

BC/19651
IB/81356



UNICAMP

T/UNICAMP

N859_C

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**CLONAGEM MOLECULAR DO
DETERMINANTE GENÉTICO DE
RESISTÊNCIA AO MANGANÊS
DO *Thiobacillus ferrooxidans*
EM *Escherichia coli***

MARIA TERESA MARQUES NOVO

ORIENTADOR: PROF. DR. OSWALDO GARCIA JÚNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Concentração Genética de
Microrganismos.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <u>MARIA TERESA MARQUES</u> <u>NOVO</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

campinas, 21 de Junho de 1993

UNIDADE	IB	684
N.º CHAMADA	N	859c
V.		
TE		19651
		261/93
		X
FLUO		us 100.000,00
DATA		28/07/93
N.º CFB		cm 00048061-2

BIB:000065539

**CLONAGEM MOLECULAR DO DETERMINANTE GENÉTICO DE
RESISTÊNCIA AO MANGANÊS DO *Thiobacillus ferrooxidans*
EM *Escherichia coli***

Trabalho realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – UNICAMP, sob orientação do Dr. Adilson Leite e do Prof. Dr. Paulo Arruda e no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara – UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior.

Dedico e ofereço esta tese,
com profunda gratidão,
aos meus queridos pais, José e Norma,
primeiros e incansáveis colaboradores desde sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda graça, sabedoria e força, pela presença em todos os momentos e, principalmente, naqueles de maior desânimo.

Ao Prof. Dr. Adilson Leite, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)-UNICAMP, que com sua competência, dedicação e solicitude foi da maior importância para a realização deste trabalho, minha mais profunda gratidão.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior, do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, importante Mestre, incentivador, amigo e exemplar orientador desde o início da minha jornada profissional, meu mais profundo reconhecimento e gratidão.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, meus mais sinceros agradecimentos pela orientação e incentivo e pela oportunidade de valor inestimável de desenvolver grande parte deste trabalho no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)-UNICAMP.

A todo o pessoal do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, pela valiosa e alegre convivência de tantos anos e ao Dr. William Greenhalf pelas discussões sobre o trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Plantas do CBMEG-UNICAMP, pela amizade e agradável convívio.

Aos companheiros do Laboratório de Plantas (CBMEG), Sílvia, Fernando, Laura, Berenice, Andrés e André, que em momentos da realização deste trabalho colaboraram com bastante solicitude e presteza.

Ao Márcio e ao Fernando, pela valiosa ajuda na confecção das fotos de eletroforese.

Ao Maurício, pela importante cooperação no preparo da vidraria.

À funcionária Ivone S. Anno e à Profa. Dra. Clarice Queico F. Leite, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, pela realização dos testes bioquímicos de identificação da *E. coli*.

À Profa. Dra. Cecília Lalue do Instituto de Química de Araraquara-UNESP pela

atenção, apoio e incentivo em vários momentos.

Ao Prof. Dermeval C. Lima do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, pela atenção e apoio.

Aos meus pais e irmãos, Júnior, João, Maria Alice, Maria Cecília e Maria Clara, pela valiosa presença e apoio.

A Benedito e Alice Mansur, pelo apoio e incentivo.

À CAPES, ao RHAE/CNPq e ao CBAB pelo auxílio através de bolsas de estudo e projetos.

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para o bom êxito deste trabalho.

Ao querido Paulo Mansur,
que com sua compreensão, apoio e incentivo constantes,
foi importante presença,
principalmente nos momentos mais difíceis
da realização deste trabalho,
meu carinho e especial agradecimento.

RESUMO

O trabalho realizado teve como objetivo o isolamento do determinante genético que confere resistência a altas concentrações de manganês no *Thiobacillus ferrooxidans*. A metodologia utilizada consistiu basicamente na transformação da *Escherichia coli*, espécie altamente sensível ao metal (comparativamente ao *T. ferrooxidans*), com biblioteca de DNA total do *T. ferrooxidans* em pUC 19 e seleção de clone(s) transformante(s) que apresentasse(m) um nível de resistência ao manganês maior que o da *E. coli* não recombinante.

Numa etapa inicial do trabalho foram realizados testes de crescimento em meio sólido da *E. coli*-DH5 α e do *T. ferrooxidans*-LR na presença de concentrações crescentes de manganês, comprovando-se a acentuada diferença dos níveis de resistência ao metal apresentados por essas duas espécies bacterianas: o crescimento da *E. coli*-DH5 α foi totalmente inibido por 15mM de manganês enquanto que nenhum efeito inibitório do crescimento do *T. ferrooxidans*-LR foi observado na presença de 100mM do metal.

