989). The ribotyping probe consisted of a 7.2 Kb fragment containing the 5S, 16S and 23S rDNA operon from *Streptomyces lividans* (Zarko-Postawka et al. 1997). Approximately 50 ng of the probe were labeled with [α -³²P]dATP using a commercial kit (Megaprime, Amersham). 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 µg/ml denatured salmon sperm DNA, 2 X Denhardt's solution and 10⁷-10⁸ cpm/ml of the denatured probe. After hybridization, the membranes were washed as follows: two 5 min washes at room temperature in a solution containing 2 X SSC and 0.5% SDS; 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.

rep-PCR amplifications and data analysis

The BOX-PCR reactions were carried out essentially as described by Sadowsky et al. (1996), that is, in 25 µl reaction mixtures containing 10 ng DNA, 50 pmol primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'; Martin et al. 1992), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1 X PCR buffer (Gibco BRL) and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL). ERIC-PCR reactions were performed, with minor modifications, as described by Versalovic et al. (1991). The

reaction mixtures (25 µl) contained 30 ng DNA, 25 pmol primer ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; Hulton et al. 1991), 25 pmol primer ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'; Hulton et al. 1991), 2.5 mM MgCl₂, 0.3 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1 X PCR buffer (Gibco BRL) and 1 U *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL).

The PCR reactions were carried out, in duplicate, using a Perkin-Elmer model 2400 thermal cycler. The amplification conditions included an initial denaturation at 95°C for 7 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min; annealing at either 53°C (BOX-PCR) or 52°C (ERIC-PCR) for 1 min; and amplification at either 56°C (BOX-PCR) or 65°C (ERIC-PCR) for 8 min, followed by a final extension at 65°C for 16 min. The amplification products (12.5 µl) were separated by electrophoresis on 1.5% agarose 1 X TAE gels. The gels were stained with ethidium bromide and photographed under UV (Sambrook et al. 1989). Each amplified band was treated as a unit character and scored as 1 (present) or 0 (absent) for all of the tested strains. Similarity among the strains was determined by using the Jaccard coefficient (Jaccard 1908) and clustering achieved using the UPGMA algorithm (Sokal & Michener 1958); the analyses were performed using NTSYS-pc software (Rohlf 1989).

DNA-DNA hybridization

Two hundred ng of genomic DNA from the tested strains were denatured at 100°C for 10 min then transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham) using a slot blot apparatus (Gibco BRL). The membranes were prehybridized at 42°C for 2 h in a hybridization solution containing 50% deionized formamide, 5 X SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-laurylsarcosine and 2% blocking solution (Boehringer Mannheim). The membranes were hybridized with digoxigenin-labeled genomic DNA (DIG DNA labeling kit, Boehringer Mannheim) from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T. Hybridization was carried out at 42°C, overnight, in a hybridization solution containing 15 ng/ml of the labeled probe. After hybridization, the membranes were washed twice in 2 X SSC, 0.1% SDS for 5 min at room temperature and twice in

0.1 X SSC, 0.1% SDS for 15 min, at 68°C, that is, under highly stringent washing conditions.

Hybridization signals were detected by using a DIG luminescent detection kit (Boehringer Mannheim) and by exposure of the membranes to X-ray films (Amersham). The DNA hybridization experiments were performed in triplicate and the amount of DNA immobilized onto the membranes normalized by a previous hybridization with a 16S rDNA probe amplified from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, as described elsewhere (Gonçalves & Rosato 2000). Individual hybridization signals were quantified by laser densitometry (LKB, Broma), normalized and calculated as the percentage DNA relatedness relative to the signal from the *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T DNA.

16S rDNA sequencing and phylogenetic analysis

The 16S rDNA fragments of *A. ferrooxidans* strains ATCC 23270^T and SSP were amplified by PCR in 50 µl reaction mixtures containing 100 ng DNA, 0,4 µM primer 27f (Lane 1991), 0,4 µM primer 1525r (Lane 1991), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1 X PCR buffer (Gibco BRL) and 1.0 U *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL). The amplification conditions included an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min; 57°C for 3 min; 72°C for 3 min and a final extension at 72°C for 10 min.

Sequencing of 16S rDNA was accomplished by using a combination of internal sequencing primers according to Lane (1991), using the Thermo Sequenase primer cycle sequencing kit on an ALF Express sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, USA). The sequences were aligned using the Clustal W program (Thompson et al. 1994) and the alignment revised by eye. Phylogenetic analysis was performed by using the PHYLIP software package (Felsenstein 1988). A distance matrix was obtained by using DNADIST with the Jukes/Cantor algorithm (Jukes & Cantor 1969). The neighbor-joining algorithm (Saitou & Nei 1987) was used to generate a phylogenetic tree (NEIGHBOR) and bootstrap

values calculated from 1000 replicated using the SEQBOOT and CONSENSE software.

Results and discussion

Several approaches have been used to determine the genetic variability of *Acidithiobacillus* spp. (Harrison 1982; Novo et al. 1996; Pizarro et al. 1996; Selenska-Pobell et al. 1998) though little information is available for Brazilian strains, despite their importance in industrial leaching applications in the country.

Ribotyping

Total DNA preparations from *A. caldus* DSM 8584^T and from the *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains were digested with either *Bam*H I or *Hind* III thereby generating species-specific ribotypes (Figure 1) when hybridized with the rDNA probe. The acidithiobacilli were assigned to five different clusters, ribotypes I to V, given the profiles obtained with *Bam*H I (Figure 1a, Table 2). The *A. ferrooxidans* strains were assigned to two ribotype groups (Table 2), the first of which encompassed *A. ferrooxidans* strains ATCC 23270^T, FG460, CMV, CF3, S, T22, I35, AMF, LR, SJ22 and PM (Figure 1a, lane 1) and the second strains PCE and SSP (Figure 1a, lane 2). All of the *A. thiooxidans* strains yielded a unique profile using the enzyme *Bam*H I. The *A. thiooxidans* strains were assigned to ribotype group III (Figure 1a, lane 3) whereas *A. caldus* DSM 8584^T showed a distinct banding pattern, ribotype IV, with *Bam*H I (Figure 1a, lane 4).

Seven distinct ribotype patterns, V to XI, were obtained from the *Hind* III genomic digests (Figure 1b; Table 2). The *A. ferrooxidans* strains were assigned to ribotypes V, VI and VII. Strains previously assigned to *Bam*H I ribotype group I were recovered as *Hind* III ribotype group V (Figure 1a, lane 1; Figure 1b, lane 5). Strains PCE and SSP were classified in ribotype groups VI and VII, respectively (Figure 1b, lanes 6 and 7). The *A. thiooxidans* strains were separated into three different ribotypes using *Hind* III (Figure 1b, lanes 8, 9 and 10). *A. thiooxidans* ATCC 19377^T was assigned to ribotype VIII (Figure 1b, lane 8) whereas the

remaining strains, isolated from Brazilian mines, formed ribotype groups IX (MMCE and DAMS) and X (FG01, MF and ELC) (Figure 1b, lanes 9 and 10). *A. caldus* DSM 8584^T was assigned to ribotype group XI (Figure 1b, lane 11).

rep-PCR

Genomic fingerprints were also generated using BOX and ERIC-PCR. The amplification profiles obtained by using the BOXA1R and the ERIC1R/ERIC2 primers are illustrated in Figures 2a and 2b, respectively. It was encouraging that the PCR reactions, which were performed in duplicate, gave reproducible results. Complex fingerprints were obtained for all of the strains with either the BOX or ERIC primers. BOX-PCR yielded fingerprints with bands ranging from 500 bp to 3 Kb whereas the ERIC profiles encompassed bands ranging from 300 bp to 5 Kb.

Data matrices consisting of 24 BOX-PCR and 28 ERIC-PCR bands, were respectively subjected to cluster analyses (Jaccard) and resulting similarity data used to generate the UPGMA dendrograms shown in Figure 2c and 2d, respectively. The combined BOX and ERIC-PCR data were examined in the same way; the results of this analysis are depicted in Figure 3.

A high genetic diversity was found between both the strains and species as shown in Figures 2c and 2d. An exception was observed for *A. ferrooxidans* strains FG460, CMV, I35 and PM as they showed identical ERIC-PCR fingerprints (Figure 2b) but were differentiated in the BOX-PCR analyses (Figures 2a and 2c). Strains CMV and I35 were included in the same cluster in the BOX-PCR analyses; the average similarity between these strains and strain FG460 was 83.7%. Strain PM was the most divergent in the BOX-PCR analyses (Figure 2c). This strain showed a closer relationship to *A. caldus* DSM 8584^T and to the *A. thiooxidans* strains than to the *A. ferrooxidans* strains. It is interesting that *A. ferrooxidans* strains FG460, CMV, I35 and PM were also recovered, together with most of the *A. ferrooxidans* strains, in *Bam*H I Ribotype I and *Hind* III Ribotype V (Figure 1; Table 2).

The *A. ferrooxidans* strains were assigned to two major groups in the combined BOX and ERIC-PCR data analysis (Figure 3). Group 1 included *A.*

ferrooxidans strains ATCC 23270^T, FG460, CMV, I35, SJ22, CF3, LR, AMF, S, T22 and PM and Group 2 strains SSP and PCE. The strains in Group 1 were recovered in *Bam*H I Ribotype I (Figure 1a; Table 2) and *Hind* III Ribotype V (Figure 1b; Table 2). The two strains from Group 2 were assigned to *Bam*H I Ribotype II (Figure 1a; Table 2), but were separated by *Hind* III into two different ribotypes (Figure 1b; Table 2). The similarity between the *A. ferrooxidans* Group 1 and 2 strains was 12.6% (Figure 3). Strain PM was the most divergent organism in Group 1 (29.3% of similarity). The average similarity between the two Group 2 strains was 60% (Figure 3) compared with average similarity values of 81% and 40.5% in the individual BOX and ERIC-PCR analyses (Figures 2c and 2d). The analysis of the individual and combined BOX and ERIC-PCR data, as well as the ribotyping data, indicated a high genetic variability among the *A. ferrooxidans* strains. The most divergent strains were *A. ferrooxidans* SSP and PCE.

The most divergent *A. thiooxidans* strain based on the BOX data was *A. thiooxidans* DAMS; the most divergent organism in the ERIC-PCR analyses were strains DAMS and MMCE (33.7% and 41.2% average similarity, respectively, Figures 2c and 2d). The average similarity between *A. thiooxidans* DAMS and MMCE, according to the ERIC-PCR data, was 55.5% (Figure 2d). *A. thiooxidans* DAMS was also found to be the most divergent strain in the combined BOX and ERIC-PCR data analysis (36.5% average similarity, Figure 3).

A low degree of similarity was observed in the combined BOX and ERIC-PCR data set (Figure 3) for *A. caldus* DSM 8584^T and the *A. ferrooxidans* (7.5% average similarity) and *A. thiooxidans* strains (14% average similarity). These results are in accordance with the results of the ribotyping analyses in which *A. caldus* DSM 8584^T was assigned to unique ribotypes (*Bam*H I Ribotype IV and *Hind* III Ribotype XI; Table 2; Figure 1, lanes 4 and 11).

The results of the present study show that PCR-based fingerprinting techniques are more sensitive and rapid than ribotyping with respect to the differentiation of the strains. Ribotyping is a laborious method that involves hybridization procedures and requires larger amounts of DNA than PCR. The advantage of PCR-based methods in determining the genetic diversity of bacteria

has been mentioned by others (Pooler et al. 1996; Selenska-Pobell et al. 1998; Versalovic et al. 1991; Vinuesa et al. 1998).

No correlation was found between the genetic relatedness of the acidithiobacilli and either the geographic location or type of environment/sample from which the strains were isolated. Strains isolated from distinct environments, such as *A. ferrooxidans* SJ22, CF3, LR, AMF and S, which were from pyrite, cobalt, uranium, coal and copper mines, respectively, located in different geographical areas, showed identical BOX- and ERIC-PCR profiles. Similarly, *A. thiooxidans* strains MF, ELC and FG01, which also gave identical rep-PCR profiles, were isolated from coal (MF and ELC) and uranium (FG01) mines. However, it is interesting that these three latter strains came from the same geographical area, namely Figueira, in the State of Paraná (Southern Brazil).

DNA-DNA relatedness

The ribotyping, BOX-PCR and ERIC-PCR data show that *A. ferrooxidans* strains SSP and PCE can be readily distinguished from the remaining *A. ferrooxidans* strains. Consequently, a DNA-DNA hybridization experiment was performed to determine the level of DNA relatedness between strains SSP and PCE and the *A. ferrooxidans* type strain. DNA from all the tested strains was included in the hybridization experiments. The results of the hybridization studies are shown in Figure 4. All of the *A. ferrooxidans* strains, except SSP and PCE, showed DNA relatedness values higher than 90% with reference DNA from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; strains SSP and PCE showed DNA similarity values of 40.7% and 77.6% against reference DNA from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T (Figure 4, lanes 2 and 3).

Strain SSP was isolated by enrichment culture from acid drainage, from a coal mine in Brazil, using acidiphilic selective isolation conditions. In this particular case, single colony isolation in an agarose gel (Garcia et al. 1992) was performed and all of the relevant physiological characterization tests for *A. ferrooxidans* carried out. Despite the high phenotypical/physiological similarity of this strain with

A. ferrooxidans ATCC 23270^T the taxonomic assignment of SSP should be revised as DNA relatedness data show that it falls below the 70% cut-off point for inclusion in this species (Wayne et al. 1987). Strain SSP should, therefore, be referred to as *Acidithiobacillus* sp. until further data are acquired to describe this organism as a new species. In contrast, the DNA relatedness found between strain PCE and *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T show that they belong to the same genomic species.

Low homology levels were observed when the *A. ferrooxidans* type strain was hybridized with both the *A. thiooxidans* strains and *A. caldus* DSM 8584^T. The hybridization result found when the type strain of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* were compared is shown in Figure 4, lane 4; the relatedness between these two strains was recorded as 12.4%. The relatedness between *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T and *A. caldus* DSM 8584^T was 11.0%.

16S rDNA sequencing

Nearly complete 16S rDNA sequences were obtained for *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T and *Acidithiobacillus* strain SSP. These sequences carry Genbank accession number AF329205 and AF329204, respectively. The nearly complete sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T upgrades available partial sequences deposited at Genbank (M79404, M79405 and M79406).

Acidithiobacillus sp. strain SSP showed a 98.2% (1420/1446) overall sequence similarity with *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T (Table 3). In the phylogenetic sequence analysis (Figure 5), the *A. caldus* and an *A. thiooxidans* strain formed a distinct phyletic line supported by a high bootstrap value. *Acidithiobacillus* sp. SSP and some *A. ferrooxidans* strains were found to form a separate subclade from the remaining *A. ferrooxidans* strains. These data suggest that these strains may represent a new species of *Acidithiobacillus* with similar phenotypic properties to *A. ferrooxidans*. Additional data need to be acquired before this taxon can be described as a new *Acidithiobacillus* species.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. O. H. Tuovinen for providing *A. ferrooxidans* strain I35, to Dr. B. Johnson for *A. ferrooxidans* strains PM, SJ22, T22 and CF3, and to R. Liberato for *A. ferrooxidans* strain CMV. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 97/1069-0) and the BIOTA/FAPESP Program (98/05068-0). L. C. P. received a postgraduate fellowship from FAPESP (97/12549-2) and R. F. B. a technical fellowship from FAPESP (98/04426-0). We also acknowledge CNPq-Brazil for the research fellowship awarded to O. G. Jr.

References

- Brierley CL (1999) Bacterial succession in bioheap leaching. In: Amils R & Ballester A (Eds) Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part-A (pp 91-98). Elsevier, Amsterdam
- Bruhn DF, Thompson DN & Noah KS (1999) Microbial ecology assesment of a mixed copper/sulfide dump leaching operation. Amils R & Ballester A (Eds) Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part-A (pp 799-808). Elsevier, Amsterdam
- Colmer AR, Temple KL & Hinkle ME (1950) An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. J. Bacteriol. 59: 317-328
- Felsenstein J (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. Annu. Rev. Genet. 22: 521-565
- Garcia Jr. O (1991) Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. Rev. Microbiol. 22: 1-6
- Garcia Jr. O, Mukai JK & Andrade CB (1992) Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. Gen. Appl. Microbiol. 38: 279-282

- Gonçalves ER & Rosato YB (2000) Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 811-821
- Harrison Jr. AP (1982) Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* 131: 68-76
- Harrison Jr. AP (1984) The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 265-292
- Hulton CS, Higgins CF & Sharp PM (1991) ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834
- Hutchins SR, Davidson MS, Brierley JA & Brierley CL (1986) Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 311-336
- Jaccard P (1908) Nouvelle recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Naturelle* 44 : 223-270
- Johnson DB (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* (pp 645-656). Elsevier, Amsterdam
- Jukes TH & Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN (Ed) *Mammalian protein metabolism* (pp 21-132). New York, Academic Press
- Kelly DP & Wood AP (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
- Kondratyeva TF, Pivovarova TA, Muntyan LN & Karavaiko GI (1999) Strain diversity of *Thiobacillus ferrooxidans* and its significance in biohydrometallurgy. In: Amils R & Ballester A (Eds) *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century, part-B* (pp 89-98). Elsevier, Amsterdam
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E & Goodfellow M (Eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. (pp 177-203). Wiley, Chichester

- Lane DJ, Harrison Jr AP, Stahl D, Pace B, Giovannoni SJ, Olsen GJ & Pace NR (1992) Evolutionary relationships among sulfur- and iron- oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174: 269-278
- Leduc LG & Ferroni GD (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 103-120
- Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Morrison DA, Boulnois J & Claverys JP (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483
- Novo MTM, Souza AP, Garcia Jr O & Ottoboni LMM (1996) RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 91-95
- Pizarro J, Jedlicki E, Orellana O, Romero J & Espejo RT (1996) Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1323-1328
- Pooler MR, Ritchie DF & Hartung JS (1996) Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3121-3127
- Rawlings DE (1999) The molecular genetics of mesophilic, chemolithotrophic iron- or sulfur-oxidizing microorganisms. In: Amils R & Ballester A (Eds) *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*, part-B (pp 645-656). Elsevier, Amsterdam
- Rawlings DE & Kusano T (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58: 39-55
- Rawlings DE, Coram NJ, Gardner MN & Deane SM (1999) *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. In: Amils R & Ballester A (Eds) *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*, part-A (pp 777-786). Elsevier, Amsterdam

- Rohlf FJ (1989) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50- New York Exeter Publ., N.Y.
- Sadowsky MJ, Kinkel LL, Bowers JH & Schottel JL (1996) Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3489-3493
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis TE (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Selenska-Pobell S, Otto A & Kutschke S (1998) Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and REP-APD. J. Appl. Microbiol. 84: 1085-1091
- Sokal RR & Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. Kans Univ. Sci. Bull. 38: 1409-1438
- Temple KL & Colmer AR (1951) An autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 62: 605-611
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
- Tuovinen OH & Kelly DP (1973) Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with ¹⁴CO₂ fixation and iron oxidation as measures of growth. Arch. Microbiol. 88: 285-298
- Versalovic J, Koeuth T & Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823-6831
- Vinuesa P, Rademaker JL, De Bruijn FJ & Werner D (1998) Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic

- spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2096-2104
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP & Trüper HG (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 463-464
- Zarko-Postawka M, Hunderuk M, Mordarski M & Zakrzewska-Czerwinska J (1997) Organization and nucleotide sequence analysis of the ribosomal gene set (rrnB) from *Streptomyces lividans*. Gene 185: 231-237

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)
CMV	Effluent of gold mine from the Morro Velho Company, State of Minas Gerais, Brazil (received from R. Liberato)
S	Effluent of column leaching of copper ore from Surubim mine (Caraíba), State of Bahia, Brazil
AMF	Coal mine of the Carbonífera Cambuí Company, Figueira, State of Paraná, Brazil
I35	Received from Dr. Olli H. Tuovinen (Ohio State University, USA)
SSP	Acid drainage from coal mine wastes from Siderópolis, State of Santa Catarina, Brazil (Garcia 1991)
PM	Copper ore from Parys mine, Anglesey, Wales, UK (received from Dr. Barrie Johnson)
SJ22, T22	Pyrite from Cae Coch mine, Trefriw, Wales, UK (received from Dr. Barrie Johnson)
CF3	Noranda Blackbird Cobalt mine, Idaho, USA (received from Dr. Barrie Johnson)
PCE	Effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil (Garcia 1991)
<i>A. thiooxidans</i>	
ATCC 19377 ^T	Type strain from ATCC ¹ , USA. Isolated from Kimmeridge clay, Dorset, England, UK
FG01	Effluent of column leaching of uranium mine from Figueira, State of Paraná, Brazil (Garcia 1991)
ELC	Acid drainage of coal mine from Figueira, State of Paraná, Brazil (Garcia 1991)
DAMS	Effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil
MF	Effluent of coal mine of Carbonífera Cambuí Company, Figueira, State of Paraná, Brazil
MMCE	Effluent of column leaching of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil
<i>A. caldus</i>	
DSM 584 ^T	Type strain from DSM ² . Isolated from coal spoils, UK

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

² Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany.