A construção dos bancos de DNA total do *T. ferrooxidans*-LR foi efetuada por digestão parcial com *Sau*3AI (fragmentos de 500 a 2000pb e de 1000 a 5000pb) e por digestão total com *Pst*I. Três bibliotecas foram construídas pela ligação desses fragmentos obtidos com *Sau*3AI e *Pst*I no vetor pUC 19, clivado com *Bam*HI e *Pst*I, respectivamente. Após transformação da *E. coli*-DH5 α com os plasmídios resultantes das ligações e seleção dos transformantes em meio contendo ampicilina e X-Gal, cerca de 6000 clones recombinantes (colônias brancas) foram transferidos para meio contendo 20mM de manganês (meio seletivo que inibe totalmente o crescimento da *E. coli*-DH5 α transformada com pUC 19). Dois clones, R3-37 e R1-76, apresentaram crescimento nesse meio, sendo que o clone R3-37 ainda apresentou crescimento em 25mM de manganês. Um clone retransformante (RpR3-37), obtido pela transformação da *E. coli*-DH5 α com o plasmídio recombinante do clone R3-37 (pR3-37), apresentou nível de resistência ao manganês comparável ao apresentado pelo clone R3-37.

Finalmente, um inserto de cerca de 2kb foi detectado no plasmídio pR3-37 (através de digestão com *Pst*I) e a sua localização no DNA cromossomal do *T. ferrooxidans*-LR foi

constatada através da hibridização desse inserto, marcado com digoxigenina, com o DNA não digerido de alto peso molecular do *T. ferrooxidans*-LR.

Estudos posteriores de seqüenciamento e caracterização desse inserto clonado deverão ser realizados para a identificação de provável(is) promotor(es) e proteína(s) codificada(s) por esse fragmento, responsável(is) pelo maior nível de resistência ao manganês apresentado pelo clone R3-37.

ABSTRACT

The purpose of this work was to isolate the genetic determinant which confers resistance to high manganese concentrations in *Thiobacillus ferrooxidans*. The basic methodology utilized was the transformation of *E. coli* (a species much more sensitive to manganese than *T. ferrooxidans*) with libraries of *T. ferrooxidans* total DNA, established in pUC 19, and selection of transformant(s) clone(s) more resistant to manganese than the original *E. coli* (only transformed with pUC 19).

Initially, growth experiments were performed with *E. coli*-DH5 α and *T. ferrooxidans*-LR in solid medium containing increasing manganese concentration to confirm the large difference between the manganese resistance levels of these two bacterial species: the *E. coli* growth was totally inhibited by 15mM manganese whereas no inhibition of the *T. ferrooxidans* growth was observed even with 100mM manganese.

After this first step, fragments were obtained by either partial *Sau*3AI digestion (500 to 2000pb and 1000 to 5000pb fragments size) or total *Pst*I digestion of *T. ferrooxidans*-LR total DNA. Three libraries were constructed by ligation of these *Sau*3AI and *Pst*I fragments in *Bam*HI or *Pst*I cleaved pUC 19 vector, respectively. Ligated DNA was used to transform competent *E. coli*-DH5 α cells and transformants were selected on medium containing ampicillin and X-Gal. About 6000 recombinant clones (white colonies) were transferred to medium containing 20mM manganese (manganese concentration that totally prevents pUC 19 transformed *E. coli* growth). Two clones, R3-37 and R1-76, presented growth in this medium and R3-37 was also able to grow in the presence of 25mM manganese. A retransformant clone (RpR3-37), obtained by *E. coli*-DH5 α transformation with the recombinant plasmid of the R3-37 clone (pR3-37), presented manganese resistance level similar to R3-37 clones.

Finally, a *Pst*I digestion indicated that an approximately 2-kilobase (kb) DNA fragment was inserted into pR3-37. The chromosomal origin of this *T. ferrooxidans*-LR fragment was determined by *Southern blotting* and DNA hybridization with the digoxigenin-labeled insert.

Further sequencing and characterization studies of the *T. ferrooxidans*-LR insert will be performed in order to identify putative promoters and eventual protein(s) codified by this fragment, responsible by the greater level of R3-37 clone's manganese resistance.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
OBJETIVOS	12
MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
1. Linhagens bacterianas	13
1.1. <i>T. ferrooxidans</i>	13
1.2. <i>E. coli</i>	13
2. Meios de Cultura	14
2.1. Meio T&K (<i>T. ferrooxidans</i> -LR).....	14
2.2. Meio LB (<i>E. coli</i> -DH5 α).....	14
3. Efeito do Manganês no Crescimento do <i>T. ferrooxidans</i> -LR	15
4. Efeito do Manganês no Crescimento da <i>E. coli</i> -DH5 α	16
5. Extração de DNA Total do <i>T. ferrooxidans</i> -LR	17
5.1. Preparo da Suspensão de Células Lavadas	17
5.2. Obtenção do DNA Total.....	17
6. Obtenção de Fragmentos do DNA do <i>T. ferrooxidans</i> -LR.....	19
6.1. Avaliação Inicial do Padrão de Restrição	19
6.2. Digestão Total com <i>Pst</i> I	19
6.3. Digestão parcial com <i>Sau</i> 3AI.....	19
6.3.1. Cinética Enzimática.....	20
6.3.2. Digestão com concentração definida de <i>Sau</i> 3AI	20
6.3.3. Isolamento dos fragmentos obtidos	21
6.4. Estimativa das concentrações de DNA dos fragmentos obtidos	22
7. Vetor de Clonagem.....	23
8. Ligação inserto/vetor	25
9. Transformação da <i>E. coli</i> -DH5 α e seleção de clones resistentes ao manganês	26
9.1. Soluções e meios utilizados	26
9.2. Metodologia da transformação	27
9.3. Seleção de recombinantes	28
9.4. Seleção de recombinantes resistentes a manganês.....	28
10. Testes de resistência ao manganês dos clones selecionados.....	29
10.1. Testes em meio sólido.....	29
10.2. Testes em meio líquido	29
11. Detecção do inserto no plasmídio do clone selecionado.....	30
11.1. Mini-preparação do plasmídio	30
11.2. Digestão enzimática e eletroforese	30

12. Retransformação da <i>E. coli</i> -DH5 α com o plasmídeo recombinante	31
12.1. Retransformação e seleção	31
12.2. Teste de resistência ao manganês	31
13. Localização do inserto no DNA total do <i>T. ferrooxidans</i> -LR por <i>Southern</i> <i>Blotting</i> e hibridização não radioativa	32
13.1. Soluções e tampões utilizados	32
13.2. Marcação do fragmento (sonda)	32
13.3. Digestão enzimática e eletroforese do DNA total	33
13.4. Transferência Alcalina	33
13.5. Hibridização e lavagens	34
13.6. Detecção da sonda com AMPPD	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
1. Efeito do manganês no crescimento do <i>T. ferrooxidans</i> -LR	37
2. Efeito do manganês no crescimento da <i>E. coli</i> -DH5 α	40
3. Obtenção de fragmentos do DNA total do <i>T. ferrooxidans</i> -LR	43
4. Ligação inserto/vetor	46
5. Transformação da <i>E. coli</i> -DH5 α e seleção de clones resistentes ao manganês	49
6. Testes de resistência ao manganês dos clones selecionados	50
7. Detecção do inserto no plasmídeo do clone selecionado	57
8. Retransformação da <i>E. coli</i> -DH5 α com o plasmídeo recombinante	60
9. Localização do inserto no DNA total do <i>T. ferrooxidans</i> -LR	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

INTRODUÇÃO

Thiobacillus ferrooxidans é uma bactéria quimiolitotrófica, isto é, obtém a energia necessária para o seu crescimento pela oxidação de substratos estritamente inorgânicos e é capaz de fixar o CO₂ atmosférico. Basicamente, a bactéria necessita de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (Beck & Shafia, 1964; Howard & Lundgren, 1970; Tuovinen & Kelly, 1972; Tuovinen *et al.*, 1979) e um substrato oxidável, que pode ser o íon Fe²⁺, enxofre elementar, tiosulfato ou ainda um sulfeto metálico (como por exemplo a pirita, FeS₂, principal substrato mineral utilizado pela bactéria). Os elétrons liberados na oxidação desses compostos reduzem o oxigênio molecular da cadeia respiratória, ocorrendo formação de ATP, fonte de energia para a célula; os principais componentes que transferem os elétrons dos substratos oxidados, na cadeia respiratória dessa bactéria estão praticamente elucidados, conforme um sumário apresentado por Ingledew (1986). O sistema ferro-oxidase é um complexo-enzimático situado na membrana da célula (Peck, 1968; Ingledew & Copley, 1980; Sugio *et al.*, 1981), sendo composto por três tipos de citocromos e pela rusticianina, proteína situada no periplasma, a qual é o aceptor inicial dos elétrons do substrato oxidável, no caso, o íon ferroso (Copley & Haddock, 1975; Cox & Boxer, 1978).

T. ferrooxidans, bem como todas as outras espécies classificadas como *Thiobacillus*, não são patogênicas, possuem tamanho médio 0,5 x 1,0 - 1,5µm e se apresentam na forma de bastonetes. A faixa de temperatura de seu crescimento situa-se entre 5 e 40°C, sendo 30°C a temperatura ótima (Landesmann *et al.*, 1966). A espécie é aeróbia estrita e acidofílica, pois seu pH ótimo de crescimento é aproximadamente 2,0, ocorrendo entretanto, crescimento numa faixa de 1,2 a 4,0 (Golomzik & Ivanov, 1965; Tuovinen & Kelly, 1972; Pivovarova & Golovacheva, 1985). *T. ferrooxidans* é a única espécie do gênero capaz de catalisar a oxidação do íon ferroso, aumentando de 10⁵ a 10⁶ a velocidade da reação.

Nos últimos anos, os estudos fisiológicos e bioquímicos referentes a essa espécie têm se intensificado pelo fato do *T. ferrooxidans* ser o principal microrganismo responsável pela lixiviação bacteriana de metais, ou biolixiviação, processo no qual o metabolismo microbiano

causa a solubilização de metais de minérios. A ação bacteriana ocorre naturalmente em minérios apropriados, isto é, aqueles que apresentam em sua constituição mineralógica formas reduzidas de enxofre e ferro. Fundamentalmente, a base do processo de lixiviação bacteriana consiste na produção de soluções ácidas de sulfato férrico, eficiente agente lixivante de metais, como resultado do metabolismo oxidativo do *T. ferrooxidans* em substratos minerais sulfetados. Atualmente, a biolixiviação é aplicada em escala industrial para recuperação de cobre e urânio em vários países. Metais preciosos também podem ser obtidos utilizando-se esse processo, como é o caso do ouro, sendo que unidades-piloto já em operação são encontradas na África do Sul, EUA, etc. Essa metodologia de extração, de aplicação economicamente viável a minérios de baixos teores, vem substituindo métodos convencionais (por exemplo, pirometalurgia) devido ao esgotamento progressivo de reservas minerais contendo altos teores dos metais de interesse econômico.