Table 2: Ribotype groups generated by digestion with either *Bam*H I or *Hind* III and the restriction fragment sizes

Ribotype groups	Fragment sizes (Kb)	Strains
<i>Bam</i> H I ribotypes		
I	10.9, 9.6	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 ^T , FG460, CMV, CF3, S, T22, I35, AMF, LR, SJ22, PM
II	13.4, 11.3	<i>A. ferrooxidans</i> PCE, SSP
III	7.0	<i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 ^T , MMCE, MF, ELC, DAMS, FG01
IV	6.0, 5.0	<i>A. caldus</i> DSM 8584 ^T
<i>Hind</i> III ribotypes		
V	8.4, 5.3, 2.5, 1.2	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 ^T , FG460, CMV, CF3, S, T22, I35, AMF, LR, SJ22, PM
VI	11.0, 9.2, 3.7, 1.2	<i>A. ferrooxidans</i> PCE
VII	12.8, 9.4, 4.2, 3.7, 1.2	<i>A. ferrooxidans</i> SSP
VIII	12.3, 7.5, 3.8, 1.2	<i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 ^T
IX	7.4, 3.5, 2.3, 1.2	<i>A. thiooxidans</i> MMCE, DAMS
X	7.7, 2.3, 1.2	<i>A. thiooxidans</i> MF, ELC, FG01
XI	10.5, 5.9	<i>A. caldus</i> DSM 8584 ^T

Table 3. Overall similarity (%) and number of nucleotide differences in relation to sequence length (values on the lower left and the upper right, respectively) between the 16S rDNA sequences of the acidithiobacilli strains studied and other phylogenetically related organisms.

Organisms	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>A. ferrooxidans</i> DSM 9465	---	18/1484	12/1465	30/1458	35/1469	6/1325	43/1383	6/1331	25/1328	21/1319	21/1288	63/1448	63/1446	65/1456	54/1335	43/1243	12/1401	175/13
2. <i>Acidithiobacillus</i> sp. SSP	98.77	---	26/1482	35/1468	39/1469	18/1322	49/1391	11/1327	29/1325	6/1316	6/1285	64/1446	66/1456	66/1454	54/1332	50/1241	26/1446	176/13
3. <i>A. ferrooxidans</i> NASF-1	99.18	98.25	---	40/1468	41/1460	11/1326	50/1394	16/1331	32/1329	25/1320	25/1289	72/1448	71/1459	74/1449	63/1333	51/1243	17/1432	180/13
4. <i>A. thiooxidans</i> ATCC 19371	97.94	97.62	97.28	---	3/1463	24/1326	14/1395	24/1331	2/1329	34/1320	34/1289	66/1450	67/1459	68/1453	61/1336	54/1244	34/1415	179/13
5. <i>Thiobacillus</i> sp. N-Fe3	97.62	97.35	97.19	99.79	---	24/1326	15/1388	25/1331	3/1329	34/1320	34/1289	67/1450	67/1451	71/1458	61/1336	56/1244	34/1406	180/13
6. <i>A. ferrooxidans</i> N-Fe3	99.55	98.64	99.17	98.19	98.19	---	36/1256	12/1325	23/1326	22/1320	22/1289	60/1325	55/1319	58/1326	55/1325	43/1231	6/1274	171/12
7. <i>Thiobacillus</i> sp. Fras2	96.89	96.48	96.41	99.00	98.92	97.13	---	36/1261	14/1259	46/1250	46/1243	71/1377	74/1389	76/1378	68/1261	63/1228	48/1390	187/13
8. <i>A. ferrooxidans</i> N-Fe4	99.55	99.17	98.80	98.20	98.12	99.09	97.15	---	23/1328	15/1319	15/1288	57/1330	54/1324	57/1331	54/1329	48/1236	18/1279	167/12
9. <i>A. thiooxidans</i> B-S3	98.12	97.81	97.59	98.85	99.77	98.27	98.89	98.27	---	33/1320	33/1289	63/1328	60/1322	63/1329	60/1328	53/1234	29/1277	172/12
10. <i>A. ferrooxidans</i> N-Fe2	98.41	99.54	98.11	97.42	97.42	98.33	96.32	98.86	97.50	---	0/1288	61/1319	58/1313	59/1320	58/1319	53/1225	28/1268	173/12
11. environmental clone OS1	98.37	99.53	98.06	97.36	97.36	98.29	96.30	98.84	97.44	100.00	---	61/1288	58/1284	59/1289	58/1288	53/1218	28/1260	172/12
12. <i>A. caldus</i> GO1	95.65	95.57	95.03	95.45	95.38	95.47	94.84	95.71	95.26	95.38	95.26	---	18/1442	20/1452	15/1335	46/1243	66/1395	169/13
13. <i>A. caldus</i> TC1	95.64	95.47	95.13	95.41	95.38	95.83	94.67	95.92	95.46	95.58	95.48	98.75	---	5/1443	0/1326	45/1239	67/1411	171/13
14. <i>A. caldus</i> DSM 8594 ¹	95.54	95.46	94.89	95.32	95.13	95.63	94.48	95.72	95.26	95.53	95.42	98.62	99.65	---	3/1338	48/1244	67/1396	174/13
15. <i>A. thiooxidans</i> sp. DSM 612	95.96	95.95	95.27	95.43	95.43	95.85	94.61	95.94	95.48	95.60	95.50	98.88	100.00	99.78	---	44/1236	56/1279	162/12
16. <i>Thiobacillus</i> sp. DSM 612	96.54	95.97	95.90	95.66	95.50	96.51	94.87	96.12	95.71	95.67	95.65	96.30	96.37	96.14	96.44	---	50/1239	162/12
17. <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 ¹	99.14	98.20	98.81	97.60	97.58	99.53	96.55	98.59	97.73	97.79	97.78	95.27	95.25	95.20	95.62	95.96	---	182/13
18. <i>N. oceanus</i> C27	86.91	86.84	86.54	86.62	86.55	86.45	85.84	86.82	86.40	86.23	86.22	87.36	87.17	87.00	87.21	86.88	86.35	---

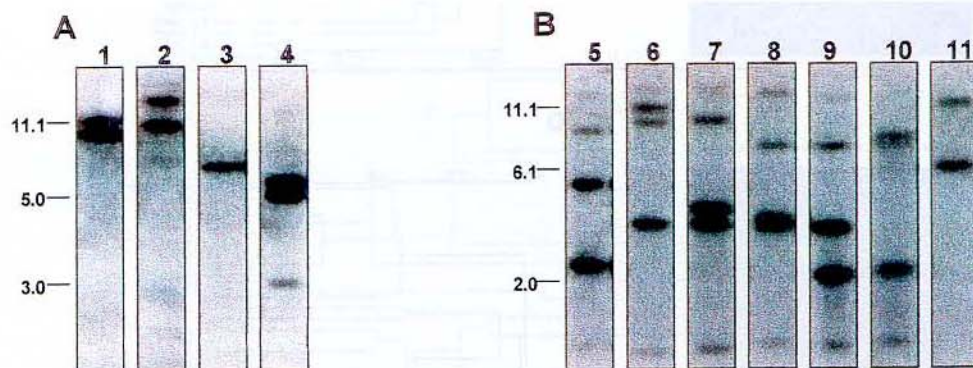


Figure 1. Ribotype patterns obtained by digestion of genomic DNA with *Bam*H I (a) and *Hind* III (b) and hybridization with a rDNA probe. (1) Ribotype I, (2) Ribotype II, (3) Ribotype III, (4) Ribotype IV, (5) Ribotype V, (6) Ribotype VI, (7) Ribotype VII, (8) Ribotype VIII, (9) Ribotype IX, (10) Ribotype X, (11) Ribotype XI. The molecular weight values (Kb) correspond to the 1 Kb DNA ladder (Gibco BRL).

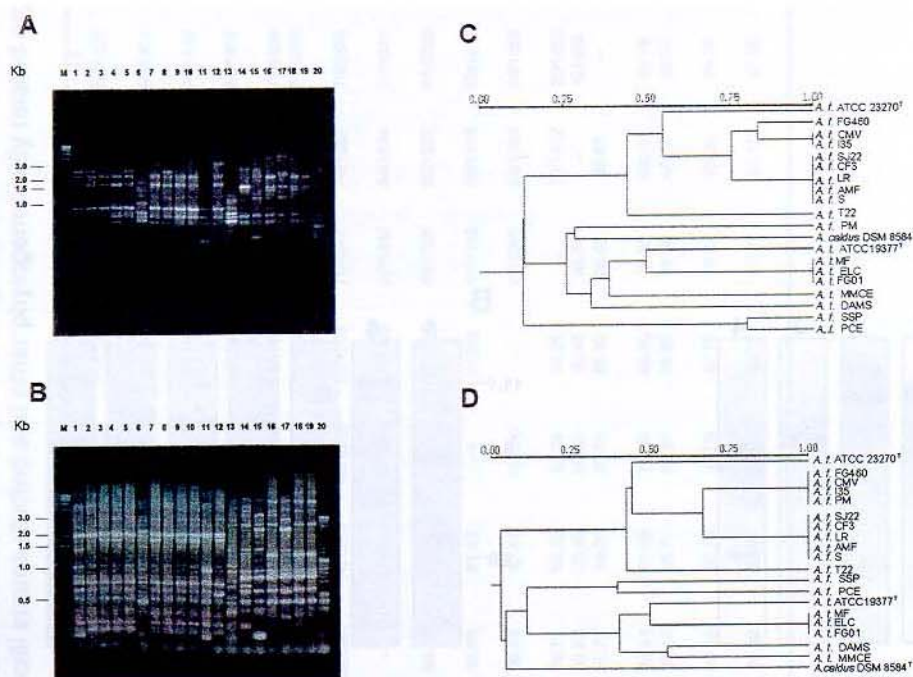


Figure 2. BOX-PCR (a) and ERIC-PCR (b) fingerprint patterns of *A. ferrooxidans* (lanes 1 to 13), *A. thiooxidans* (lanes 14 to 19) and *A. caldus* (lane 20). (1) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, (2) FG460, (3) SJ22, (4) CF3, (5) CMV, (6) SSP, (7) LR, (8) I35, (9) AMF, (10) S, (11) PM, (12) T22, (13) PCE, (14) *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, (15) DAMS, (16) MF, (17) MMCE, (18) ELC, (19) FG-01, (20) *A. caldus* DSM 8584^T, (M) 1 Kb DNA ladder (Gibco BRL). The dendrogram are based on the UPGMA cluster analysis of the BOX-PCR (c) and ERIC-PCR (d) data; the percent similarity is given at the top.

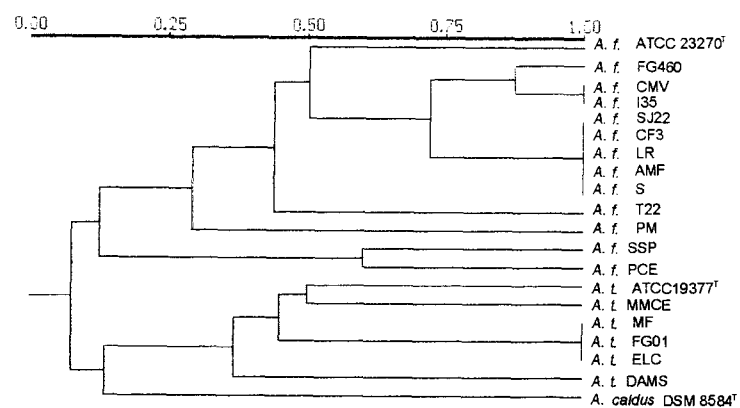


Figure 3. Dendrogram based on the UPGMA cluster analysis of the combined BOX and ERIC-PCR data; the percent similarity is given at the top.

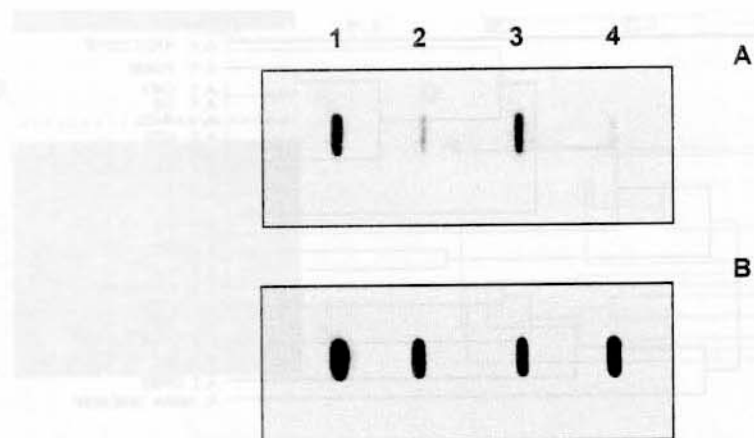


Figure 4. DNA-DNA hybridization of genomic DNA probed with DNA from *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T (a) and a 16S rDNA fragment (b). (1) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T, (2) *A. ferrooxidans* strain SSP, (3) *A. ferrooxidans* strain PCE, (4) *A. thiooxidans* ATCC 19377^T. The dendrogram are based on the UPGMA cluster analysis of the BOX-PCR (a) and ERIC-PCR (b) data. The percent similarity is given at the top.

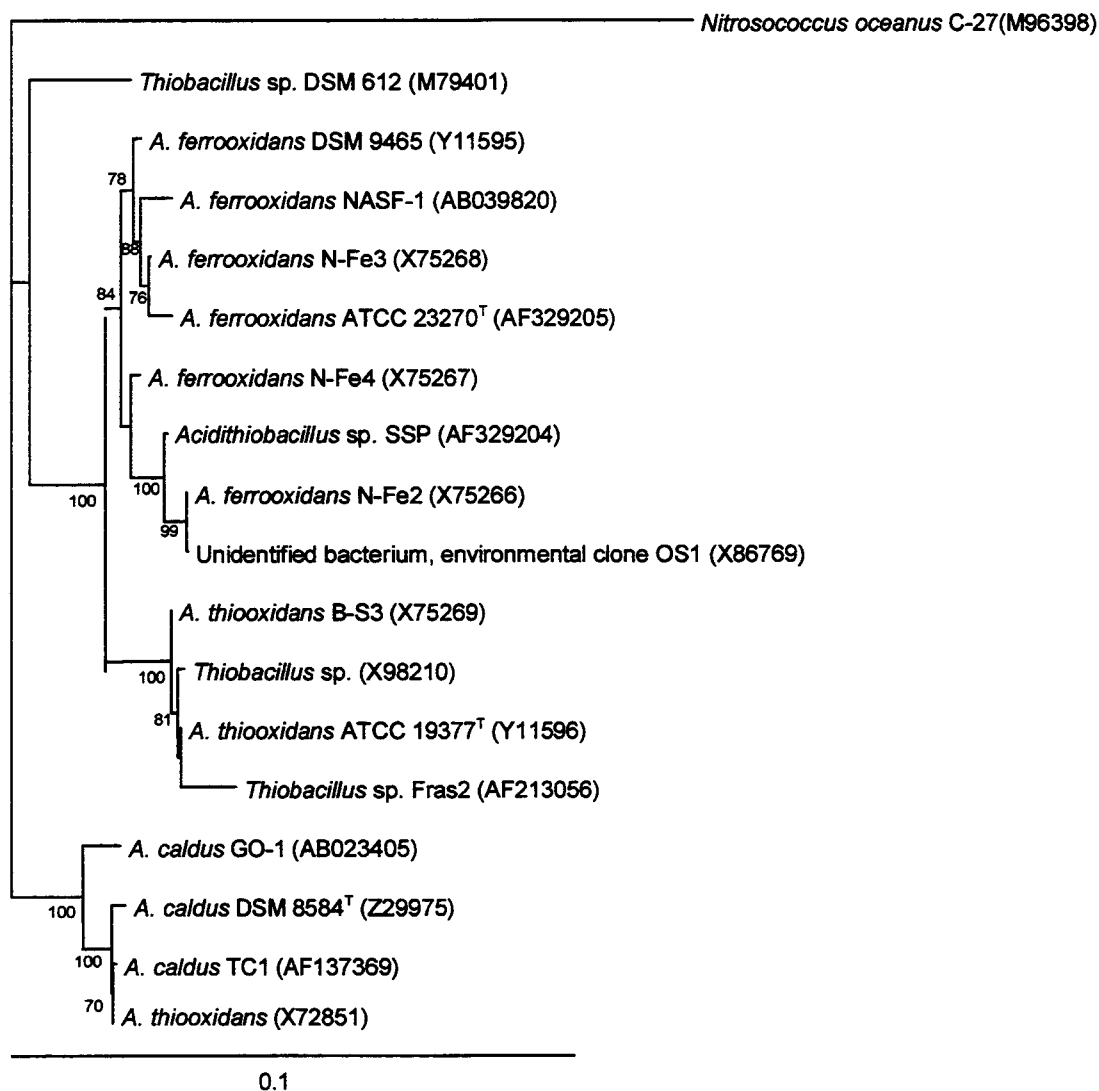


Figure 5. Neighbor-joining 16S rDNA tree, showing relationships between strain SSP and related acidithiobacilli. Bootstrap values (1000 replicates) lower than 70% are not shown. The numbers in parentheses correspond to the Genbank accession numbers.

**Caracterização da Expressão Gênica
Diferencial na Presença de Cobre
em *Acidithiobacillus ferrooxidans***

Artigo 2

**Differential gene expression in response to
copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans*
by RNA arbitrarily primed PCR**

A ser submetido para publicação na revista Electrophoresis

Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed PCR

Luciana Campos Paulino, Maricilda P. de Mello & Laura M. M. Ottoboni*

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

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*/ metal resistance/ copper/ RAP-PCR

Running title: Copper-related gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

*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

Acidithiobacillus ferrooxidans is a chemoautotrophic bacterium that plays an important role in metal bioleaching processes. Despite the high level of tolerance to heavy metals presented by *A. ferrooxidans*, the genetic basis of copper resistance remains unknown. We characterized the differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans* LR using RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). One hundred four differentially expressed genes were identified using 8 arbitrary primers. The confirmation of the differential gene expression was carried out by DNA slot blot hybridization and approximately 70% of the RAP-PCR products were confirmed. The products with the highest levels of induction were cloned, sequenced and compared to the databases using the BLAST search algorithm. Seventeen different sequences were obtained. The RAP-PCR product with the highest induction ratio demonstrated homology with the *A. ferrooxidans* cytochrome c. A high similarity with the thiamin biosynthesis gene *thiC* from *Deinococcus radiodurans* was found for another RAP-PCR product induced by copper. A RAP-PCR product repressed by copper presented significant homology with the carboxysome operon, that includes the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase from *A. ferrooxidans*. In addition, RAP-PCR products with unknown similarities were found.

1 Introduction

Acidithiobacillus ferrooxidans [1, 2, 3] is a Gram-negative, rod-shaped, acidophilic, chemoautotrophic bacterium, able to utilize reduced sulfur compounds and ferrous iron to derive energy. These ubiquitously distributed bacteria are isolated from a wide range of sulfur-containing mineral deposits [4,5]. The sulfuric acid and precipitated iron generated by this organism represent serious pollution problems [6].

A. ferrooxidans is considered to have an important role in metal bioleaching and has been industrially used in the recovery of gold, uranium and copper [7]. Among these, copper is the most intensively recovered metal in biohydrometallurgical operations [8]. According to Johnson [9], in 1998 the global market of the bioleaching industry and stirred reactor processes for valuable metal recovery was estimated to be around US\$ 10 billion. In addition, *A. ferrooxidans* represents less expensive and nonpolluting alternatives to be used in the degradation of chemical residues from processed minerals [10, 11]. This microorganism can also remove sulfur from coal and fuel oil and when present in biofilters, it can scrub sulfur dioxide from various industrial emissions [12].

An interesting feature of *A. ferrooxidans* is its inherent resistance to high concentrations of heavy metals, such as copper, zinc, arsenic and uranium [5, 7, 13]. Genes involved in metal resistance have been described in several bacteria [reviewed by 14, 15, 16, 17]. Except for mercury [18] and arsenic [19], the genetic basis of metal resistance in *A. ferrooxidans* is still unknown. RNA fingerprinting analyzes of genes differentially expressed in the presence of heavy metals in *A. ferrooxidans* could give insights about the identity of those genes.

Two RNA fingerprinting methods, RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR; [20]) and mRNA differential display [21] are currently being used to identify differentially expressed genes in prokaryotes and eukaryotes. Both techniques are based on the isolation of RNA from cellular samples under two conditions to be compared, followed by reverse transcription of the RNA (RT-PCR) and separation of the cDNA bands by electrophoresis on a sequencing gel [22]. In the differential

display method, RT-PCR is carried out using oligo-dT primers and the RAP-PCR method uses arbitrary primers in the RT-PCR reaction. Some examples of the RAP-PCR utilization in bacteria include the isolation of heat-inducible genes in *Campylobacter jejuni* [23], aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* [24] and peroxide induced genes in *Salmonella typhimurium* [25].

The aim of the present study was to characterize the differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans*, using RNA arbitrarily primed PCR.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

The *A. ferrooxidans* Brazilian strain LR, isolated from acid effluent of column leaching of uranium [26], was selected for differential gene expression analysis in response to copper. The choice of this strain was based on its tolerance to high concentrations of copper [8]. The LR strain was cultivated at 30°C in modified T&K medium supplemented with Fe^{2+} [27] and 200 mM of copper sulfate. As a control, strain LR was grown in the absence of the metal.