Uma característica fisiológica marcante e altamente interessante do *T. ferrooxidans* é a sua generalizada resistência a altas concentrações de íons metálicos. Isto pode ser atribuído à presença constante de metais no próprio ambiente natural da bactéria, fator que provavelmente determinou a seleção de tipos mais resistentes ao longo da evolução. Embora os mecanismos que determinam essa resistência não sejam muito conhecidos, sabe-se que o *T. ferrooxidans* apresenta resistência elevada ao alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio, segundo revisões de Brierley (1978), Lundgren & Silver (1980) e Hutchins *et al.* (1986). Quanto ao nível de resistência, o *T. ferrooxidans* é duas a três vezes mais resistente aos efeitos inibitórios dos metais pesados que a maioria das bactérias heterotróficas (Sadler & Trudinger, 1967; Weinberg, 1977).

A capacidade de crescimento da espécie em condições ambientais hostis à maioria das bactérias heterotróficas (alta acidez e concentrações elevadas de metais) a tornam um interessante microrganismo para estudos dos determinantes genéticos dessas características. Assim, o *T. ferrooxidans* pode ser potencialmente útil para o isolamento de genes que conferem resistência a metais, ou seja, ser utilizado como fonte de obtenção desses genes, os quais poderiam ser transferidos para outros organismos sensíveis ou menos resistentes. Esta possibilidade é altamente

interessante do ponto de vista de melhoramento daqueles processos biotecnológicos nos quais a presença de metais é fator limitante do desenvolvimento do organismo. Finalmente, a possibilidade de obtenção de plantas que apresentem maior resistência a metais presentes no solo (tais como alumínio e manganês), é um exemplo evidente da importância econômica dessa possível utilização do *T. ferrooxidans* como um microrganismo doador de genes de resistência a metais.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os estudos genéticos relativos à espécie *T. ferrooxidans*, bastante restritos até recentemente, estão atualmente em crescente expansão. Durante vários anos, poucos trabalhos foram realizados objetivando-se um melhoramento do processo de lixiviação bacteriana pela manipulação genética do microrganismo. Isso se deve ao fato que o sistema de lixiviação bacteriana de minérios em pilhas se processa de uma forma quase rudimentar e está sujeito inclusive às modificações próprias de um sistema aberto, sendo que o próprio ambiente atua como potente agente selecionador de espécies e linhagens mais eficientes para o processo (Tuovinen & Kelly, 1972). Entretanto, um nível tecnológico mais avançado do processo será requerido num futuro próximo (Chakrabarty, 1978; Cripps, 1980), devido ao fato que o aproveitamento de concentrados sulfetados (e não mais minérios de baixo teor) ou de materiais contendo metais valiosos (ouro, por exemplo), deverá ser feito em bioreatores. Tais sistemas, rigorosamente controlados, exigirão a utilização de linhagens bacterianas melhoradas geneticamente, que apresentem, por exemplo, taxas mais elevadas de oxidação dos substratos, maior resistência a metais tóxicos, maior capacidade de fixação de CO₂, etc.

Em função dessa potencialidade tecnológica e também do interesse no conhecimento do sistema genético dessa espécie peculiar, sobretudo no que se refere a sua alta resistência a metais, os estudos sobre a genética molecular do *T. ferrooxidans* tiveram um impulso considerável nos últimos anos.

Os estudos genéticos com o *T. ferrooxidans* tiveram início no final da década de 70, com trabalhos de genética clássica realizados por Groudeva e colaboradores. Tais trabalhos demonstraram a existência de variabilidade genética natural na espécie através de curvas de sobrevivência a agentes mutagênicos (Groudeva *et al.*, 1978a); mutagênicos químicos e luz ultravioleta foram utilizados para indução de mutantes, (Groudeva *et al.*, 1978 b, c; Groudeva *et al.*, 1980), tendo sido obtida uma variabilidade de 20 a 180% em relação à atividade oxidativa da linhagem selvagem, comprovando a potencialidade da espécie para o melhoramento genético.

Trabalhos adicionais detectaram diversidade genômica e fisiológica entre linhagens de

diversas partes do mundo (Harrison Jr., 1982), variabilidade quanto às atividades de lixiviação de ZnS e CuS (Groudev, 1980 a,b), variabilidade quanto à resistência ao urânio e tório e a parâmetros cinéticos (Dispirito & Tuovinen 1982), sendo que, mais recentemente, foi detectada variabilidade quanto à resistência a metais como cobalto, cobre, prata e mercúrio, em quatro linhagens brasileiras (Garcia Jr. & Silva, 1991).