2.2 RNA isolation

RNA was isolated from *A. ferrooxidans* LR cells according to the method described by Winderickx & Castro [28], with minor modifications. The cells were suspended in a solution containing 1 mM EDTA; 0.1 M LiCl; 0.1 M Tris-HCl; 10 mM sodiumiodoacetate (pH 7.5) and extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, vol:vol:vol) containing 10% SDS. The RNA was precipitated by the addition of 2% potassium acetate and 100% ethanol. It was resuspended in DEPC-treated water. The RNA samples were treated with DNase by incubation at 37°C for 1h and stored at -70°C.

2.3 RAP-PCR

The RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) experiments were carried out as described by Welsh *et al.* [20] and Wong & McClelland [25], with modifications.

The arbitrary primers (Operon Technologies Inc.) used in the experiments were: OPJ-04, OPJ-05, OPJ-12, OPJ-14, OPJ-15, OPJ-16, OPJ-19 and OPJ-20. The first-strand cDNA was synthesized using the ready-to-go RT-PCR beads (Amersham Pharmacia), following the specifications of the manufacturer. The reaction mixtures containing the beads, 1 µg RNA and 1 µM of the arbitrary primer were incubated at 42°C for 30 min. After incubation, the reverse transcriptase was inactivated at 95°C for 5 min. For the second-strand synthesis, 4 µL of the first-strand reaction was mixed with a 20 µL reaction mixture containing 1 x PCR buffer, 1.25 mM MgCl₂; 2 µM of the same arbitrary primer used in the first-strand synthesis, 2 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Gibco BRL), 1 µCi [α -³³P]dATP (Amersham Pharmacia), 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia). The PCR reactions were carried out in duplicate in a Perkin-Elmer 2400 thermal cycler. The amplification conditions included initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s; 40°C for 2 min; and 72°C for 30 s. The final extension was at 72°C for 20 min.

Seven µL from each reaction were mixed with 5 µL of a solution containing 80% deionized formamide, 0.01% bromophenol blue and 0.01% xylene cyanol. The samples were incubated at 80°C for 4 min and 10 µL were loaded on a 5% polyacrylamide gel containing 50% urea. The electrophoresis was conducted for approximately 5h at 1,320 V and 35 A. After electrophoresis, the gel was transferred to 3 MM Whatman paper, dried under vacuum and exposed to X-ray film [29].

2.4 Isolation and reamplification of RAP-PCR products

The differentially expressed RAP-PCR bands were cut out of the gel and the DNA was eluted by incubation at 95°C for 20 min in 200 µL of water. The DNA was

precipitated by the addition of 1/10 v of 3 M sodium acetate and 2 v of ethanol. It was resuspended in 10 μ L of water. Four μ L of the eluted DNA were amplified in a 40 μ L reaction mixture 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), 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia). The amplification cycles were the same described in item 2.3.

2.5 Confirmation of differential gene expression

The differential expression of the RAP-PCR bands isolated was confirmed by DNA slot blot hybridization [30]. Ten ng of DNA from the RAP-PCR bands were mixed with TE, to obtain a final volume of 200 μ L, and denatured by incubation at 95°C for 5 min. The samples were mixed with 200 μ L of 20 x SSC and transferred in duplicate to nylon membranes (Hybond-N, Amersham Pharmacia) using a slot blot apparatus (Gibco BRL).

The membranes were prehybridized at 42°C for 5h in a solution containing 50% deionized formamide, 5 x SSC, 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 [29].

Approximately 30 ng of the cDNA samples obtained in the presence and absence of copper were labeled with [α -³²P]dCTP using a commercial kit (Megaprime, Amersham Pharmacia) and used as probe. Hybridization was carried out at 42°C, overnight, in a hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 5 x SSC, 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 as follows: two 5 min washes, at room temperature, in a solution containing 2 x SSC and 0.1% SDS; and two 30 min washes, at 55°C, in 0.1 x SSC and 0.1% SDS. For the visualization of the results, the membranes were exposed to x-ray films (Amersham Pharmacia).

The hybridization signals were quantified using the CrazyQuant v. 1.3 software

(http://chroma.mbt.washington.edu/hood_www/crazyquant/Applet.htm) and the data analysis was performed as described by Desprez *et al.* [31], Gill *et al.* [32] and Scummer *et al.* [33], with modifications. The quantified signal intensity of each RAP-PCR band was divided by the average signal intensity of all samples hybridized with the same probe. The normalized signal intensity values obtained in the hybridizations with copper (total cDNA synthesized from RNA isolated from cells grown in the presence of copper) and control (total cDNA synthesized from RNA isolated from cells grown in the absence of metal) probes were used in a scatter plot analysis. Intensity values above and below the line (function $y = x$) were considered induced or repressed by copper, respectively. The intensity value of each RAP-PCR band in the presence of copper was divided by the intensity value in the absence of copper and the obtained value was denominated induction ratio. Induction ratios higher (induced by copper) or smaller (repressed by copper) than 1 were considered differential.

2.6 RAP-PCR products cloning and sequencing

The twenty differentially expressed RAP-PCR products with the highest induction ratios were selected for cloning and sequencing. The samples were cloned into the pGEM-T easy vector (Promega), following the specifications of the manufacturer. At least three clones from each sample were sequenced (ABI Prism 377, Perkin Elmer) and the sequences obtained were compared with GenBank sequences using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>). Both the BLASTN and BLASTX functions were used.

3 Results and discussion

3.1 RAP-PCR

Despite the *A. ferrooxidans* resistance to high concentrations of copper [5, 7, 13], the genes induced and repressed by this metal are still unknown. In the present study, differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans* was

characterized using RNA arbitrarily primed PCR. The choice of the concentration of 200 mM of copper sulfate was based on a previous study where the authors showed by respirometric experiments that in the presence of this concentration of copper there was no inhibition in oxygen uptake in *A. ferrooxidans* strain LR [8]. Under this copper concentration, changes in the total protein profile of the bacteria were also observed [8].

A. ferrooxidans strain LR were cultivated in the absence and presence of 200 mM copper sulfate and the RNA obtained from those cells was used to synthesize cDNA using 8 arbitrary primers. The cDNA samples were amplified and the bands were separated by electrophoresis on a denatured gel. Examples of RNA fingerprintings are shown in Figure 1. The RAP-PCR technique was very efficient for the characterization of the differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans* LR. A great number of clearly visible bands was identified in the RNA fingerprinting. A total of 104 differentially expressed RAP-PCR products were found by the comparison of samples obtained in the absence (39 bands) and presence (65 bands) of copper. Only the reproducible bands were considered. The molecular weight of the considered bands ranged from 200 bp to 1 Kb. Ninety-nine RAP-PCR products were reamplified and the differential expression was submitted to confirmation by slot blot hybridization analysis.

3.2 Confirmation of differential gene expression

The RAP-PCR products were isolated from the gel, reamplified and transferred in duplicate to nylon membranes using a slot blot apparatus. The membranes were hybridized using as probe cDNA samples obtained in the presence and absence of copper. Figure 2 shows an example of a slot blot that corresponds to the RNA fingerprinting presented in the Figure 1A. The differential gene expression of all RAP-PCR products, in this case, was confirmed, since the induction ratio was higher than 1.3 for the products isolated from cDNA samples obtained in the presence of copper (products induced by copper) and lower than 0.7 for the products isolated in the absence of the metal (products repressed by copper,

Figure 2D).

Table 1 shows a summary of the slot blot hybridization analysis of the 99 RAP-PCR products. As showed in Table 1, the differential expression of 69 RAP-PCR products was confirmed, representing approximately 70% of the RAP-PCR products tested. The percentage of false positive products was equivalent or lower to previously reported analyzes [24, 30, 34, 35, 36]. Among the products repressed by copper, a total of 35 were tested and 24 were confirmed (68.6%). The percentage of confirmation obtained for the products induced by copper was similar (70.31%), although in this case the number of the tested products was larger (45 products confirmed, from 64 products tested; Table 1).

The total number of RAP-PCR products and the percentage of the differential gene expression confirmed were different for the arbitrary primers used in the experiments. The OPJ-15 primer generated the largest number of repressed products, while primers OPJ-14 and OPJ-20 yielded the best percentage of confirmation (all products tested were confirmed). In relation to induced RAP-PCR products, the largest number was obtained with the OPJ-12 primer. All products provided by OPJ-04, OPJ-14 and OPJ-19 primers were confirmed (Table 1).

The DNA slot blot hybridization [30] is a rapid and simple method, which does not require large amounts of RNA [22, 34, 37]. The Northern blot alternative method is a laborious technique that needed a hybridization to analyze each RAP-PCR product. Thus DNA slot blot is particularly advantageous to test large numbers of products and it has been largely used in association with RAP-PCR and differential display techniques [34, 38, 39, 40, 41, 42]. In the present work, the DNA slot blot method was very efficient to confirm the differential gene expression of the RAP-PCR products obtained in response to copper.

3.3 Identification of copper induced/repressed sequences

After the differential gene expression confirmation by DNA slot blot hybridization, the RAP-PCR products that presented the highest values of induction ratio were selected for further analyses. These products were cloned and at least 3 clones of

each product were sequenced. The sequences were submitted to comparison with GenBank sequences using the BLAST algorithm. In total, 20 RAP-PCR products were sequenced, including 4 RAP-PCR products from preliminary experiments (data not show). Seventeen different sequences were obtained, ranging from 212 to 625 bp (Table 2).

The RAP-PCR product with the highest induction ratio showed higher homology with cytochrome c from *A. ferrooxidans* (Table 2). At this moment, there is no conclusive data related to the role of the respiratory chain genes in stress response mechanisms. However, the isolation of a sequence of the cytochrome c oxidase gene differentially expressed in response to methotrexate in CHO K1 cells by RAP-PCR was recently reported [47]. These authors confirmed the relation between the cytochrome c oxidase gene and the methotrexate response using a specific cytochrome c inhibitor, which reduced the number of resistant colonies after methotrexate treatment. In addition, increased expression of the cytochrome b gene in cultured human hepatoma cells exposed to increasing concentrations of copper was also detected by the differential display method [48].

Changes in the cytochrome gene expression in response to environmental stress were also observed in *Synechocystis* sp. [49]. Expression of the cytochrome cM gene was enhanced when cells were exposed to low temperature or high-intensity light. Moreover, the molecular form of inorganic carbon source for photosynthesis shift from CO₂ to HCO³⁻ (CO₂ stress) and the light-quality shift from preferential excitation of the photosystem I to photosystem II stoichiometry (light stress) induced the increase in the cytochrome c oxidase activity [50]. These data, in addition to the results presented in this study, suggest that cytochrome genes may play an important role in response to environmental stimuli in different organisms.

One of the RAP-PCR products repressed by copper showed significant homology with the carboxysome operon from *A. ferrooxidans* (Table 2), that includes both small and large subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (RUBISCO) [51]. Similarly to the cytochrome gene, the role of the carboxysome operon genes in stress response mechanisms is not clear. It is

possible that decreased RUBISCO gene expression could be associated to the reduced growth rate of the cells subjected to stress conditions.

In addition to the RAP-PCR products with significant similarity to *A. ferrooxidans* sequences, we found a product with homology to the thiamin biosynthesis gene *thiC* from *Deinococcus radiodurans* (Table 2), whose genome was sequenced [46]. As mentioned for the cytochrome c and the RUBISCO genes, the role of *thiC* gene in stress response mechanisms remains unknown.

Ten RAP-PCR products analyzed did not show homology with any sequence in the database. Moreover, 4 products presented similarity with hypothetical or unknown proteins (Table 2). A high percentage of coding sequences without homology to known proteins has been found in recently sequenced bacterial genomes. For example, 38% of the *Escherichia coli* genome [52], 42% of the *Haemophilus influenzae* genome [53], 46.3% of the *Neisseria meningitidis* genome [54] and 53% of the *Xylella fastidiosa* genome [55] correspond to coding sequences with unknown functions. In addition, studies of stress response using RAP-PCR reported a high number of sequences without known similarity [23, 35].

In this way, further studies are necessary in order to elucidate the RAP-PCR products without similarity to sequences in the database. The isolation and characterization of the complete gene sequences are essential in order to elucidate the role of these genes in the copper resistance mechanism of *A. ferrooxidans*.

4 Concluding remarks

In this work we have demonstrated for the first time the use of the RNA arbitrarily primed PCR technique to characterized differential gene expression in response to copper in *A. ferrooxidans*. This method was very efficient since a high number of products were isolated and a high percentage of differential gene expression confirmation was obtained. The data derived from the current study suggest that copper resistance is a complex mechanism, involving the differential expression of several genes. The role of these genes in the resistance mechanism is still unclear

and we cannot discard the possibility that the increased/repressed gene expression could be related to indirect metabolic responses to stress conditions.

Despite the importance of further complementary studies, the RAP-PCR is a powerful technique, opening a new perspective to the understanding of the genes involved in copper tolerance in *A. ferrooxidans*.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. O. Garcia Jr. for providing *A. ferrooxidans* strain LR and to Dr. Gilson P. Manfio for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 97/1069-0) L. C. P. received a postgraduate fellowship from FAPESP (97/12549-2).

5 References

- [1] Colmer, A. R., Temple, K. L., Hinkle, M. E., *J. Bacteriol.* 1950, 59, 317-328.
- [2] Temple, K. L., Colmer, A. R., *J. Bacteriol.* 1951, 62, 605-611.
- [3] Kelly, D. P., Wood, A. P., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, 50, 511-516.
- [4] Leduc, L. G., Ferroni, G. D., *FEMS Microbiol. Rev.* 1994, 14, 103-120.
- [5] Rawlings, D. E., Kusano, T., *Microbiol. Rev.* 1994, 58, 39-55.
- [6] Bacelar-Nicolau, P., Johnson, D. B., *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 585-590.
- [7] Hutchins, S. R., Davidson, M. S., Brierley, J. A., Brierley, C. L., *Annu. Rev. Microbiol.* 1986, 40, 311-336.
- [8] Novo, M. T., Da Silva, A. C., Moreto, R., Cabral, P. C., Costacurta, A., Garcia Jr, O., Ottoboni, L. M., *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 77, 187-195.
- [9] Johnson, D. B., in: Amils R., Ballester A. (Eds.), *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*, part-A, Elsevier, Amsterdam 1999, pp. 645-656.
- [10] Shiratori, T., Sonta, H., *FEMS Microbiol. Rev.* 1993, 11, 165-174.
- [11] Hubert, W. A., Leduc, L. G., Ferroni, G. D., *Curr. Microbiol.* 1995, 31, 10-14.
- [12] Bonaventura, C., Johnson, F. M., *Environ. Health Persp.* 1997, 105, 5-20.

- [13] Lundgren, D. G., Silver, M., *Annu. Rev. Microbiol.* 1980, 34, 263-283.
- [14] Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000, 45, 198-207.
- [15] Silver, S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 20, 1-12.
- [16] Silver, S., *Gene*, 1996, 179, 9-19.
- [17] Silver, S., Phung, L. T., *Annu. Rev. Microbiol.* 1996, 50, 753-789.
- [18] Shiratori, T., Inoue, C., Sugawara, K., Kusano, T., Kitagawa, Y., *J. Bacteriol.* 1989, 171, 3458-3464.
- [19] Butcher, B. G., Deane, S. M., Rawlings, D. E., *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1826-1833.
- [20] Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., McClelland, M., *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 4965- 4970.
- [21] Liang, P., Pardee, A. B., *Science*, 1992, 257, 967-971.
- [22] Liang, P, Pardee, A. B., *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7, 274-280.
- [23] Thies, F. L., Hartung, H. P., Giegerich, G., *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 165, 329-334.
- [24] Shepard, B. D., Gilmore, M. S., *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1470-1476.
- [25] Wong, K. K., McClelland, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 639-643.

- [26] Garcia Jr., O., *Rev. Microbiol.* 1991, 22, 1-6.
- [27] Tuovinen, O. H., Kelly, D. P., *Arch. Microbiol.* 1973, 88, 285-298.
- [28] Winderickx, J., Castro, J. M., *Practical course in molecular biology of microorganisms*, Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February 11, 1994, pp. 59.
- [29] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. E., *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [30] Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E., Chalifour, L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 199, 564-569.
- [31] Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M., Hofte, H., *Plant J.* 1998, 14, 643-652.
- [32] Gill, R. T., Valdes, J. J., Bentley, W. E., *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 5386-5393.
- [33] Schummer, M., Ng, W. V., Bumgarner, R. E., Nelson, P. S., Schummer, B., Bednarski, D. W., Hassell, L., Baldwin, R. L., Karlan, B. Y., Hood, L., *Gene* 1999, 238, 375-385.
- [34] Corton, J. C., Gustafsson, J. A., *Biotechniques* 1997, 22, 802-810.
- [35] Mathieu-Daudé, F., Welsh, J., Davis, C., McClelland, M., *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998, 92, 15-28.

- [36] Fleming, J. T., Yao, W. H., Sayler, G. S., *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3698-3706.
- [37] Wadhwa, R., Duncan, E., Kaul, S. C., Reddel, R. R., *Mol. Biotechnol.* 1996, 6, 213-217.
- [38] Gong, T. W., Hegeman, A. D., Shin, J. J., Adler, H. J., Raphael, Y., Lomax, M. I., *Hear Res.* 1996, 96, 20-32.
- [39] Ross, R., Kumpf, K., Reske-Kunz, A. B., *Biotechniques* 1997, 22, 894-897.
- [40] Im, K. I., Park, K. M., Yong, T. S., Hong, Y. P., Kim, T. E. *Korean J. Parasitol.* 1999, 37, 257-263.
- [41] Hung, H. L., Song, F., Gewirtz, A., *Leukemia* 1999, 13, 295-297.
- [42] Leung, G. S., Zhang, M., Xie, W. J., Kwan, H. S., *Mol. Gen. Genet.* 2000, 262, 977-990.
- [43] Guilian, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M., Bonnefoy, V., in: Holmes, D. S., Smith, R. W., Warrendale, P. A. (Eds.), *Minerals Bioprocessing II*, The Minerals, Metals and Materials Society 1995, pp. 95-110.
- [44] Schupp, J. M., Klevytska, A. M., Zinser, G., Price, L. B., Keim, P., *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3989-3997.
- [45] Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olson, G. J. and Swanson, R. V., *Nature* 1998, 392, 353-358.

- [46] 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., Minton, K. W., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Nelson, K. E., Salzberg, S., Smith, H. O., Venter, J. C., Fraser, C. M., *Science* 1999, 286, 1571-1577.
- [47] Alemany, C., Noe, V., Ciudad, C. J., *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1495, 319-326.
- [48] Levenson, C. W., Song, Y., Narayanan, V. S., Fitch, C. A., Yeiser, E. C., *Biol. Trace Elem. Res.* 1999, 70, 149-164.
- [49] Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Murata, N., *FEBS Lett.* 1999, 444, 281-284.
- [50] Murakami A, Kim, S. J., Fujita, Y., *Plant Cell Physiol.* 1997, 38, 392-397.
- [51] Kusano, T., Takeshima, T., Inoue, C., Sugawara, K., *J. Bacteriol.* 1991, 173, 7313-7323.
- [52] Blattner, F. R., Plunkett, G. 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y., *Science* 1997, 277, 1453-1474.
- [53] Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., et al, *Science* 1995, 269, 496-512.

- [54] Tettelin, H., Saunders, N. J., Heidelberg, J., Jeffries, A. C., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Ketchum, K. A., Hood, D. W., Peden, J. F., Dodson, R. J., Nelson, W. C., Gwinn, M. L., DeBoy, R., Peterson, J. D., Hickey, E. K., Haft, D. H., Salzberg, S. L., White, O., Fleischmann, R. D., Dougherty, B. A., Mason, T., Ciecko, A., Parksey, D. S., Blair, E., Cittone, H., Clark, E. B., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Khouri, H., Qin, H., Vamathevan, J., Gill, J., Scarlato, V., Masignani, V., Pizza, M., Grandi, G., Sun, L., Smith, H. O., Fraser, C. M., Moxon, E. R., Rappuoli, R., Venter, J. C., *Science* 2000, **287**, 1809-1815.
- [55] Simpson, J. G., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M. C., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., et al., *Nature* 2000, **406**, 151-157.

Table 1: DNA slot blot hybridization analysis of 99 RAP-PCR products isolated in response to copper.

Primers	RAP-PCR products									
	repressed by copper					induced by copper				
	tested	confirmed	%	tested	confirmed	%	tested	confirmed	total	%
OPJ-04	7	6	85.71	4	4	100	11	10	10	90.9
OPJ-05	1	0	0	4	2	50	5	2	2	40
OPJ-12	6	2	33.34	16	10	62.5	22	12	12	54.54
OPJ-14	5	5	100	10	10	100	15	15	15	100
OPJ-15	8	7	87.5	11	8	72.73	19	15	15	78.94
OPJ-16	3	0	0	2	1	50	5	1	1	20
OPJ-19	4	3	75	6	6	100	10	9	9	90
OPJ-20	1	1	100	11	4	36.36	12	5	5	41.66
Total	35	24	68.57	64	45	70.31	99	69	69	69.69

Table 2. BLAST homology search results of RAP-PCR products differentially expressed in response to copper.