A genética molecular do *T. ferrooxidans* teve início com a descrição da metodologia para isolamento do DNA plasmidial por Mao *et al.* (1980). Martin *et al.* (1981) determinaram o padrão plasmidial de 15 linhagens de *T. ferrooxidans*, não sendo detectado plasmídio em apenas 4 linhagens; uma das linhagens apresentou 5 plasmídios diferentes. Recentemente, Shiratori *et al.* (1991) determinaram que em mais de 100 linhagens independentes do *T. ferrooxidans*, cerca de 73% possuíam mais de um plasmídio (de tamanhos entre 2 e 30kb), sendo que dois plasmídios, oriundos de diferentes linhagens, apresentaram alta homologia. Valenti *et al.* (1990) relataram a presença de um mesmo plasmídio em linhagens isoladas de diferentes ambientes, geograficamente muito distantes; esses isolados foram subcultivados na ausência de pressão seletiva durante anos, indicando que o plasmídio se mantém estável por muitas gerações. Apesar da quase totalidade das linhagens selvagens examinadas do *T. ferrooxidans* possuírem plasmídios, a sua presença ainda não foi correlacionada com resistência a metais ou antibióticos ou a outra característica qualquer.

Apesar dos plasmídios isolados do *T. ferrooxidans* serem considerados crípticos, podem ser utilizados na construção de vetores de clonagem para desenvolvimento de um sistema genético para a espécie. Assim, na tentativa de caracterização de plasmídios do *T. ferrooxidans* e de obtenção de um vetor de clonagem que pudesse se replicar tanto em *T. ferrooxidans* como em *E. coli*, Holmes *et al.* (1984) e Dolan & Tuovinen (1985) clonaram plasmídios do *T. ferrooxidans* no pBR322 e no pUC 8 e determinaram os mapas de restrição dos plasmídios recombinantes.

Marcadores genéticos selecionáveis (resistência a metais e a antibióticos), também importantes para o estabelecimento de um sistema genético para o *T. ferrooxidans*, foram apresentados por Rawlings *et al.* (1983) : embora alguns antibióticos percam sua atividade no meio devido ao baixo pH (por exemplo, cloranfenicol), outros antibióticos (rifampicina,

ampicilina, etc) mostraram-se estáveis nesse meio ácido.

Mecanismos de recombinação genética para o *T. ferrooxidans* também têm sido estudados. A transferência direta por conjugação de plasmídios mobilizáveis para essa espécie autotrófica acidofílica a partir de bactérias heterotróficas, não é possível devido à incompatibilidade, sobretudo de pH, das condições do meio necessário para realizar a conjugação. Uma solução para o problema é a transferência dos plasmídios inicialmente para outras espécies do gênero (não-ferrooxidantes), capazes de crescer em pH ácido ou neutro, na presença ou ausência de matéria orgânica. Após essa transferência, pode ocorrer conjugação entre esses *Thiobacilli* e o *T. ferrooxidans*, em meio ácido inorgânico.

A transferência de vários plasmídios *broad-host-range* por conjugação da *E. coli* com vários *Thiobacilli* não ferrooxidantes foi investigada por Davidson & Summers (1983). Embora certos plasmídios tenham sido transferidos da *E. coli* para o não acidofílico *Thiobacillus novellus* e deste para outros *Thiobacilli*, não se tem conhecimento de experimentos com a espécie mais importante sob o ponto de vista biotecnológico, o *T. ferrooxidans*. Em experimentos similares, Kulpa *et al.* (1983) transferiram o plasmídio RP1 da *E. coli* para *Thiobacillus neapolitanus*, que pode crescer numa faixa de pH de 3,5 a 7,0, tendo sido a transferência efetuada também no sentido inverso, ilustrando que as funções de transferência do plasmídio são expressas em *T. neapolitanus*.

Até há pouco tempo, plasmídios mobilizáveis se relacionavam apenas com bactérias heterotróficas. A descoberta de plasmídios mobilizáveis do *T. ferrooxidans* consiste num importante mecanismo alternativo para manipulação do material genético dessa espécie. O plasmídio não-conjugativo pTf-FC2, isolado do *T. ferrooxidans* (Rawlings *et al.*, 1984a) foi mobilizado em alta frequência entre linhagens de *E. coli* pelo plasmídio RP4 do grupo de incompatibilidade P (Rawlings *et al.*, 1986a; Rawlings & Woods, 1985). Além disso, o plasmídio pTf-FC2 é capaz de se replicar em uma série de bactérias gram-negativas, tais como *E. coli*, *P. aeruginosa* (Rawlings *et al.*, 1986b) e *Agrobacterium tumefaciens*, sendo que a região requerida para replicação foi caracterizada por Dorrington & Rawlings (1989, 1990, 1991). Esses fatores tornam o pTf-FC2 potencialmente interessante para a construção de vetores

mobilizáveis *broad-host-range* que sejam compatíveis com vetores *broad-host-range* conhecidos. Rohrer & Rawlings (1992) seqüenciaram e caracterizaram a região de mobilização do pTf-FC2, identificando cinco ORFs, cujos polipeptídeos correspondentes apresentaram muita similaridade com aqueles codificados pelos plasmídios do grupo de incompatibilidade P.