RAP-PCR product	primer	size (bp)	induced or repressed by copper	induction ratio ^b	similarity (accession number)	score (bits), E-value ^d
40/9	OPJ-19	271	induced	18.5	cytochrome c <i>A. ferrooxidans</i> (AJ006456) [43]	325, 6e ⁻⁸⁷
23/9	OPJ-12	228	induced	13.8	no know similarity	-
37/9	OPJ-19	299	induced	6.04	no know similarity	-
51/8	OPJ-15	217	induced	5.7	no know similarity	-
38/9	OPJ-19	297	induced	4.5	no know similarity	-
31/8	OPJ-14	212	induced	4.1	unknown protein <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 (AAD42178)	81, 3e ⁻¹⁵
22/9	OPJ-12	232	induced	3.4	no know similarity	-
41/9	OPJ-19		induced	3.3	VrrB (hypervariable open reading frame) <i>Bacillus anthracis</i> (AAF86199) [44]	38, 0.038
23/8	OPJ-14	625	induced	2.5	hypothetical protein aq_392 <i>Aquifex aeolicus</i> (E70335) [45]	214, 7e ⁻⁶²
15/9	OPJ-12	273	induced	2.4	no know similarity	-
16/9	OPJ-12	261	induced	2.1	no know similarity	-
53/9	OPJ-20	212	induced	1.8	no know similarity	-
18/9	OPJ-12	281	induced	1.8	no know similarity	-
11/4 ^a	OPJ-06	298	induced	1.4	thiamin biosynthesis <i>thiC</i> <i>Deinococcus radiodurans</i> (B75614) [46]	46, 2e ⁻⁰⁶
3/1 ^a	OPP-01	513	induced	1.3	no know similarity	-
2/4 ^a	OPJ-08	572	repressed	0.69	carboxysome operon <i>A. ferrooxidans</i> (AF129925)	1031, 0.0
7/4 ^a	OPJ-10	470	repressed	0 ^c	hypothetical protein aq_627 <i>Aquifex aeolicus</i> (H70355) [45]	39, 5e ⁻⁰⁴

(a) RAP-PCR products isolated in previous experiments

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

(c) the hybridization signal with copper probe was not detected

(d) E-value: expect value (number of hits one can expect to see just by chance, describes the random background noise that exists for matches between sequences). The score refer to amino acid alignments (using the BLASTX function), except to the 40/9 and 2/4 RAP-PCR products (nucleotide alignments, BLASTN function).

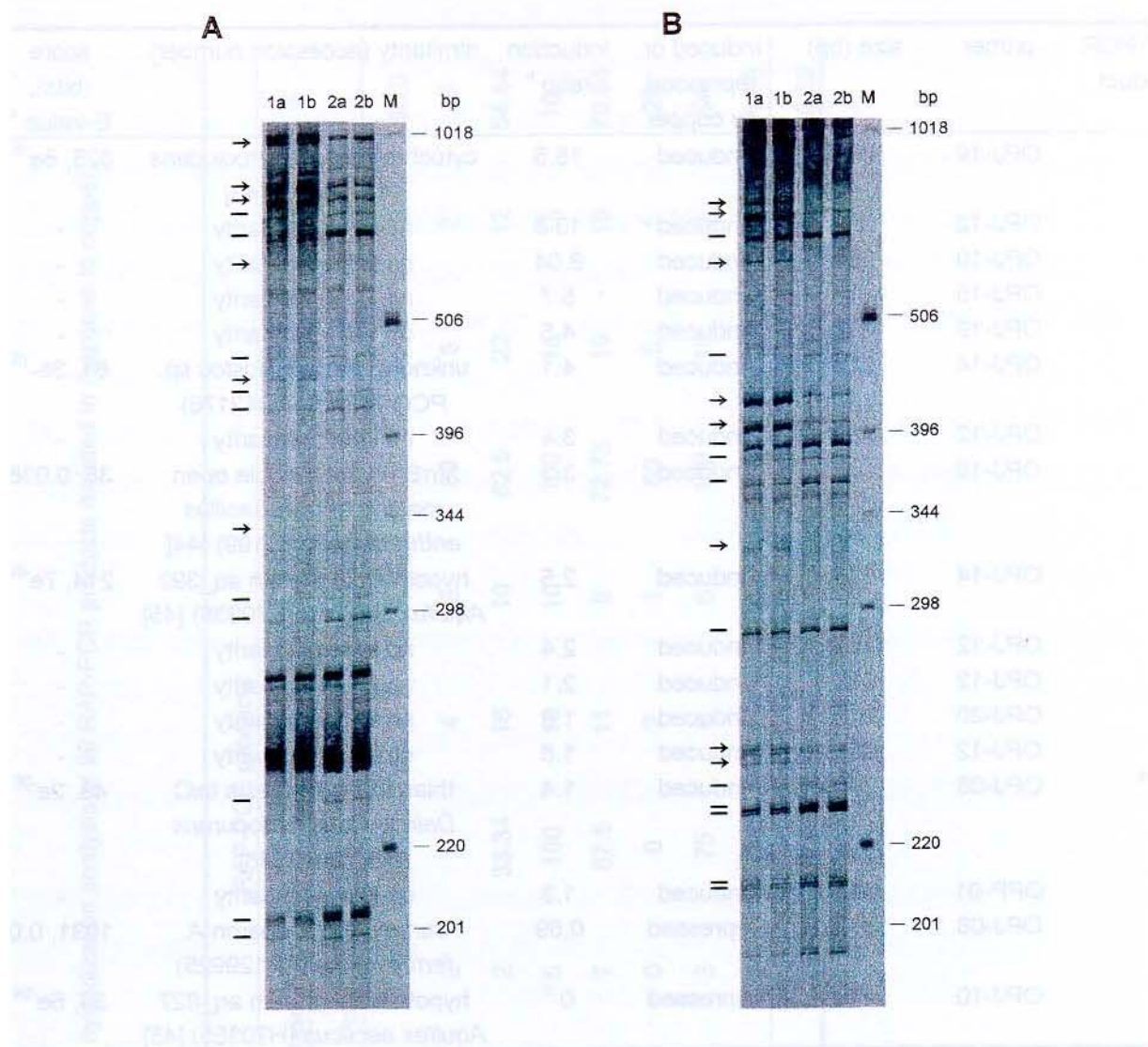


Figure 1. RAP-PCR profiles derived from cDNA samples from *A. ferrooxidans* strain LR cultivated in the absence (1) and presence (2) of copper. The profiles were obtained with the OPJ-14 (A) and OPJ-15 (B) primers. (a) and (b) represent the duplicates. (M) 1 Kb DNA ladder (Gibco BRL). The arrows and lines indicate the repressed and induced RAP-PCR products, respectively.

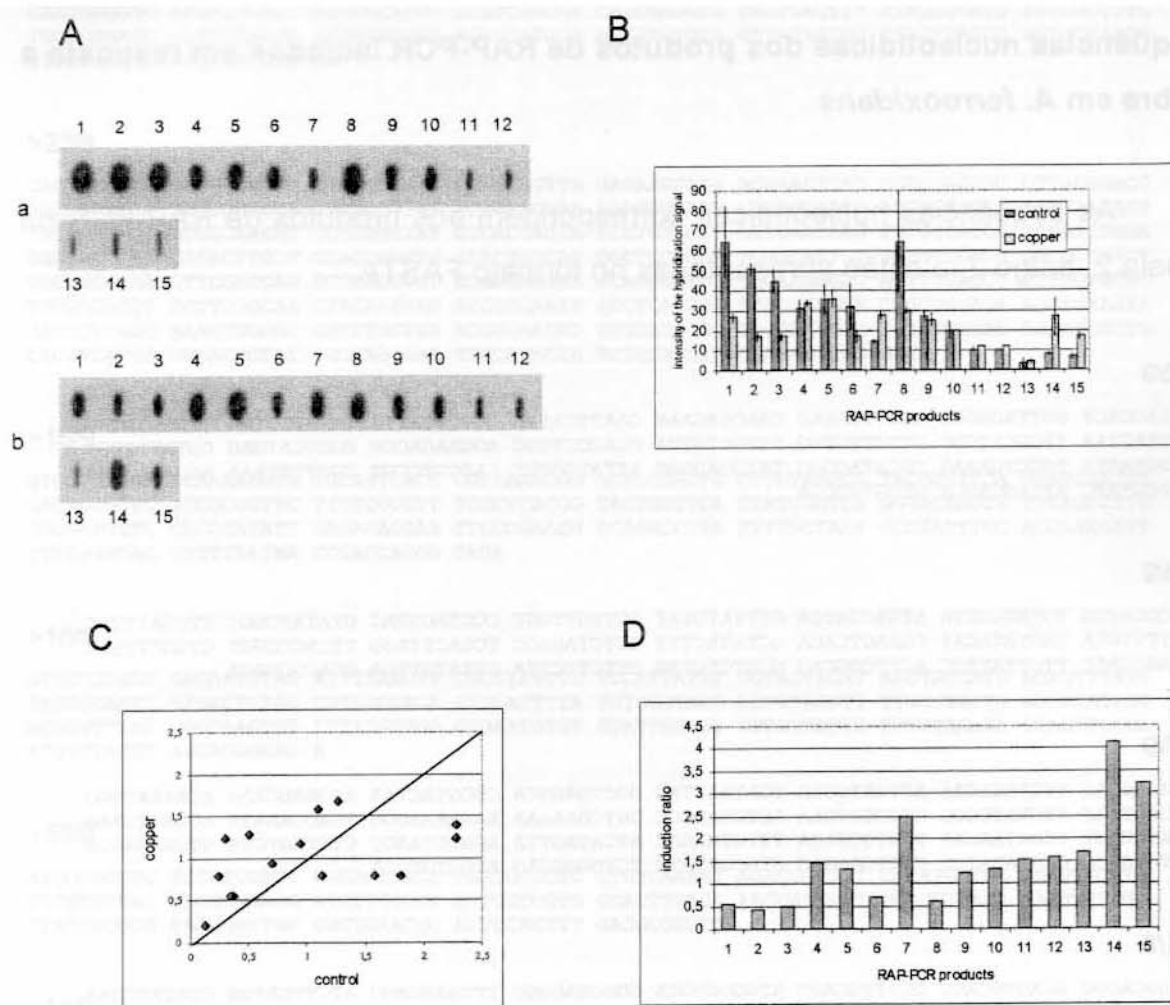


Figure 2. A. DNA Slot blot hybridization using as probe cDNA samples from *A. ferrooxidans* strain LR cultivated in the absence (control) (a) and presence (b) of copper, synthesized with the OPJ-14 primer. RAP-PCR products 1, 2, 3, 6 and 8 were isolated from cDNA profiles obtained in the absence of copper and RAP-PCR products 4, 5, 7 and 9 to 15 were isolated in the presence of the metal. B. Histogram representing the intensity of the hybridization signals. C. Scatter plot analysis of the data showed in B, normalized by the average of all values. D. Histogram representing the induction ratio.

APÊNDICE

Seqüências nucleotídicas dos produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cobre em *A. ferrooxidans*

As seqüências nucleotídicas correspondem aos produtos de RAP-PCR da tabela 2, artigo 2, e estão apresentadas no formato FASTA.

>40/9

```
GGACACCACT GGTTAGGGGC GGGTTGAGAC CAACCAGAAA CAATTCATAA GCCTACATTA TGAATTCTGG TTGGCTATAG
GTTTTATTAA TTGGCATCGC GTTGTGTGG TTTGCTGTTA CCAGCCTGGC AGGAAGACCG GGCGCATGAG CGTATTTTGT
TTATCTAATA TGCCTGAAAG CGCATACCGC TATGGAGGGG ATTATGGTGT CATCGTCCGT TGGTTTAA AAGAAAAGGT
TGATCGTANC ATTAGCAGCA GTGGTGTCCA
```

>23/9

```
TGTCCCGTGG TGTAGCGCTA ATGACGATCA GTTTATGTAT GCTTGTGGT CCCTACGTAC GTATATCGGC TTCGATTTAC
TTATTGTGTA GAGTATACAT CGAACTCACA GCTATACTTT GCTCTAGACC TCGACTTAGG TTCACCCGGT GTGGTTTGT
AGGAGCGACC TTCTTATTGC ACTTCGGCAG GCGTCTCGAG GTTCTTCTTA CTTATGTTGA CCACGGGACA
```

>37/9

```
TGGACACCAC TGCTAGACAA ATTGATGCTA TGATAATTAG GGCTGAGGCA CNCGTACTAA AGGAAGCAAG ACAAATGGG
CTTGGATTAC TTGTATTCCC GTGCCATGAA ACTCTACCCC GGTGGAAAAA AAGAAAAGGG TGACCAAATA ACGATTGAAG
AAAATCCAGT TCGCTAACAA TTNTGCTACA TTTGTGAGAC ATCATAGTTA AGACCTAACC CTTTAGTCTG GTCGAGACCG
CCGTCGGGCC CCGGATATCT CATTCAAGAG GTGCGCTATG TGTGGGTGAG ATGGTGTCCA
```

>51/8

```
TGTAGCAGGG GGAGTGCAGC CCTTTGCAGC ATGGGGGGCA GGGCGACGGG TTTGAGCAGC ATCTTGATGG CCATATCGAA
AGGTAATAG CGATCCACCC AGCCGCCTAT GCGTTTCCGG AACGCGGCAA AGTCCTCTAT GAAAACTTC TCTCCGGAT
TTTTCAC TTC AAGCATTT TTGATCGCA AGATAGCTGT CTTCTGCCC TGCTACA
```

>38/9

```
GGACACCACT CCCACACATA GCGCACCTCT TGAATGAGAT ATCCGGGGCC GGACGGNGGT CTCGACCAGA CTAAAGGTT
AGGTCTTAAC TATGATGTCT CACAAATGTA GCAAAATTGT TAGCGACTGG ATTTTCCTCA ATCGTTATTT GGTCAACCTT
TTCTTTTTTT CCACCGGGGT AAGAGTTTCA TGGCACGGGA ATACAAGTAA TCCAAGCCCA TTTTGTCTGC TTCTTAGTA
CNGCGTGCCT CAGCCCTAAT TATCATANGC ATCAATTGT CTAGCAGNGG GTGTCC
```

>31/8

```
CACCCGGATG TGCATCGAGG GTGATGGCAC GCAACGCGGA CTCGTCGGAT TGCACGGCCA GGGCCTCACG CATTCTGGAA
GTCTCATCAC CCATGGTCAT GGACAGATAG GCGGTGGCCA GATTGTTGTG GAGGATCGCG TATTCACGCG GGAATTTATC
CGCGGTAAAA ACCCCCAAGG CGCTGTGGTA CTTCCGTACG GATTGCGGTG A
```

>22/9

```
GTCCCGTGGT AACAAATATAT GTAACAAAGC TAAAGGTTTG TAGAAAGATA AAACATTCCA AAGCAAAGAC CAAAAA
TAGGTCCTTA AATAATAACC AGTAATATAA ATTAAGAAA AAAAATATAT AAAAAAATC ATGCCTACGA AAAAAACAAC
TGAAAAGCCA GAAATCAGCA AATAAAAGCC CCAATAAAAA TCCTGTCTCA AAAAAACATA CACCACGGGA CA
```

>41/9

GGACACCACT ACCGGAAAGG ACTGCATAGG GAAACCGTAG GTCGGAACGG CCTGCGGCGC CGCACCGACT CCAGCAAATT
CAACGGGGGC AAGATGCAGC AACCGTAACG CCGTCGGCGT CAGCGAGGTG TAGTCACTTT TTAGGGCATG TGTGCTTTG
TGGTGGGAGC GCGTGTAAGC ATGGTGGGCG ACCCTATGCA AGGGTGTGTG GATATAGTGG TGACTGACCC GGTGCAAAGG
CTTGTGGATA GAGTGGTGTC CA

>23/8

CACCCGGATG GATGACGTCC GTGATCACAT GTGGCAGTTG GAGAAGGAAG GCGAAATCAT CGTCCACCGC CTTACGGACC
AGCACAAAGCC CGTTGAAGTA GATACTCTGT ATGGCTGGAA AAAGCGGATT CCTACGAATC AGTTCTGGCA TCATAAGAGT
TGGGGGCAGT GCGGCAACAT CCCC GGCTAT CCCACCAGTA TCCTCTGGTT CATGAACAAG TTTGGCATGG ACTATCTGGA
CGAGACCGAC CAGACTTCCT GCACCGCTG GAACTACCAT GGCTCCGGCA TCGGCAATGT GGAGTCCCTG GCCGCCGTCT
TCCTGCGCAA CTTCCATCAG GCCTACGTCT CCGGCAAGCA GCACGGCTTC GAGAACGGCC ACTTCTACCC TCTGGTGCAC
TGGCGCACCT CTTTCGGCAA CTACAAGGAG ATCCGCAAAAT ACCTCATCGA GTCCGCCGAA CTGCGGGAGA AGGTCAAGAA
GATCTCGGC AAACCTGGGGC CGTCTGGTGG ACGGCAAGAT CGTCATCCCC GAGGAAGTGG TCCACTACAG CGAATGGCTG
CACGTATGTC GCAACCGTAT CGCCAGCGAA TTGCAGACCA TCGACATGAG CAACATCCGG GTGA

>15/9

GTCCCGTGGT ACAAAGGTA CGCAGTCACC CGTAAACGG ACTCCCACTG CTTGTAGGCG TACGGTTTCA GGATCTATTT
CACTCCGCTC TCCGCGGTTT TTTTCGCCTT TCCCTCACGG TACTGGTTCA CTATCGGTCA GGGACGAGTA TTTAGCCTTG
GAGGATGGTC CCCCCATATT CAGACAGGAA TTCCCGAAGN CCAGGCCTTA TTTTGCTAAT CCCTATTTCC ACGAAAGATT
TTTCGGATAC GGTTTTATNA CCCACCACGG TACA

>16/9

GTCCCGTGGT GAGAATGTAG ATTTTAAGTT CGCTTATTTT TCCATTATAT GGTAGTAGAT AAGTAGGATG ACAGTTTATT
TAGTGCAATT GTGACTCTAC CGTACCGACA CTTGATTTTA TGTGGGTACC AGTGTAGGTT TTGCTTTCTG GCTACATAGT
ACGGGTTTAT GGGTAAGTGT TTTATGGGGG GTGAATGTGT GTATTGGAGT TTTGTATTTC TTTGTAAAAA CCAATTCTCA
ATGGGTAGGT ACCACGGGAC A

>53/9

AAGCGGCCTC TCTATCCACT CGCACTAACA TGATGCCCTC CTGTCAAAAT AGACGGTTAT CACATGGTGA TGGTTGCTCT
CCCGTGTGAC CACGCGGAGC ATCTTCCCTC GCTCCCCGTG GCACCTTGAGA AACGATTGTT TGCCGTCACG TACTTCTGTC
TTATCAGGCG TAAGGATTGC CGCTCAATCC ACTCCACTTT GAGGCCGCTT

>18/9

GTCCGTGGTA ATGACGCAAA AGTCGGTTAA TCATCCACCA AAGGAGTAAA TATTATGCTG GTTCAGCCGG TTGAAACTGA
AAACTAAACC ACGTTAATCA AAATGATTGA CATAAACATC AAAAGGAACC AGACGCCATG TATAAAGAAG AATCTTTCCG
TGAAGACGTT GCAAAAATGA TGGACACCTA TCAATCAGGT GTAAACGAAA GCAAACCTTT GGGCCATCTT GATCTGAATG
TGTAATCGAA GCTTCGGGAT TTTACGTTCG ACCACGGGAC A

>11/4

TTCCGTCCGC AGCAATCGGA TAAATTTTAA GGAGGAATGA CTGATGGCTA.CCCGTCCAC GGATATGGTG AATACTATGC
AGGACGCAGC GGTAACCTGC GGCCCGATCC CCGGCTCACA CAAGCGTTAC CTCGGTGGCG TGCGTTTCCC GGAATTGCGC
ATTCCCTTGC GGGAGATTGC GCNGAGCGAC TCCCGGAAGC GGGCATGGCA GCCTCGAAGT CNATCCGGCC ATCCCGGTCT
ATGATTGCAG CCGTCCCTAC NCCGACCGG ACGTGGTCAT CGATATTCAT GCGGAACG

>3/1

ATTCGATTGT AGCACTCCCC TGTTTGCCTT AATCGTGTAT ATTTTCATTC AAGCGTTGGG AATAAATATT AACCTTATGT
ATGTCCTGTA CATGCTGTTG TTAATTCCTT TTATAAAGAT CATTCTCGCT GGCGCGATTA TTGGCATTTT TAAATAAACC
GGTTTCCCAC TACTTAAGGA CCGTTGGCAC CACCCCTGCC TGAAAGACGA GGATTCCCTTA TCCGCGGATA ACGGCACACG
ATGGTCTTTA TTGCCGGTTCG TTATAGCTAC GGGAAACATT GAATAGCGAA AACTTTGCCA TTATCAGACT ATTTTATATG
ATTATCAATC ATTTGTTTTAT AATTTACATG GGTTTTTAAA TAGCTCTGGA CGGGTTTCCC CCTACAAAGT TACTTCTTGN
TTTCAAGCAG GTAAAGCGTC GTATGTTATA GGACCAGATT CTTTCATCTA ATCTTGAAGT GCGGTTTGCT CGTCTGAAAG
ATTTATGTCA ACAGCAGGAT GTGGAGTGCT ACA

>7/4

TAAGCCCGAG GAGGGATGTA TCAGATATAT CAGAAGTCGT AACCGACCTG AATACCGTAG GAGTTTTCGT ACATGGTGGC
ACTGGCAGGC ATAGGACCAC CGAAGGGGGA AGAACC GGCCGAT TGGTATTGGA GAACTCGTGC ATGTAGGCTT
CCGTCAGCTT CCAGCCCATG CCCAGCTTTT GCGTGGCGCC AAAGGTGATG GCATTCTGCA CGATGGCCGG GAAGATCAGA
TTGGAGGCGA TGGTGTGTGT GCTGATGGGA TTGGAACCC AGGTATAACC GGCACGTACC TGCAACCAGT TGTTCACGTC
ATACTGGGTA CCGAAGTTGG CCACCCACTG GTTGCTCCAG TGCATGGGGA GTGCAATGGA GGACAATCCT CCCACTGCTG
CGCCACCCTG ATATGCCGTC CATGGTCCAA AAATGGTGAA ATTGTTTCAT GTATTGTGCC CTCGGGCTTA

>2/4

TCATACCGTG GACAATTGGA CGTGGTGAAT CGCTGATTCT GTGACAGTAA TCGCAAAGGC GCAAACGAAA ACCCGCGTGG
CGCGAGGCTT GACGGCTCGC TCCGCGCGCC AAAGAAAGGA ATAGAAAATG GCTGACATTC AAGACTACGA CTCAACACCC
AAGTACGAAA CCTTCTCCTA TTTGCGGCA ATGGGACCGG NAAAAAATGC GTCGTCAGAT CGCCTATCTC GTGAACCAGG
GCTGGNAACC CCGGCATCGA GCATGTGGAG CCTGAACGCG CATCAACATA CTACTGGTAC ATGTGGAAAC TGCCCATGTT
CGGCGAGCAG TCACTGGACA CCGTTATTGC CGAAGTGGAG GCATGCCATC GCGCCANTC CAACCATCAC GTGCGCCTGA
TCGGGTATGA CAACTACTCG CAGAGCCAGG GCAGCGCTTT TGTGGTGTTC CGCGGGCGAT AAGCAAGATC GGTGCGGGGC
TATCCAGCGG GTGGCCCGCG CAGGGGTTTG ATGGATACNG AAGGATCAAG TCATGAGTGA CCTATGGCAA ACAATATGCG
TCCCACGGTA TG

**Expressão gênica sob vários fatores de estresse
de produtos de RAP-PCR isolados em resposta
a cobre e análise da presença/ausência dos
genes em diferentes linhagens**

Introdução

O gênero *Acidithiobacillus* compreende quatro espécies de bactérias Gram-negativas, acidofílicas e quimiolitotróficas obrigatórias, que obtêm energia a partir da oxidação de compostos sulfúricos reduzidos (Kelly & Wood, 2000). Dentre elas, *A. ferrooxidans* (Colmer *et al.*, 1950; Temple & Colmer, 1951; Kelly & Wood, 2000) é a única capaz de obter energia a partir da oxidação de íon ferroso (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings & Kusano, 1994).

A. ferrooxidans é um dos principais microrganismos responsáveis pela lixiviação de metais, podendo ser utilizado em processos industriais para obtenção de cobre, urânio ou metais preciosos, a partir de minérios de baixos teores (Hutchins *et al.*, 1986). Por outro lado, este organismo pode ser empregado na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados e em filtros para a eliminação do dióxido de enxofre, oferecendo uma alternativa mais econômica, rápida e benéfica para o meio ambiente em relação aos métodos convencionais (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert *et al.*, 1995; Bonaventura & Johnson, 1997).

Uma característica fisiológica muito interessante de *A. ferrooxidans* é a sua alta resistência a diversos metais pesados, como por exemplo cobre, zinco, arsênico e urânio (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994). Uma vez que durante o processo de biolixiviação ocorre acúmulo de metais pesados no meio (Natarajan *et al.*, 1994), a tolerância a metais é uma característica crucial para viabilizar a utilização de linhagens de *A. ferrooxidans* na biolixiviação (Bhattacharyya *et al.*, 1992).

Além de metais pesados, os efeitos de pH e temperaturas mais elevadas que as condições ótimas têm sido estudados em *A. ferrooxidans* (Jerez, 1988; Amaro *et al.*, 1991; Hubert *et al.*, 1995; Modak *et al.*, 1996). Tais estudos são muito importantes tendo-se em vista o papel deste organismo na biolixiviação, já que pH e temperatura afetam tanto o crescimento bacteriano como a solubilidade dos metais durante o processo de biolixiviação (Lombardi & Garcia, 1999). Além disso, a lixiviação ocorre muitas vezes sob temperaturas e pH mais elevados que

as condições ótimas de crescimento de acidithiobacilli (Modak *et al.*, 1996). Desta forma, os estudos genéticos dos efeitos dos metais pesados, temperatura e pH elevados podem contribuir para a obtenção de linhagens mais adequadas para a utilização em biohidrometalurgia.

No Capítulo 2, foram apresentados os resultados da caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em *A. ferrooxidans* através de RAP-PCR, no qual foram isolados fragmentos expressos diferencialmente em resposta ao metal. No presente capítulo, a expressão gênica na presença de cobre de cinco destes produtos de RAP-PCR foi comparada com a expressão em outras condições de estresse e em outra linhagem.

Além disso, linhagens de acidithiobacilli e *E. coli* foram analisadas quanto à presença dos genes, comparando-se os padrões de hibridização obtidos, afim de adquirir informações sobre a conservação destes genes no gênero *Acidithiobacillus*.

Materiais e métodos

1. Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho, bem como sua procedência, estão apresentadas na tabela 1. As linhagens de *A. ferrooxidans* LR e CMV, *Acidithiobacillus* sp. SSP e *A. thiooxidans* DAMS foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. O. Garcia Jr. (Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP).

As linhagens de acidithiobacilli foram cultivadas a 30°C em meio T&K modificado, pH 1,8 (Tuovinen & Kelly, 1973), suplementado com Fe^{2+} no caso de *A. ferrooxidans* e *Acidithiobacillus* sp. e enxofre elementar nas linhagens de *A. thiooxidans*. A linhagem de *E. coli* foi cultivada a 37°C, em meio LB (Sambrook *et al.*, 1989).

A linhagem brasileira de *A. ferrooxidans* LR (Garcia, 1991) foi selecionada para o estudo da expressão gênica diferencial na presença de cobre por ter

demonstrado tolerância a concentrações elevadas deste metal (Novo *et al.*, 2000). A linhagem foi cultivada em meio T&K modificado contendo 200 mM de sulfato de cobre.

A expressão gênica de produtos de RAP-PCR expressos diferencialmente na presença de 200 mM de sulfato de cobre na linhagem LR foi comparada com a expressão sob outras condições de cultivo, que representam outros fatores de estresse. Além disso, a expressão gênica na linhagem LR cultivada na presença de 200 mM de sulfato de cobre foi comparada com a expressão na linhagem CMV cultivada na mesma condição. A tabela 2 apresenta as condições de cultivo utilizadas.

Tabela 1: Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho e a sua procedência.

Linhagens bacterianas	Procedência
<i>A. ferrooxidans</i>	
ATCC 23270 ^T	Linhagem tipo obtida da coleção ATCC ¹ , USA. Isolada de efluente ácido de mina de carvão
LR	Isolada de efluente ácido de coluna de lixiviação de minério de urânio, Lagoa Real, Bahia, Brasil (Garcia, 1991)
CMV	Isolada de efluente de mina de ouro da Companhia Morro Velho, Minas Gerais, Brasil (isolada por R. Liberato)
<i>Acidithiobacillus</i> sp.	
SSP	Isolada de efluente de mina de carvão de Siderópolis, Santa Catarina, Brasil (Garcia, 1991)
<i>A. thiooxidans</i>	
ATCC 19377 ^T	Linhagem tipo obtida da coleção ATCC, USA. Isolada de Kimmeridge clay, Dorset, Inglaterra, Reino Unido
DAMS	Isolada de rejeito da unidade do CIPC, Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil
<i>E. coli</i>	
ATCC 25922	Isolado clínico, obtido da coleção ATCC, USA

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

Tabela 2: Condições de cultivo utilizadas para comparação da expressão gênica de produtos de RAP-PCR expressos diferencialmente na presença de 200 mM de sulfato de cobre.

Linhagem	Condições de cultivo		
	concentração de metal	pH	temperatura
<i>A. ferrooxidans</i> LR	200 mM de sulfato de cobre (controle)	1,8	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	50 mM de sulfato de cobre	1,8	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	100 mM de sulfato de cobre	1,8	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	600 mM de sulfato de zinco	1,8	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	60 mM de sulfato de cádmio	1,8	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	-	2,5	30°C
<i>A. ferrooxidans</i> LR	-	1,8	37°C
<i>A. ferrooxidans</i> CMV	200 mM de sulfato de cobre	1,8	30°C

2. Produtos de RAP-PCR

Dentre os produtos de RAP-PCR cujas seqüências foram apresentadas no Capítulo 2 do presente trabalho, foram escolhidos 5 dentre aqueles com os maiores coeficientes de indução ou aqueles que apresentaram homologia significativa com seqüências disponíveis em bancos de dados. Foram selecionados 4 produtos induzidos e um reprimido por cobre, como mostra a tabela 3.

Tabela 3: Produtos de RAP-PCR isolados em resposta a cobre em *A. ferrooxidans* LR utilizados no presente estudo.

Produtos de RAP-PCR ^a	Coefficiente de indução	Homologia
Induzidos por cobre		
40/9	18,5	citocromo c de <i>A. ferrooxidans</i> (Guiliani <i>et al.</i> , 1995)
37/9	6,04	-
51/8	5,7	-
11/4	1,4	gene <i>thiC</i> , biossíntese de tiamina de <i>Deinococcus radiodurans</i> (White <i>et al.</i> , 1999)
Reprimido por cobre		
2/4	0,69	operon carboxissomo de <i>A. ferrooxidans</i> (enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase, Kusano <i>et al.</i> , 1991)

(a) identificação, isolamento e análise dos produtos de RAP-PCR descritos no Capítulo 2 (artigo 2)

3. “Slot blot” de RNA

O método de “Slot blot” de RNA (Fleming *et al.*, 1998) foi utilizado na comparação da expressão gênica dos produtos de RAP-PCR em resposta a 200 mM de sulfato de cobre em relação a outras condições de estresse. A expressão gênica dos produtos de RAP-PCR foi também comparada nas linhagens LR e CMV (tabela 1), cultivadas na presença de 200 mM de sulfato de cobre.

3.1. Extração de RNA

As amostras de RNA foram extraídas de acordo com o método descrito por Winderickx & Castro (1994). A suspensão celular obtida nas condições descritas no item 1 foi ressuspendida em 1 mL de solução contendo EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M; sódioiodoacetato 10 mM (pH 7,5) e extraída com o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 25:24:1, v:v:v),

acrescido de 100 μ L de SDS 10%. O material foi agitado por 2 min e a seguir centrifugado a 4°C por 3 min a 8000 rpm. A fase aquosa foi recuperada e extraída novamente, até que a interface não fosse visível. O RNA foi então precipitado acrescentando-se 1/20 do volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto, e mantido a -20°C por pelo menos 2 h.

As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 min a 8000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Após a secagem do precipitado, o RNA obtido foi solubilizado em aproximadamente 100 μ L de água. As amostras foram estocadas a -70°C para melhor conservação do RNA.

3.2. Transferência para membrana de nylon

Três μ g das amostras de RNA foram diluídas em TE 1 x até completar 12,5 μ L, acrescentando-se a seguir 37,5 μ L de solução composta de 500 μ L de formamida deionizada, 162 μ L de formaldeído 37%, 100 μ L de MOPS 10 x. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e 50 μ L de SSC 20 x foram adicionados. As amostras foram então transferidas em duplicata para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia), através de sistema de “slot blot” Hybri-Slot (Gibco BRL). Após a transferência, as membranas foram incubadas a 80°C por 2 h.

3.3. Hibridização

Para a obtenção das sondas, os vetores de clonagem contendo os produtos de RAP-PCR foram digeridos com a enzima *EcoR* I (Amersham Pharmacia), os fragmentos foram separados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e os insertos foram purificados utilizando-se o kit “concert rapid gel extraction system”, de acordo com as especificações do fabricante (Gibco BRL).

Aproximadamente 30 ng dos fragmentos purificados foram marcados radioativamente com [α - 32 P]dCTP utilizando-se o kit Megaprime (Amersham Pharmacia), de acordo com as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas por no mínimo 2 h a 42°C em solução contendo formamida deionizada 50% (v/v); SSC 5 x; Denhart's 10 x (PVP 0,2%; ficoll 0,2%; BSA 0,2%); Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); SDS 1%; DNA de esperma de salmão desnaturado 100 μ g/ml.

Para a hibridização das membranas, foi utilizado tampão contendo formamida deionizada 50% (v/v); SSC 5 x; Denhart's 2 x; Tris-HCl 20 mM (pH 7,5); SDS 1%; sulfato de dextran 5%; DNA de esperma de salmão desnaturado 100 μ g/mL; 10^7 - 10^8 cpm/mL de sonda previamente desnaturada a 100°C por 5 min. As membranas foram incubadas a 42°C, durante a noite.

Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em solução contendo SSC 2 x e SDS 0,1%; por 15 min a temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas em SSC 0,5 x e SDS 0,1%; a 55°C, pelo tempo necessário para o decréscimo da radioatividade, monitorando-se com contador Geiger. Terminadas as lavagens, as membranas foram expostas a filme de raio-X para visualização dos resultados.

As imagens obtidas nos filmes autorradiográficos foram digitalizadas e a intensidade dos sinais de hibridização de cada amostra foi quantificada utilizando-se o programa CrazyQuant v. 1,3 (http://chroma.mbt.washington.edu/hood_www/crazyquant/Applet.htm). Os valores correspondentes à expressão gênica em cada fator de estresse foram calculados percentualmente em relação ao controle (200 mM de sulfato de cobre).

A quantidade de RNA imobilizada nas membranas foi normalizada através de hibridização utilizando-se como sonda o gene de rDNA 16S da linhagem *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T.

4. Análises através de “Southern blot”

Nestes experimentos foram analisadas as linhagens apresentadas na tabela 1, comparando-as quanto aos padrões obtidos após hibridização utilizando como sonda os produtos de RAP-PCR isolados na linhagem LR.

4.1. Isolamento de DNA

O isolamento de DNA seguiu o método descrito por Goss *et al.* (1990), com modificações. A suspensão celular foi lavada aproximadamente 6 vezes com TE 1 x (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0), ressuspendida em 1 mL de tampão TAS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM) e centrifugada por 2 min.

O precipitado foi ressuspendido em 500 µL de tampão TAS contendo 150 µg de proteinase K, adicionando-se a seguir 50 µL de SDS 10%. As amostras foram incubadas por 1 h a 50°C, sendo então extraídas com 500 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 24:1, v:v) e tratadas com 4 µL de RNase (10 mg/mL) a temperatura ambiente, por no mínimo 30 min. A seguir, foi realizada uma extração com 500 µL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v). O material foi agitado por 3 min e então centrifugado por 5 min. A fase aquosa foi recuperada e extraída com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v:v), centrifugando-se nas condições anteriores. As amostras de DNA foram precipitadas com 0,1 volume de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol absoluto. Após a precipitação, as amostras foram lavadas em etanol 70%, ressuspendidas em TE e estocadas a 4°C.

4.2. Transferência para membrana de nylon

Cinco µg de DNA genômico foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *BamH* I e *Hind* III (Gibco BRL), de acordo com as especificações do fabricante.

As amostras digeridas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%, coradas com brometo de etídio e fotografadas sob luz UV. Após a eletroforese, as amostras de DNA foram transferidas para membranas de nylon através do método de Southern (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3. Hibridização

Para a hibridização das membranas, foram utilizados como sondas os produtos de RAP-PCR (tabela 3) purificados e marcados radioativamente conforme descrito no item 3.3.

As condições de pré-hibridização e hibridização também seguiram o descrito no item 3.3. Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em solução contendo SSC 2 x e SDS 0,1%; por 15 min a temperatura ambiente e a seguir em SSC 0,1 x e SDS 0,1%; a 55–60°C, pelo tempo necessário para o decréscimo da radioatividade, monitorando-se com contador Geiger. Terminadas as lavagens, as membranas foram expostas a filme de raio-X para visualização dos resultados.

Resultados e discussão

No Capítulo 2 deste trabalho foi apresentada a caracterização da expressão gênica diferencial na presença de cobre em *A. ferrooxidans*, utilizando o método de RAP-PCR (Welsh *et al.*, 1992). No presente capítulo, serão apresentadas as análises de 5 produtos de RAP-PCR selecionados dentre os 17 seqüenciados (artigo 2, tabela 2). Os produtos de RAP-PCR foram escolhidos/dentre aqueles com os maiores coeficientes de indução ou aqueles cujas seqüências

nucleotídicas apresentaram homologia significativa com seqüências disponíveis em bancos de dados (tabela 3).

A expressão gênica sob diversas condições de estresse dos 5 produtos de RAP-PCR foi comparada com a expressão na presença de cobre através do método de “Slot blot” de RNA. Além disso, a presença dos genes correspondentes a estes produtos foi averiguada em 7 linhagens através de experimentos de “Southern blot”, e os padrões de hibridização obtidos foram comparados.

1. “Slot blot” de RNA

A expressão gênica de 5 produtos de RAP-PCR em resposta a 200 mM de sulfato de cobre foi comparada com a expressão em 50 mM e 100 mM de sulfato de cobre, 600 mM de sulfato de zinco e 60 mM de sulfato de cádmio. Além da presença de metais, foram testados também pH (2,5) e temperatura (37°C) acima das condições ótimas de cultivo (Garcia, 1989). A expressão gênica dos produtos de RAP-PCR nas linhagens de *A. ferrooxidans* LR e CMV cultivadas na presença de 200 mM de sulfato de cobre foi comparada (tabela 2).

Para tanto, amostras de RNA obtidas nas condições descritas na tabela 2 foram transferidas em duplicata para membranas de nylon através do método de “Slot blot” e as membranas foram hibridizadas utilizando como sonda os produtos de RAP-PCR (tabela 3). Os sinais de hibridização gerados foram quantificados e os valores foram normalizados através de hibridização com sonda de rDNA 16S obtida a partir da linhagem de *A. ferrooxidans* 23270^T. A utilização de genes de rDNA ou outros genes constitutivos na normalização da quantidade de RNA apresenta limitações, uma vez que sua expressão pode eventualmente ser afetada pela condição de estresse a qual as células estão submetidas (Spanakis, 1993). Ainda assim, este procedimento é comumente aceito e seu emprego é relatado em estudos baseados em “fingerprinting” de RNA (Wesh *et al.*, 1992; Wong & McClelland, 1994).

A comparação da expressão gênica dos produtos de RAP-PCR em 200 mM, 50 mM e 100 mM de sulfato de cobre revelou que a expressão gênica de

4 produtos de RAP-PCR induzidos por cobre (40/9, 37/9, 51/8 e 11/4) apresenta níveis mais baixos em 50 mM de sulfato de cobre, elevando-se em 100 mM e atingindo o nível mais alto em 200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 4, amostras 1, 2 e 3). O produto reprimido por cobre apresentou níveis de expressão equivalentes em 50 e 100 mM de sulfato de cobre, mais elevados em relação a 200 mM (figura 5, amostras 1, 2 e 3).

Além do cobre, a resistência a outros metais pesados tem sido observada em *A. ferrooxidans* (Rawlings & Kusano, 1994). Novo *et al.* (2000) investigaram os padrões protéicos da linhagem LR cultivada na presença de cobre, cádmio, zinco e níquel e observaram que os metais induziram alterações na síntese de proteínas. No presente trabalho, os níveis de expressão gênica dos produtos de RAP-PCR em 600 mM de sulfato de zinco e 60 mM de sulfato de cádmio foram comparados com 200 mM de sulfato de cobre.

As análises por "Slot blot" de RNA revelaram que todos os produtos de RAP-PCR testados apresentam níveis de expressão gênica mais baixos na presença de 600 mM de sulfato de zinco em relação a 200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 5, amostras 1 e 4). O mesmo ocorreu com 60 mM de sulfato de cádmio, exceto no caso dos produtos 40/9 (figura 1, amostras 1 e 5) e 2/4 (figura 5, amostras 1 e 5), este último reprimido por cobre. Os níveis de expressão gênica dos fragmentos 40/9, 51/8, 11/4 e 2/4 na presença de zinco foram menores em relação ao cádmio (figuras 1, 3, 4 e 5, respectivamente, amostras 4 e 5), e no caso do fragmento 37/9 os níveis de expressão foram equivalentes (figura 2, amostras 4 e 5).