Uma das poucas descrições da transformação de uma espécie de *Thiobacillus* se refere ao *Thiobacillus thioeparus* (Yankofsky *et al.*, 1983): a transformação de *T. thioeparus* auxotrófico para prototrófico foi realizada pela exposição de células em crescimento exponencial ao DNA cromossômico de espécies independentes nutricionalmente. Recentemente, Kusano *et al.* (1992) realizaram a transformação de linhagens de *T. ferrooxidans* sensíveis ao mercúrio através de eletroporação com plasmídios recombinantes, construídos pela clonagem do operon que confere resistência ao mercúrio (marcador genético) em um plasmídio críptico do *T. ferrooxidans*. Uma das linhagens transformadas (de 30 linhagens independentes testadas) apresentou uma eficiência de transformação de 120 a 200 colônias resistentes ao mercúrio por µg de DNA plasmidial. Os transformantes retiveram os plasmídios sem rearranjos durante 25 repiques na ausência de pressão seletiva. Até recentemente, a introdução de DNA exógeno em células de *T. ferrooxidans* não tinha sido realizada com sucesso, sendo que os resultados obtidos através de eletroporação serão de grande importância para o estabelecimento de um sistema de transferência genética para a espécie, o qual servirá de impulso tanto para obtenção de espécies melhoradas como para o entendimento da função e regulação gênica nesse organismo autotrófico.

Vários trabalhos foram e estão sendo realizados no sentido de se compreender a expressão gênica na bactéria autotrófica, através da identificação de genes que possam ser expressos na *E. coli*. Assim, Rawlings *et al.*, (1984a) demonstraram a expressão da origem de replicação do plasmídio pTf-FC2 do *T. ferrooxidans* em *E. coli*, através da clonagem desse plasmídio no pBR 325, cuja origem de replicação tinha sido deletada. Rawlings *et al.* (1984b) também demonstraram a síntese de proteínas codificadas por DNA plasmidial do *T. ferrooxidans* em um sistema livre-de-células da *E. coli*. Esses trabalhos, dentre outros, sugerem que alguns sinais regulatórios de um plasmídio autotrófico são reconhecidos por um sistema de transcrição e tradução heterotrófico.

Nos últimos anos, têm sido isolados vários genes cromossomais de *T. ferrooxidans* e sua expressão no organismo heterotrófico tem sido demonstrada. Assim, **Barros *et al.* (1985)** clonaram o gene da glutamina sintetase (*glnA*), enzima-chave no processo de fixação de nitrogênio; de fato, trabalhos anteriores já tinham demonstrado que *T. ferrooxidans* é capaz de fixar nitrogênio (**Mackintosh, 1978**). A clonagem do gene da glutamina sintetase (*glnA*) foi realizada através da transformação de uma linhagem mutante *glnA* de *E. coli* com uma biblioteca de DNA de *T. ferrooxidans*, construída no plasmídio pEco R251: um transformante *glnA*⁺ de *E. coli*, contendo um inserto de DNA de *T. ferrooxidans* de 6 kilobases foi isolado em meio contendo (NH₄)₂SO₄ como única fonte de nitrogênio. Os autores demonstraram ainda a presença, nesse fragmento clonado, de genes regulatórios da transcrição da glutamina-sintetase, os quais também estão envolvidos na regulação de outros operons relacionados com o metabolismo do nitrogênio – esses genes regulatórios foram também funcionais em mutantes de *E. coli* deficientes quanto à regulação de processos relacionados a esse aspecto. Finalmente, esses genes regulatórios de *T. ferrooxidans* possibilitaram também a ativação em *E. coli* do operon relacionado à utilização de histidina de *Klebsiella aerogenes*.

Outros trabalhos de isolamento, expressão e seqüenciamento de genes do *T. ferrooxidans* têm sido realizados para compreensão da estrutura gênica, dos códons normalmente utilizados e das seqüências regulatórias dessa bactéria. Assim, **Kusano *et al.* (1991a)** isolaram o gene cromossomal da ribulose-bifosfato-carboxilase, enzima-chave no processo de fixação do CO₂, através de hibridização com sonda heteróloga; a expressão desse gene, sob o controle do promotor *tac*, foi demonstrada em *E. coli*, por esses mesmos autores. **Kusano *et al.* (1991b)** demonstraram ainda a existência de um segundo *set* desse gene em *T. ferrooxidans*, de seqüência de nucleotídios idêntica ao primeiro. Ao contrário da bactéria quimioautotrófica *Alcaligenes eutrophus*, na qual um *set* do gene está localizado no cromossomo e o outro em um plasmídio, em *T. ferrooxidans* ambos os *sets* estão localizados no cromossomo. **Ramesar *et al.* (1988)** clonaram o gene que codifica a proteína *RecA* do *T. ferrooxidans*, sendo que esta complementou parcialmente as funções de reparo do DNA e de recombinação homóloga em linhagens mutantes *recA* de *E. coli*.