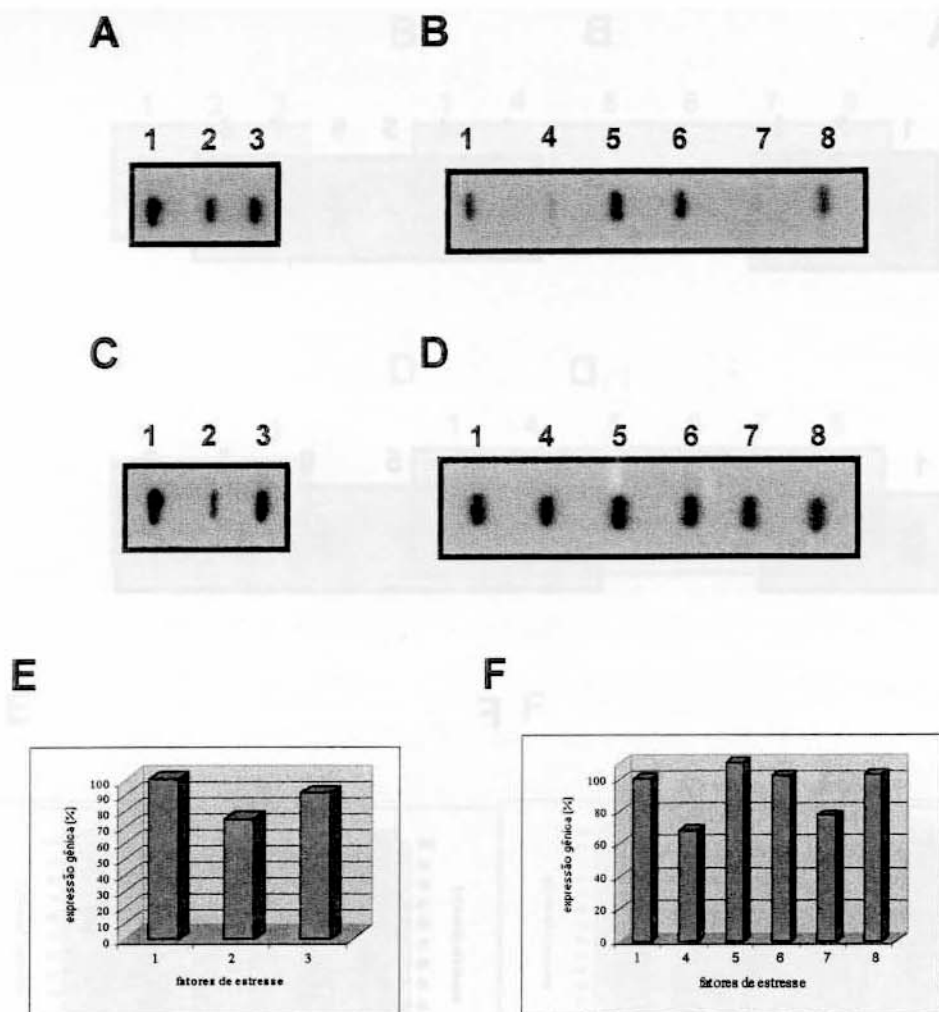


Figura 1: “Slot blot” de RNA obtido a partir das linhagens de *A. ferrooxidans* LR (1 a 7) e CMV (8), utilizando como sonda o fragmento 40/9 (A e B) e rDNA 16S (C e D) para normalização da quantidade de RNA. E e F: Expressão gênica (porcentagem em relação a 200 mM de sulfato de cobre). Fatores de estresse: (1) 200 mM de sulfato de cobre; (2) 50 mM de sulfato de cobre; (3) 100 mM de sulfato de cobre; (4) 600 mM de sulfato de zinco; (5) 60 mM de sulfato de cádmio; (6) 37°C; (7) pH 2,5; (8) linhagem CMV, 200 mM de sulfato de cobre.

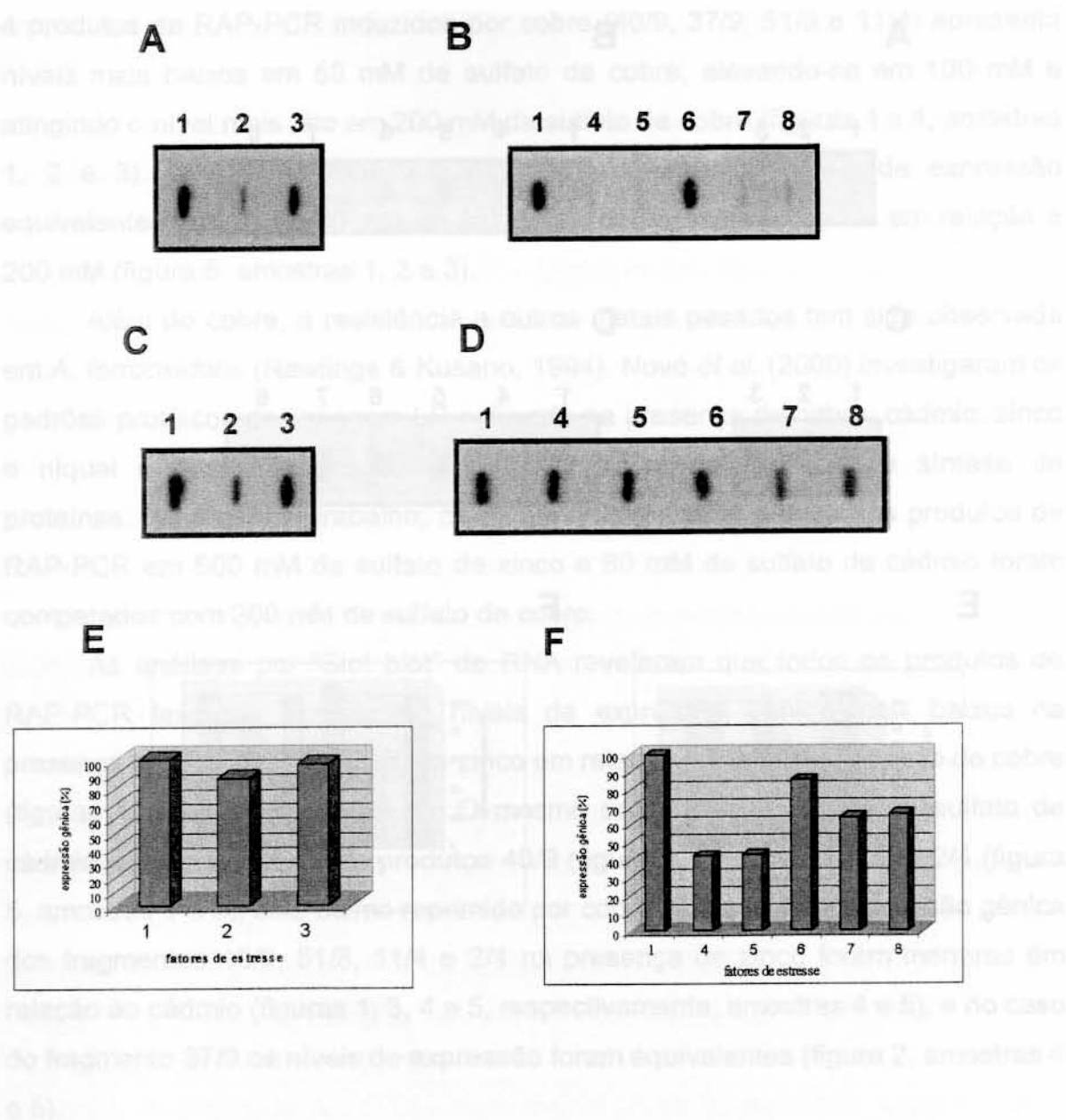


Figura 2: "Slot blot" de RNA obtido a partir das linhagens de *A. ferrooxidans* LR (1 a 7) e CMV (8), utilizando como sonda o fragmento 37/9 (A e B) e rDNA 16S (C e D) para normalização da quantidade de RNA. E e F: Expressão gênica (porcentagem em relação a 200 mM de sulfato de cobre). Fatores de estresse: (1) 200 mM de sulfato de cobre; (2) 50 mM de sulfato de cobre; (3) 100 mM de sulfato de cobre; (4) 600 mM de sulfato de zinco; (5) 60 mM de sulfato de cádmio; (6) 37°C; (7) pH 2,5; (8) linhagem CMV, 200 mM de sulfato de cobre.

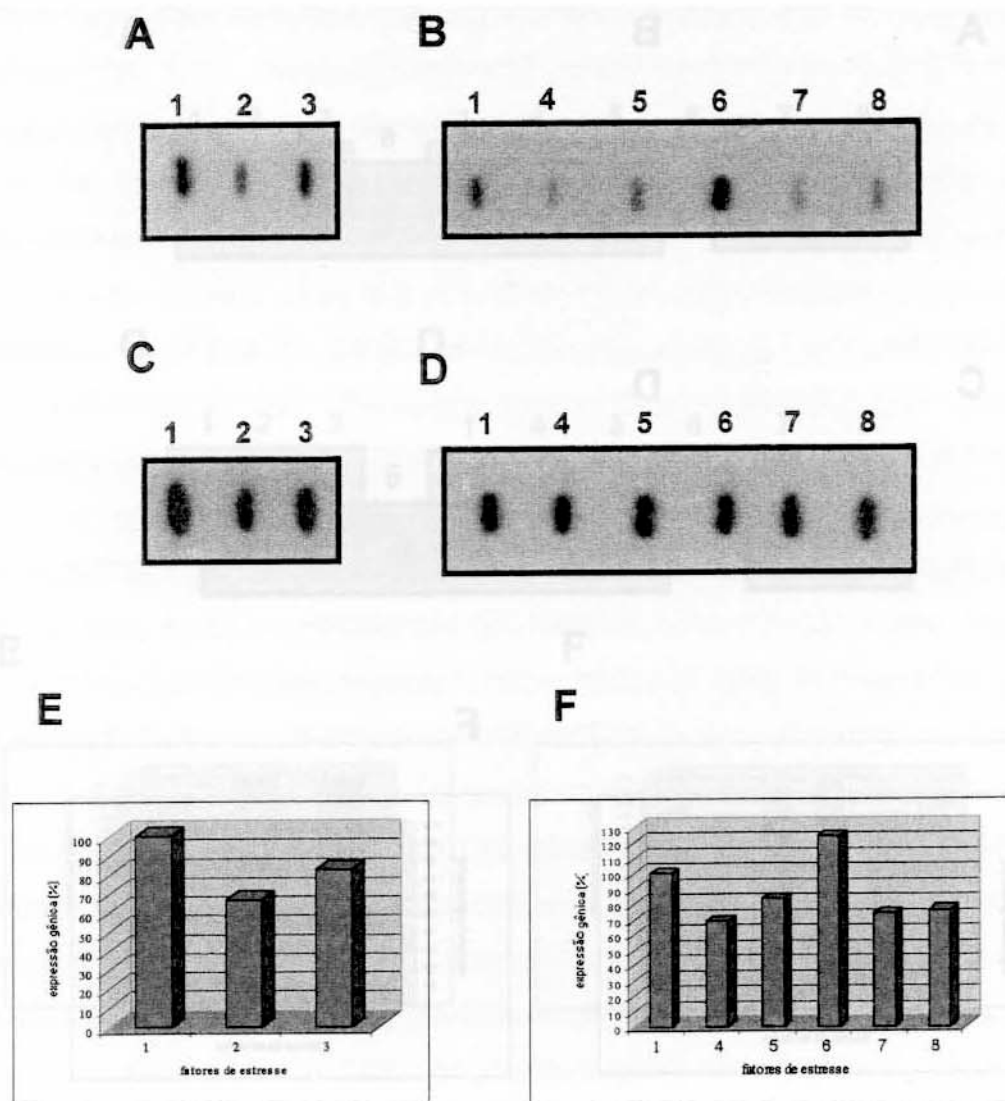


Figura 3: "Slot blot" de RNA obtido a partir das linhagens de *A. ferrooxidans* LR (1 a 7) e CMV (8), utilizando como sonda o fragmento 51/8 (A e B) e rDNA 16S (C e D) para normalização da quantidade de RNA. E e F: Expressão gênica (porcentagem em relação a 200 mM de sulfato de cobre). Fatores de estresse: (1) 200 mM de sulfato de cobre; (2) 50 mM de sulfato de cobre; (3) 100 mM de sulfato de cobre; (4) 600 mM de sulfato de zinco; (5) 60 mM de sulfato de cádmio; (6) 37°C; (7) pH 2,5; (8) linhagem CMV, 200 mM de sulfato de cobre.

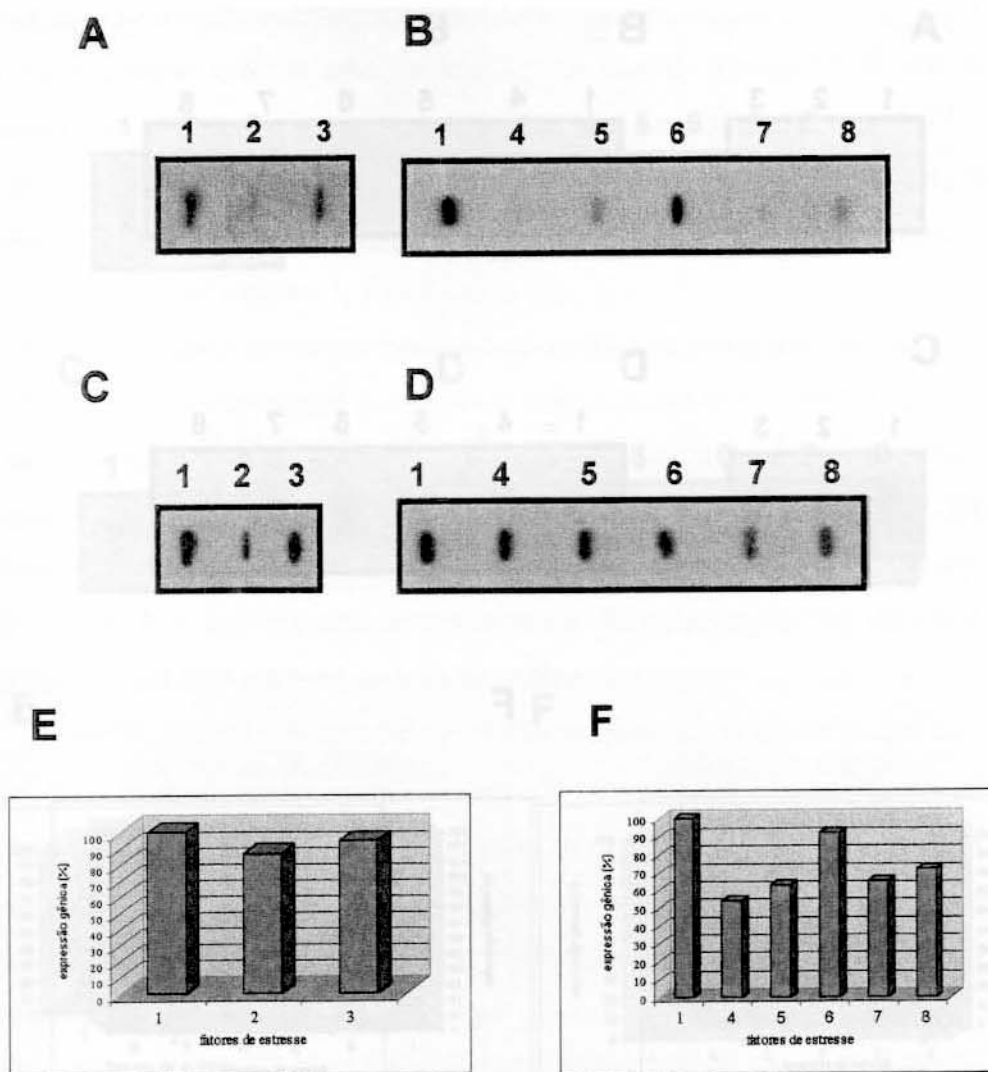


Figura 4: "Slot blot" de RNA obtido a partir das linhagens de *A. ferrooxidans* LR (1 a 7) e CMV (8), utilizando como sonda o fragmento 11/4 (A e B) e rDNA 16S (C e D) para normalização da quantidade de RNA. E e F: Expressão gênica (porcentagem em relação a 200 mM de sulfato de cobre). Fatores de estresse: (1) 200 mM de sulfato de cobre; (2) 50 mM de sulfato de cobre; (3) 100 mM de sulfato de cobre; (4) 600 mM de sulfato de zinco; (5) 60 mM de sulfato de cádmio; (6) 37°C; (7) pH 2,5; (8) linhagem CMV, 200 mM de sulfato de cobre.

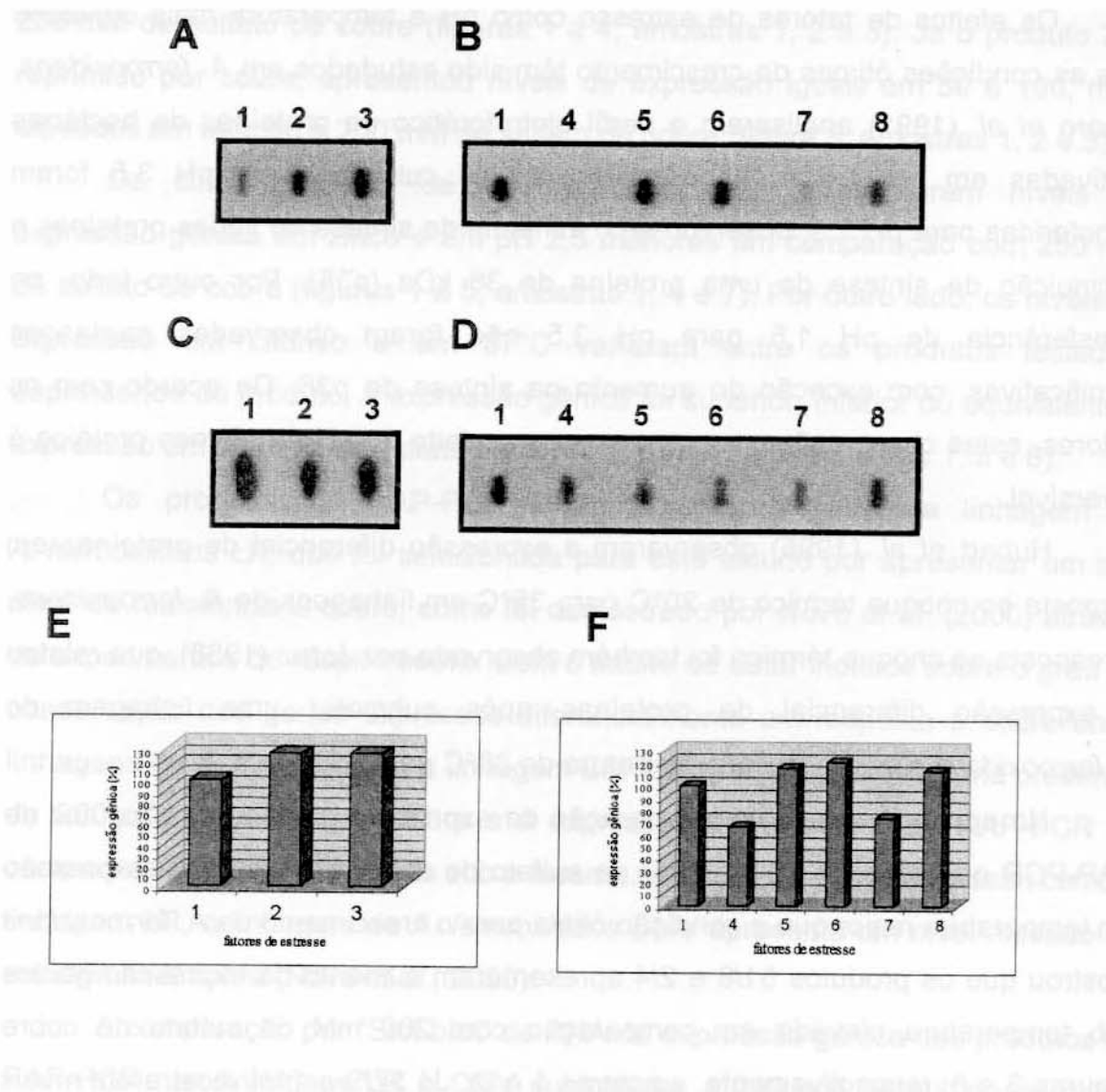


Figura 5: "Slot blot" de RNA obtido a partir das linhagens de *A. ferrooxidans* LR (1 a 7) e CMV (8), utilizando como sonda o fragmento 2/4 (A e B) e rDNA 16S (C e D) para normalização da quantidade de RNA. E e F: Expressão gênica (porcentagem em relação a 200 mM de sulfato de cobre). Fatores de estresse: (1) 200 mM de sulfato de cobre; (2) 50 mM de sulfato de cobre; (3) 100 mM de sulfato de cobre; (4) 600 mM de sulfato de zinco; (5) 60 mM de sulfato de cádmio; (6) 37°C; (7) pH 2,5; (8) linhagem CMV, 200 mM de sulfato de cobre.

Os efeitos de fatores de estresse como pH e temperatura mais elevados que as condições ótimas de crescimento têm sido estudados em *A. ferrooxidans*. Amaro *et al.* (1991) analisaram o perfil eletroforético de proteínas de bactérias cultivadas em pH 1,5 e 3,5. Quando células cultivadas em pH 3,5 foram transferidas para pH 1,5, observou-se o aumento da síntese de várias proteínas e diminuição de síntese de uma proteína de 36 kDa (p36). Por outro lado, na transferência de pH 1,5 para pH 3,5 não foram observadas mudanças significativas, com exceção do aumento na síntese de p36. De acordo com os autores, estas observações comprovam que o efeito do pH na síntese protéica é reversível.

Hubert *et al.* (1995) observaram a expressão diferencial de proteínas em resposta ao choque térmico de 20°C para 35°C em linhagens de *A. ferrooxidans*. A resposta ao choque térmico foi também observada por Jerez (1988), que relatou a expressão diferencial de proteínas após submeter uma linhagem de *A. ferrooxidans* a variação de temperatura de 30°C para 41°C.