A identificação de promotores do *T. ferrooxidans* que sejam semelhantes ao de *E. coli* e, portanto, possivelmente funcionais nesse organismo (e vice-versa) é de grande importância para o estudo da expressão gênica. Através do seqüenciamento de nucleotídios do gene da glutamina sintetase do *T. ferrooxidans*, Rawlings *et al.* (1987) identificaram na região *upstream* do gene estrutural um provável promotor, similar a um dos promotores (*glnAp1*) da *E. coli*, além de seqüências altamente homólogas às seqüências consenso do sítio de ligação de proteínas regulatórias, como por exemplo, a proteína CAP. Pretorius *et al.* (1987) identificaram também prováveis promotores do gene da nitrogenase do *T. ferrooxidans* possuindo alta homologia com o promotor do gene que codifica essa enzima em *Klebsiella pneumoniae*. Takamiya *et al.* (1990) localizaram seqüências consenso de promotores bacterianos na região regulatória do gene que codifica RNA ribossômico em *T. ferrooxidans*.

Esses trabalhos de isolamento e caracterização de genes cromossomais ou plasmidiais do *T. ferrooxidans* evidenciaram que em geral, as seqüências de nucleotídios de genes estruturais do *T. ferrooxidans* apresentam alta homologia com seqüências de outras bactérias, sendo que o grau de similaridade varia para diferentes espécies. Pode-se concluir ainda que a regulação da expressão gênica no organismo acidofílico autotrófico é bastante similar ao de organismos heterotróficos. Essas evidências de “elos genéticos” entre *T. ferrooxidans* e outras bactérias, nos permite considerar a possibilidade de ter ocorrido transferência gênica entre essas espécies, numa etapa evolutiva anterior à adaptação do *T. ferrooxidans* ao seu habitat, altamente desfavorável às demais bactérias.

Todos esses trabalhos abordam aspectos importantes da genética molecular do *T. ferrooxidans*, sendo tais estudos fundamentais para futuros trabalhos de melhoramento genético da espécie e também para a sua utilização como fonte de genes para outras espécies. Altamente interessante sob o ponto de vista biotecnológico é a utilização do *T. ferrooxidans* como doador de genes de resistência a metais para espécies menos resistentes. Como já referido anteriormente, devido à presença constante de metais no seu próprio habitat, o *T. ferrooxidans* é caracterizado pela resistência generalizada a altas concentrações de metais, tóxicas à maioria das demais bactérias.

De acordo com as revisões de Brierley (1978), Lundgren & Silver (1980) e Hutchins *et al.* (1986), *T. ferrooxidans* apresenta resistência ao alumínio (0,37M), zinco (0,15M), cobalto (0,17M), cobre (0,16M), cromo (0,1M) e urânio (0,01M). Os níveis de resistência são menores para prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M), molibdênio (10^{-3} M), selênio, telúrio e arsênio (10^{-3} M). Em comparação com a maioria das bactérias heterotróficas, *T. ferrooxidans* é duas a três vezes mais resistente aos efeitos inibitórios dos metais pesados (Sadler & Trudinger, 1967; Weinberg, 1977).

Embora o *T. ferrooxidans* seja comprovadamente resistente a altas concentrações de íons metálicos tóxicos, não são conhecidos ainda os mecanismos genéticos que conferem essa resistência e nem mesmo, foram isolados genes relacionados com essa característica. A única exceção a esse fato é o isolamento dos genes que conferem resistência ao mercúrio em *T. ferrooxidans* (Shiratori *et al.*, 1989), através da hibridização com sonda radioativa contendo o fragmento determinante da resistência ao mercúrio do transposon Tn501. Esses mesmos autores clonaram e expressaram os genes em *E. coli* e demonstraram a sua localização cromossomal no *T. ferrooxidans*. Esse fragmento que conferiu resistência ao mercúrio, é composto de pelo menos 2 genes, um gene tipo-*merC* (que codifica proteína capaz de captar Hg^+ através da membrana) e o gene *merA* (que codifica a mercúrio-redutase, proteína responsável pela volatilização do mercúrio como Hg^0), cuja sequência nucleotídica foi determinada por Inoue *et al.* (1989). Segundo Inoue *et al.* (1990), a região *upstream* a *merA* contém os *Open Reading Frame* (ORFs) do não identificado *reading frame 1* (URF1), além do ORF do *merC*, os quais apresentaram 73% de homologia com o URF1 do Tn501 e 61% com o *merC* do R100, respectivamente. Esses autores demonstraram ainda que a co-transcrição de *merA* e *merC* está sob controle de um possível promotor (sequência de 70 a 100pb *upstream* do códon de início de *merC*), de sequência altamente homóloga ao promotor de *merT* de outros sistemas *mer* Gram⁻, embora não se tenha observado nenhuma sequência homóloga a *merT*, *merR*, *merP* ou *merD*, constituintes do operon *mer* em R100. Além disso, o transcrito *mer* em *T. ferrooxidans* só foi detectado em células induzidas por Hg^{2+} (operon *mer* indutível). Até agora alguns mecanismos de resistência a metais tais como mercúrio (Summers, 1986), arsênio, telúrio, cromato e cádmio são conhecidos em

vários organismos (Silver & Misra, 1988). O isolamento de genes codificando resistências ao cádmio, zinco, cobalto (Nies *et al.*, 1987) e cobre (Bender & Cooksey, 1987) tem sido divulgado e tais genes são freqüentemente encontrados em plasmídios e transposons.