No presente estudo, a comparação da expressão gênica dos produtos de RAP-PCR na presença de 200 mM de sulfato de cobre em relação à expressão em temperatura maior que a condição ótima para o crescimento de *A. ferrooxidans* mostrou que os produtos 51/8 e 2/4 apresentaram aumento da expressão gênica sob temperatura elevada em comparação com 200 mM de sulfato de cobre (figuras 3 e 5, respectivamente, amostras 1 e 6). Já 37/9 e 11/4 mostraram níveis de expressão menor em relação ao cobre (figuras 2 e 4, respectivamente, amostras 1 e 6) e em 40/9 a expressão se manteve aproximadamente constante (figura 1, amostras 1 e 6). No caso do estresse a pH, todos os produtos apresentaram níveis de expressão mais baixo na condição de crescimento com pH alterado em relação a 200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 5, amostras 1 e 7). Estudos anteriores utilizando a linhagem de *A. ferrooxidans* LR demonstraram que valores de pH acima de 2,3 afetam substancialmente o crescimento celular (Garcia, 1989).

Em resumo, os resultados mostraram que os produtos de RAP-PCR induzidos por cobre possuem níveis de expressão crescentes em 50, 100 e

200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 4, amostras 1, 2 e 3). Já o produto 2/4, reprimido por cobre, apresentou níveis de expressão iguais em 50 e 100, mais elevados em relação a 200 mM de sulfato de cobre (figura 5, amostras 1, 2 e 3).

Os cinco produtos de RAP-PCR testados apresentaram níveis de expressão gênica em zinco e em pH 2,5 menores em comparação com 200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 5, amostras 1, 4 e 7). Por outro lado, os níveis de expressão em cádmio e em 37°C variaram entre os produtos testados: dependendo do produto, a expressão gênica foi superior, inferior ou equivalente à expressão em 200 mM de sulfato de cobre (figuras 1 a 5, amostras 1, 5 e 6).

Os produtos de RAP-PCR foram isolados a partir da linhagem de *A. ferrooxidans* LR, que foi selecionada para este estudo por apresentar um alto nível de resistência a cobre, como foi demonstrado por Novo *et al.* (2000) através de experimentos de respirometria. Com o intuito de obter indícios sobre o grau de conservação dos genes expressos diferencialmente em resposta a cobre entre linhagens de *A. ferrooxidans*, a linhagem CMV (tabela 1) foi cultivada na presença de 200 mM de sulfato de cobre e a expressão dos produtos de RAP-PCR foi comparada nas duas linhagens sob a mesma condição de estresse. Assim como a linhagem LR, a linhagem de *A. ferrooxidans* CMV apresenta um nível elevado de resistência a cobre (Novo *et al.*, 2000).

A comparação por "Slot blot" de RNA da expressão gênica dos produtos de RAP-PCR nas linhagens LR e CMV submetidas a 200 mM de sulfato de cobre revelou que os níveis de expressão de 3 produtos induzidos por cobre é menor na CMV (figuras 2, 3 e 4, amostras 1 e 8). Somente em um dos produtos induzidos por cobre a expressão gênica nas duas linhagens manteve-se aproximadamente constante (figura 1, amostras 1 e 8). Já o produto 2/4, reprimido por cobre, é mais expresso na linhagem CMV em relação à LR (figura 5, amostras 1 e 8). Os resultados obtidos mostraram portanto que os padrões de expressão gênica da maioria dos produtos de RAP-PCR testados são diferentes nas linhagens de *A. ferrooxidans* LR e CMV, apesar de ambas serem tolerantes a cobre.

2. Análises por “Southern blot”

Utilizando o método de Southern (Sambrook *et al.*, 1989), a presença de genes correspondentes aos produtos de RAP-PCR (tabela 3) foi averiguada em 6 linhagens de *Acidithiobacillus* spp. e em uma linhagem de *E. coli*. As linhagens incluídas no estudo estão apresentadas na tabela 1.

Foram analisadas as linhagens de *A. ferrooxidans* LR (a partir da qual os produtos de RAP-PCR foram isolados); *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T (linhagem tipo da espécie); *A. ferrooxidans* CMV (linhagem tolerante a cobre, Novo *et al.*, 2000); *Acidithiobacillus* sp. SSP (linhagem divergente das demais, conforme dados apresentados no Capítulo 1, artigo 1); *A. thiooxidans* ATCC 19377^T (linhagem tipo da espécie) e *A. thiooxidans* DAMS (linhagem mais divergente da espécie, Capítulo 1, artigo 1); além da linhagem de *E. coli* ATCC 25922. Esta última foi incluída para compararmos os padrões dos genes em um gênero distinto.

O DNA genômico das linhagens foi digerido separadamente com as enzimas *Bam*H I e *Hind* III e os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose e transferidos para membrana de nylon. As membranas foram hibridizadas utilizando-se como sonda os produtos de RAP-PCR (tabela 3), e os padrões obtidos são apresentados nas figuras 6 a 10.

A análise por “Southern blot” revelou que não foi possível detectar sinal de hibridização do DNA das linhagens de *A. thiooxidans* e *E. coli* com qualquer uma das sondas, nas condições de estringência utilizadas nos experimentos. Este resultado reflete a diversidade genética existente em *Acidithiobacillus* spp. e principalmente em relação a *E. coli*, que pertence a um gênero diferente.

Por outro lado, tem sido relatado um alto grau de resistência a cobre em linhagens pertencentes à espécie *A. ferrooxidans* (Hutchins *et al.*, 1986; Rawlings & Kusano, 1994), mas não em linhagens de *A. thiooxidans*. A não detecção dos genes expressos diferencialmente em resposta a cobre em *A. thiooxidans* está portanto coerente com essas observações.

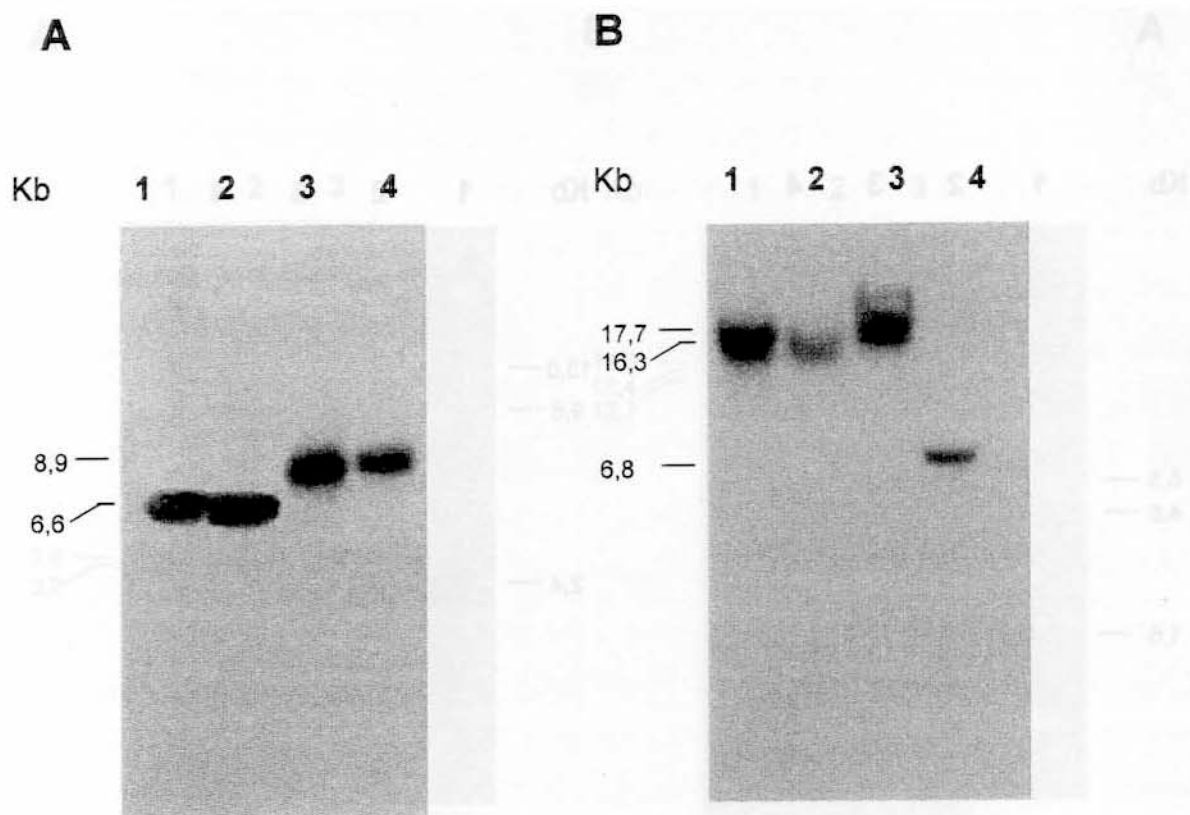


Figura 6: Padrões obtidos através da digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H I (A) e *Hind* III (B) e hibridização utilizando como sonda o produto de RAP-PCR 11/4. (1) *A. ferrooxidans* LR; (2) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; (3) *A. ferrooxidans* CMV; (4) *Acidithiobacillus* sp. SSP.

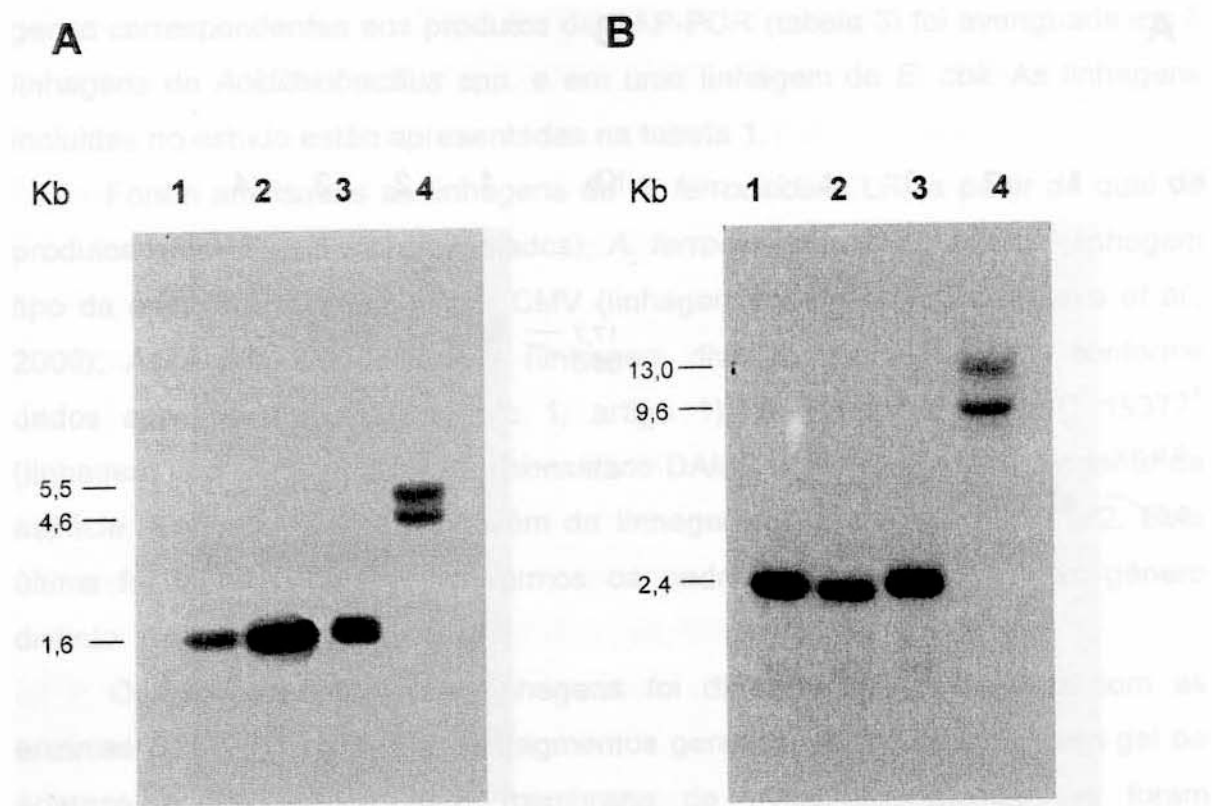


Figura 7: Padrões obtidos através da digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H I (A) e *Hind* III (B) e hibridização utilizando como sonda o produto de RAP-PCR 2/4. (1) *A. ferrooxidans* LR; (2) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; (3) *A. ferrooxidans* CMV; (4) *Acidithiobacillus* sp. SSP.

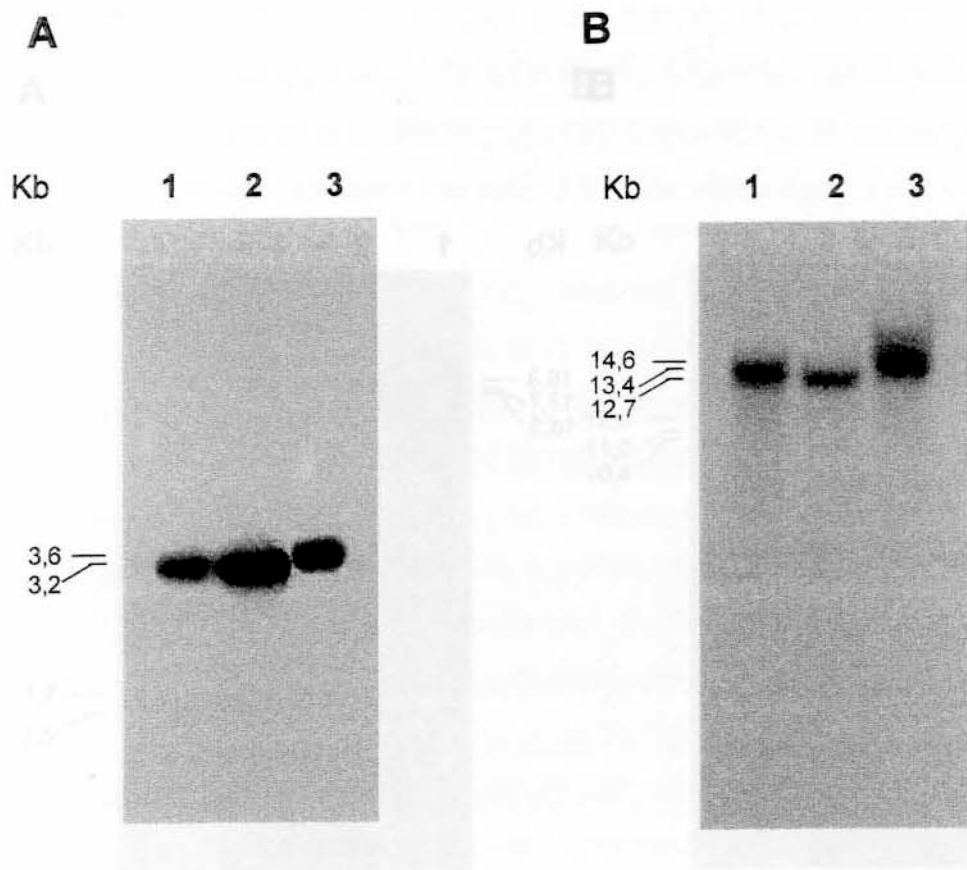


Figura 8: Padrões obtidos através da digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H I (A) e *Hind* III (B) e hibridização utilizando como sonda o produto de RAP-PCR 51/8. (1) *A. ferrooxidans* LR; (2) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; (3) *A. ferrooxidans* CMV.

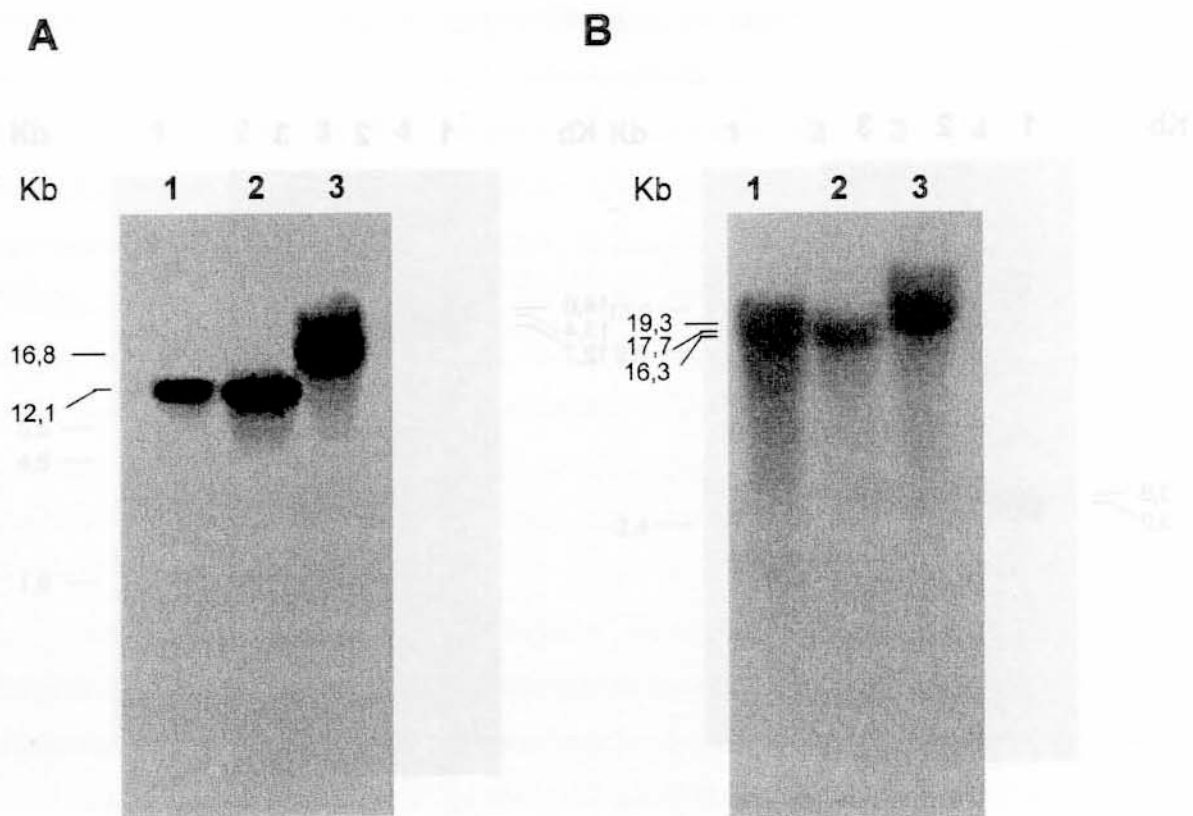


Figura 9: Padrões obtidos através da digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H I (A) e *Hind* III (B) e hibridização utilizando como sonda o produto de RAP-PCR 37/9. (1) *A. ferrooxidans* LR; (2) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; (3) *A. ferrooxidans* CMV.

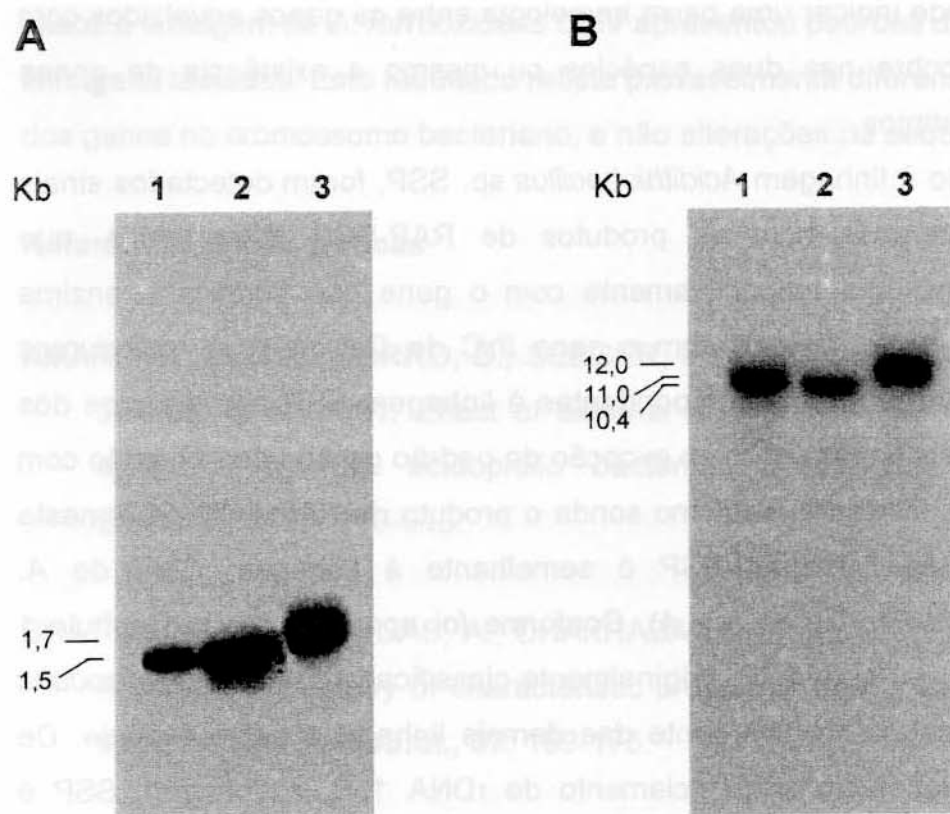


Figura 10: Padrões obtidos através da digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H I (A) e *Hind* III (B) e hibridização utilizando como sonda o produto de RAP-PCR 40/9. (1) *A. ferrooxidans* LR; (2) *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T; (3) *A. ferrooxidans* CMV.

Ao contrário de *A. thiooxidans*, foram identificadas linhagens de *E. coli* tolerantes a metais, embora não em níveis equivalentes a *A. ferrooxidans* (Brown *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 2000). A não detecção de sinal de hibridização da linhagem de *E. coli* com os produtos de RAP-PCR isolados a partir de *A. ferrooxidans* pode indicar uma baixa homologia entre os genes envolvidos com a resistência a cobre nas duas espécies ou mesmo a existência de genes evolutivamente distintos.

Com relação à linhagem *Acidithiobacillus* sp. SSP, foram detectados sinais de hibridização apenas com os produtos de RAP-PCR 2/4 e 11/4, que apresentaram homologia respectivamente com o gene que codifica a enzima RUBISCO de *A. ferrooxidans* e com o gene *thiC* de *Deinococcus radiodurans* (figuras 6 e 7). Os padrões correspondentes à linhagem SSP são distintos dos padrões das demais linhagens, com exceção do padrão gerado por digestão com a enzima *BamH* I, utilizando-se como sonda o produto de RAP-PCR 11/4: neste caso, o padrão da linhagem SSP é semelhante à linhagem CMV de *A. ferrooxidans* (figura 6A, linhas 3 e 4). Conforme foi apresentado no Capítulo 1 deste trabalho, a linhagem SSP, originalmente classificada como *A. ferrooxidans* (Garcia, 1991) mostrou-se divergente das demais linhagens desta espécie. De acordo com os dados do seqüenciamento de rDNA 16S, a linhagem SSP é filogeneticamente relacionada às espécies *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*. No caso da hibridização com o produto 2/4, os padrões obtidos apresentaram duas bandas (figura 7, linha 4), o que pode indicar presença de sítios de restrição de *BamH* I e *Hind* III na região do gene homóloga à sonda utilizada ou ainda a presença de duas cópias gênicas.

A maioria dos padrões correspondentes à linhagem LR de *A. ferrooxidans*, da qual foram isolados os produtos de RAP-PCR utilizados como sondas, foi semelhante aos padrões da linhagem tipo de *A. ferrooxidans* (figuras 6, 7, 8A, 9A e 10A, linhas 1 e 2). Além da linhagem tipo, a comparação da linhagem LR com as demais revelou similaridade com o padrão da linhagem CMV, no caso da hibridização com o produto 2/4 (figura 7, linhas 1 e 3).

A linhagem de *A. ferrooxidans* CMV foi incluída nas análises por apresentar, assim como a linhagem LR, níveis elevados de resistência a cobre (Novo *et al.*, 2000). Com exceção dos padrões gerados pela hibridização com os produtos de RAP-PCR 11/4 (figura 6A, linhas 3 e 4) e 2/4 (figura 7, linhas 1, 2 e 3), nos demais casos a linhagem de *A. ferrooxidans* CMV apresentou padrões distintos das outras linhagens testadas. Este resultado reflete provavelmente diferenças na localização dos genes no cromossomo bacteriano, e não alterações na sequência gênica.

Referências bibliográficas

- AMARO, A. M.; CHAMORRO, D.; SEEGER, M.; ARREDONDO, R.; PEIRANO, 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.
- BHATTACHARYYA, S.; DAS, A.; CHAKRABARTI, B. K.; BANERJEE, P. C. 1992. A comparative study of characteristic properties of *Thiobacillus ferrooxidans* strains. **Folia Microbiol.**, **37**: 169-175.
- BONAVENTURA, C. & JOHNSON, F. M. 1997. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. **Environ. Health Persp.**, **105**: 5-20.
- BROWN, N. L.; BARRETT, S. R.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T.; ROUCH, D. A. 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. **Mol. Microbiol.**, **17**: 1153-1166.
- COLMER, A. R.; TEMPLE, K. L.; HINKLE, M. E. 1950. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. **J. Bacteriol.**, **59**: 317-328.

- FLEMING, J. T.; YAO, W. H.; SAYLER, G. S. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 3698-3706.
- GARCIA Jr., O. 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Rev. Microbiol.**, **22**: 1-6.
- GARCIA Jr., O. 1989. Estudo da biolixiviação de minério de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans*. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- GOSS, T. J.; O'HARA, G. W.; DILWORTH, M. J.; 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.
- GUILIANI, N.; BENGRINE, A.; BORNE, F.; CHIPPAUX, M.; BONNEFOY, V. 1995. Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*: advancement and projects - sequence and analysis of *rus* gene encoding rusticyanin and *alaS* gene encoding alanyl tRNA synthetase (in) Holmes, D.S., Smith, R.W. and Warrendale, P.A. (Eds.); **Minerals Bioprocessing II**: 95-110; The Minerals, Metals and Materials Society .
- HUBERT, W. A.; LEDUC, L. G.; 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.; BRIERLEY, C. L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Annu. Rev. Microbiol.**, **40**: 311-336.

- JEREZ, C. A. 1988. The heat shock response in meso- and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, **56**: 289-294.
- KELLY, D. P. & WOOD, A. P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **50**: 511-516.
- KUSANO, T.; TAKESHIMA, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K. 1991. Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **173**: 7313-7323.
- LEDUC, L. G. & FERRONI, G. D. 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiol. Rev.**, **14**: 103-120.
- LOMBARDI, A. T. & GARCIA Jr., O. 1999. An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. **Crit. Rev. Microbiol.**, **25**: 275-288.
- LUNDGREN, D. G. & SILVER, M. 1980. Ore leaching by bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, **34**: 263-283.
- MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A.; MUKHOPADHYAY, S. 1996. Development of temperature-tolerant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetics. **Hydrometallurgy**, **42**: 51-61.
- NATARAJAN, K. A.; SUDEESHA, K.; RAO, R. 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, **66**: 303-306.

- NOVO, M. T.; DA SILVA, A. C.; MORETO, R.; CABRAL, P. C.; COSTACURTA, A.; GARCIA JR, O.; OTTOBONI, L. M. 2000. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **77**: 187-195.
- RAWLINGS, D. E. & KUSANO, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Microbiol. Rev.**, **58**: 39-55.
- RENSING, C.; FAN, B.; SHARMA, R.; MITRA, B.; ROSEN, B. P. 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 652-656.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. E. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- SPANAKIS, E. 1993. Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. **Nucleic Acids Res.**, **21**: 3809-3819.
- SHIRATORI, T. & SONTA, H. 1993. Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. **FEMS Microbiol. Rev.**, **11**: 165-174.
- TEMPLE, K. L. & COLMER, A. R. 1951. An autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **62**: 605-611.
- TUOVINEN, O. H. & KELLY, D. P. 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with ¹⁴CO₂ fixation and iron oxidation as measures of growth. **Arch. Microbiol.**, **88**: 285-298.

- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; McCLELLAND, M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic. Acids Res.**, **20**: 4965- 4970.
- 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.; MINTON, K. W.; FLEISCHMANN, R. D.; KETCHUM, K. A.; NELSON, K. E.; SALZBERG, S.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. **Science**, **286**: 1571-1577.
- WINDERICKX, J. & 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. & McCLELLAND, M. 1994. Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 639-643.

CONCLUSÕES

1. A caracterização molecular de *Acidithiobacillus* spp. através de ribotipagem, BOX-PCR e ERIC-PCR revelou uma grande diversidade genética entre as linhagens analisadas;
2. Experimentos de hibridização DNA-DNA mostraram um baixo grau de homologia da linhagem SSP, até então classificada como *A. ferrooxidans*, com relação à linhagem tipo da espécie, sugerindo a necessidade de reclassificação da linhagem;
3. De acordo com as análises de seqüências de rDNA 16S, a linhagem SSP é filogeneticamente relacionada às espécies *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*;
4. A caracterização do perfil de expressão gênica diferencial na presença de 200 mM de sulfato de cobre em *A. ferrooxidans* através de RAP-PCR permitiu a identificação de 104 fragmentos gênicos expressos diferencialmente;
5. Através de hibridização de “Slot blot” de DNA, foi confirmada a expressão diferencial de 69 produtos de RAP-PCR, dos 99 testados;
6. Entre os produtos de RAP-PCR analisados, foram identificadas seqüências homólogas ao gene do citocromo c, ao operon que codifica a enzima RUBISCO e a gene relacionado com a biossíntese de tiamina; além de proteínas com função ainda desconhecida;
7. A análise da expressão gênica de produtos de RAP-PCR em resposta a três diferentes concentrações de cobre revelou que os produtos induzidos por cobre apresentam níveis crescentes da expressão gênica em 50, 100 e 200 mM de sulfato de cobre;

8. A expressão gênica dos produtos de RAP-PCR na presença de outros fatores de estresse apresenta níveis diferentes em relação à expressão na presença de cobre;
9. Os níveis de expressão gênica da maioria dos produtos de RAP-PCR induzidos por cobre na presença de 200 mM de sulfato de cobre são menores na linhagem CMV de *A. ferrooxidans* quando comparados à linhagem LR, da qual os produtos foram isolados;
10. A presença dos genes correspondentes aos produtos de RAP-PCR não foi detectada em linhagens de *A. thiooxidans* e *E. coli*. No caso da linhagem *Acidithiobacillus* sp. SSP, apenas dois dos genes testados foram detectados. A linhagem LR apresentou, na maioria dos casos, os mesmos padrões de hibridização que a linhagem tipo de *A. ferrooxidans*. Já a linhagem de *A. ferrooxidans* CMV mostrou padrões distintos das demais linhagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEMANY, C.; NOE, V.; CIUDAD, C. J. 2000. Identification by RNA-based arbitrarily primed PCR of the involvement of cytochrome c oxidase in the development of resistance to methotrexate. **Biochim. Biophys. Acta**, **1495**: 319-326.
- APARICIO, T.; LORENZO, P.; PERERA, J. 2000. pT3.2I, the smallest plasmid of *Thiobacillus* T3.2. **Plasmid**, **44**: 1-11.
- BACELAR-NICOLAU, P. & JOHNSON, D. B. 1999. Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**: 585-590.
- BAYLE, D.; WANGLER, S.; WEITZENEGGER, T.; STEINHILBER, W.; VOLZ, J.; PRZYBYLSKI, M.; SCHAFER, K. P.; SACHS, G.; MELCHERS, K. 1998. Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. **J. Bacteriol.**, **180**: 317-329.
- BEIJERINCK, M. W. 1904. Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlenstoffquelle ernähren können. **Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II**, **11**: 593-599.
- BENDER, C. L. & COOKSEY, D. A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **J. Bacteriol.**, **169**: 470-474.
- BENDER, C. L. & COOKSEY, D. A. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **J. Bacteriol.**, **165**: 534-541.

- BONAVENTURA, C. & JOHNSON, F. M. 1997. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. **Environ. Health Persp.**, **105**: 5-20.
- BOSECKER, K. 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiol. Rev.**, **20**: 591-604.
- BROWN, N. L.; BARRETT, S. R.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T.; ROUCH, D. A. 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. **Mol. Microbiol.**, **17**: 1153-1166.
- BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, **45**:198-207.
- BRYANT, R. D.; MCGROARTY, K. M.; COSTERTON, J. W.; LAISHLEY, E. J. 1983. Isolation and characterization a new acidiphilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). **Can. J. Microbiol.**, **29**: 1159-1170.
- BUTCHER, B. G.; DEANE, S. M.; RAWLINGS, D. E. 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **66**: 1826-1833.
- CALLARD, D.; LESCURE, B.; MAZZOLINI, L. 1994. A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. **Biotechniques**, **16**: 1096-1097.

- CHISHOLM, I. A.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. 1998. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **73**: 245-254.
- CORTON, J. C. & GUSTAFSSON, J. A. 1997. Increased efficiency in screening large numbers of cDNA fragments generated by differential display. **Biotechniques**, **22**: 802-810.
- CURUTCHET, G.; TEDESCO, P.; DONATI, E. 1996. Combined degradation of covellite by *Thiobacillus thiooxidans* and *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnol. Lett.**, **18**: 1471-1476.
- DOMINY, C. N.; DEANE, S. M.; RAWLINGS, D. E. 1997. A geographically widespread plasmid from *Thiobacillus ferrooxidans* has genes for ferredoxin-, FNR-, prismatic- and NADH-oxidoreductase-like proteins which are also located on the chromosome. **Microbiology**, **143**: 3123-3136.
- FLEMING, J. T.; YAO, W. H.; SAYLER, G. S. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 3698-3706.
- GARCIA Jr., O. 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Rev. Microbiol.**, **22**: 1-6.
- GOEBEL, B. M. & STACKEBRANDT, E. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 1614-1621.

- GONG, T. W.; HEGEMAN, A. D.; SHIN, J. J.; ADLER, H. J.; RAPHAEL, Y.; LOMAX, M. I. 1996. Identification of genes expressed after noise exposure in the chick basilar papilla. **Hear Res.**, **96**: 20-32.
- GUILIANI, N.; BENGRINE, A.; BORNE, F.; CHIPPAUX, M.; BONNEFOY, V. 1995. Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* - advancement and projects: sequence and analysis of *rus* gene encoding rusticyanin and *alaS* gene encoding alanyl tRNA synthetase (in) Holmes, D.S., Smith, R.W. and Warrendale, P.A. (Eds.); **Minerals Bioprocessing II**: 95-110; The Minerals, Metals and Materials Society .
- HALLBERG, K. B. & LINDSTRÖM, E. B. 1994 Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. **Microbiology**, **140**: 3451-3456.
- HARAHUC, L.; LIZAMA, H. M.; SUZUKI, I. 2000. Effect of anions on selective solubilization of zinc and copper in bacterial leaching of sulfide ores. **Biotechnol. Bioeng.**, **69**: 196-203.
- 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.
- HIRAISHI, A.; NAGASHIMA, K. V.; MATSUURA, K.; SHIMADA, K.; TAKAICHI, S.; WAKAO, N.; KATAYAMA, Y. 1998. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **48**: 1389-1398.

- HUBERT, W. A.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. 1995. Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Curr. Microbiol.**, **31**: 10-14.
- HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol. Microbiol.**, **5**: 825-834.
- HUTCHINS, S. R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Annu. Rev. Microbiol.**, **40**: 311-336.
- INOUE, C.; SUGAWARA, K.; SHIRATORI, T.; KUSANO, T.; KITAGAWA, Y. 1989. Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase. **Gene**, **84**: 47-54.
- Jl, G. & SILVER, S. 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **J. Ind. Microbiol.**, **14**: 61-75.
- KELLY, D. P. & WOOD, A. P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **50**: 511-516.
- KELLY D. P.; McDONALD, I. R.; WOOD, A. P. 2000. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the alpha-subclass of the Proteobacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, **50 Pt 5**: 1797-802.

- KELLY, D. P.; STACKEBRANDT, E.; BURGHARDT, J.; WOOD, A. P. 1998. Confirmation that *Thiobacillus halophilus* and *Thiobacillus hydrothermalis* are distinct species within the gamma-subclass of the Proteobacteria. **Arch. Microbiol.**, **170**: 138-140.
- KUSANO, T.; TAKESHIMA, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K. 1991. Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **173**: 7313-7323.
- LANE, D. J.; HARRISON Jr., A. P.; STAHL, D.; PACE, B.; GIOVANNONI, S. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron- oxidizing eubacteria. **J. Bacteriol.**, **174**: 269-278.
- LEDUC, L. G. & FERRONI, G. D. 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiol. Rev.**, **14**: 103-120.
- LEE, B. T. O.; BROWN, N. L.; ROGERS, S.; BERGEMANN, A.; CAMAKARIS, J.; ROUCH, D. A. 1990. Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. **NATO ASI Ser. G.**, **23**: 625-632.
- LEE, Y. A.; HENDSON, M.; SCHROTH, M. N. 1992. Cloning and characterization of copper-resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. **Phytopathology**, **82**: 1125.
- LIANG, P & PARDEE, A. B. 1995. Recent advances in differential display. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**: 274-280.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, **257**: 967-971.

- LIANG, P.; BAUER, D.; AVERBOUKH, L.; WARTHOF, P.; ROHRWILD, M.; MULLER, H.; STRAUSS, M.; PARDEE, A. B. 1995. Analysis of altered gene expression by differential display. **Methods Enzymol.**, **254**: 304-321.
- LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. **Nucleic Acids Res.**, **21**: 3269-3275.
- LUNDGREN, D. G. & SILVER, M. 1980. Ore leaching by bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, **34**: 263-283.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; *et al.* 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, **20**: 3479-3483.
- MARTIN, P. A. W.; DUGAN, P. R.; TUOVINEN, O. H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic chemolithotrophic thiobacilli. **Can. J. Microbiol.**, **27**: 850-853.
- MATHIEU-DAUDÉ, F.; WELSH, J.; DAVIS, C.; McCLELLAND, M. 1998. Differentially expressed genes in the *Trypanosoma brucei* life cycle identified by RNA fingerprinting. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **92**: 15-28.
- MCDONALD, I. R.; KELLY, D. P.; MURRELL, J. C.; WOOD, A. P. 1997. Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis*, and other species of *Thiobacillus*, as determined using 16S rDNA sequencing. **Arch. Microbiol.**, **17**: 394-398.

- MOU, L.; MILLER, H.; LI, J.; WANG, E.; CHALIFOUR, L. 1994. Improvements to the differential display method for gene analysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **199**: 564-569.
- NAGAOKA, T.; OHMURA, N.; SAIKI, H. 1999. A novel mineral flotation process using *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**: 3588-3593.
- NATARAJAN, K. A.; SUDEESHA, K.; RAO, R. 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, **66**: 303-306.
- NOVO, M. T.; DA SILVA, A. C.; MORETO, R.; CABRAL, P. C.; COSTACURTA, A.; GARCIA Jr, O.; OTTOBONI, L. M. 2000. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **77**: 187-195.
- NOVO, M. T. M.; SOUZA, A. P.; GARCIA Jr., O.; OTTOBONI, L. M. M. 1996. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. **Syst. Appl. Microbiol.**, **19**: 91-95.
- PERUCHO, M.; WELSH, J.; PEINADO, M. A.; IONOV, Y.; McCLELLAND, M. 1995. Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: applications in cancer research. **Methods Enzymol.**, **254**: 275-290.
- PIZARRO, J.; JEDLICKI, E.; ORELLANA, O.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 1323-1328.

- PRAMILA, T.; G. P.; RAMANANDA RAO, G.; NATARAJAN, K. A.; DURGA RAO, C. 1996. Differential influence of ions on the copy number of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Curr. Microbiol.**, **32**: 57-63.
- RAWLINGS, D. E. & KUSANO, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Microbiol. Rev.**, **58**: 39-55.
- RAWLINGS, D. E.; DORRINGTON, R. A.; ROHRER, J.; CLENNEL, A.M. 1993. A molecular analysis of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiol. Rev.**, **11**: 3-8.
- RENSING, C.; FAN, B.; SHARMA, R.; MITRA, B.; ROSEN, B. P. 2000. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 652-656.
- SCHIPPERS, A. & SAND, W. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**: 319-321.
- SELENSKA-POBELL, S.; OTTO, A.; KUTSCHKE, S. 1998. Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and rep-APD. **J. Appl. Microbiol.**, **84**: 1085-1091.
- SHEPARD, B. D. & 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. & SONTA, H. 1993. Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. **FEMS Microbiol. Rev.**, **11**: 165-174.

- SHIRATORI, T.; INOUE, C.; NUMATA, M.; KUSANO, T. 1991. Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Curr. Microbiol.**, **23**: 321-326.
- SHIRATORI, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K.; KUSANO, T.; KITAGAWA, Y. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **171**: 3458-3464.
- SILVER, S. 1998. Genes for all metals - a bacterial view of the Periodic Table. The 1996 Thom award lecture. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **20**: 1-12.
- SILVER, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. **Gene**, **179**: 9-19.
- SILVER, S. & PHUNG, L. T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu. Rev. Microbiol.**, **50**: 753-789.
- TEMPLE, K. L. & COLMER, A. R. 1951. An autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **62**: 605-611.
- THÉLU, J.; BURNOD, J.; BRACCHI, V.; AMBROISE-THOMAS, P. 1994. Identification of differentially transcribed RNA and DNA helicase-related genes of *Plasmodium falciparum*. **DNA Cell Biol.**, **13**: 1109-1115.
- THIES, F. L.; HARTUNG, H. P.; GIEGERICH, G. 1998. Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* lon gene detected by RNA arbitrarily primed PCR. **FEMS Microbiol. Lett.**, **165**: 329-334.

- VISCA, P.; VALENTI, P.; ORSI, N. 1986. Characterization of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans* strains, p. 429-441 In R. W. Laurence; M. R. Branun; H. G. Elner (Ed.), **Fundamental and applied biohydrometalurgy**. Elsevier, Amsterdam.
- WAKSMAN, S. A. & JOFFE, J. S., 1922. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. **J. Bacteriol.**, **7**: 239-256.
- WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **37**: 463-464.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R.; RALPH, D.; McCLELLAND, M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic. Acids Res.**, **20**: 4965- 4970.
- 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.; MINTON, K. W.; FLEISCHMANN, R. D.; KETCHUM, K. A.; NELSON, K. E.; SALZBERG, S.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M. 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. **Science**, **286**: 1571-1577.

WONG, K. K. & McCLELLAND, M. 1994. Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**: 639-643.