Basicamente, os mecanismos bacterianos conhecidos de resistência a metais são quatro (Silver, 1992): (1) através de alterações no sistema de transporte da membrana o íon tóxico é mantido exteriormente à célula; (2) seqüestramento intracelular ou extracelular por componentes que se ligam ao íon metálico (análogo às metalotioneínas dos eucariotos e às fitoquelatinas das plantas, mas geralmente ao nível de parede celular na bactéria); (3) sistemas de efluxo altamente específico para cátion ou ânion, codificado por genes de resistência (é o mecanismo bacteriano mais comum de resistência a íons metálicos, sendo codificado por plasmídios); (4) detoxificação do cátion ou ânion por conversão enzimática em uma forma menos tóxica (exemplos: oxidação do AsIII e redução do CrVI; esse processo bacteriano não tem sido associado a plasmídios).

O íon manganês é um microelemento necessário como cofator enzimático, mas é tóxico em altas concentrações. *T. ferrooxidans* é altamente resistente a altas concentrações desse metal, em um nível de pelo menos 20 vezes mais que a *E. coli* (Wong *et al.*, 1982). Até o momento, são desconhecidos os mecanismos de resistência ao manganês e nenhum gene relacionado com essa característica foi isolado, tanto no *T. ferrooxidans* como em outras bactérias ou organismos superiores.

Portanto, um vasto campo para investigações está aberto tanto no que se refere ao mecanismo de resistência ao manganês, como a outros metais. *T. ferrooxidans* é um organismo altamente promissor para tais estudos.

OBJETIVOS

O objetivo básico deste trabalho, foi iniciar um programa de estudo visando investigar a possibilidade de se isolar e caracterizar genes que conferem resistência a metais em *T. ferrooxidans*, através da clonagem em *E. coli* e seleção direta de transformantes resistentes, em meio contendo o respectivo metal. Numa primeira etapa, objetivou-se mais especificamente o isolamento do determinante genético da resistência ao manganês em *T. ferrooxidans* e a determinação de sua localização no DNA total (cromossomo ou plasmídio) dessa espécie bacteriana.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. LINHAGENS BACTERIANAS

1.1. *T. ferrooxidans*

Foi utilizada a linhagem *T. ferrooxidans*-LR, isolada a partir de efluente ácido (pH=1,5) de coluna de lixiviação estática do minério uranífero de Lagoa Real, Bahia, Brasil (Garcia Jr., 1991).

1.2. *E. coli*

Foi utilizada a linhagem *E. coli*-DH5 α , cujo genótipo é: *supE44*, $\Delta lacU169$ (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Sambrook *et al.*, 1989).

2. MEIOS DE CULTURA

2.1. Meio T&K (*T. ferrooxidans*-LR)

O meio utilizado para o crescimento da linhagem foi o meio líquido T&K descrito por Tuovinen e Kelly (1973), com pequenas modificações; sua composição e o modo de preparo são os que se seguem:

Solução A: K_2HPO_4 0,12g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,50g

$(NH_4)_2SO_4$ 0,50g

água destilada qsp 1000ml

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

Solução B: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 167g

água destilada qsp 1000ml

O pH foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado e a solução foi esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22µm de diâmetro de poro).

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

2.2. Meio LB (*E. coli*-DH5α)

O meio utilizado para crescimento da linhagem foi o meio Luria Broth (LB), descrito por (Sambrook *et al.* 1989):

triptona 10g

extrato de levedo 5g

cloreto de sódio 10g

água destilada qsp 1000ml

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2N e o meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Para obtenção do meio sólido foi adicionado ágar (1,7%).

3. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DO *T. ferrooxidans*-LR

Para a avaliação do nível de resistência do *T. ferrooxidans*-LR ao manganês, foi utilizado o meio T&K solidificado com agarose 0,45% (concentração final). O manganês foi adicionado ao meio como $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, acidificado ao pH 1,8 com H_2SO_4 , nas seguintes concentrações (mM em Mn): 0 (controle), 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100. Uma solução estoque do manganês, preparada separadamente do meio de cultura, foi esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μm de diâmetro de poro) e adicionada ao meio momentos antes do uso, para obtenção das concentrações citadas. A solução de agarose foi esterilizada em autoclave (120°C, 20 minutos) e também adicionada ao meio, após prévio resfriamento desta (45°-50°C) para evitar hidrólise e, consequentemente, a não solidificação do meio.

Uma alíquota de uma cultura ativa da linhagem (cultivada por 2 dias em meio líquido T&K a 30°C sob agitação constante - 250rpm) foi diluída sucessivamente em Tween-80 0,1% (pH 1,8 com H_2SO_4) até 10^{-6} , segundo metodologia de Garcia Jr. *et al.* (1992). Alíquotas de 200 μl foram utilizadas para o plaqueamento no meio sólido (3 placas/concentração de manganês). A incubação foi realizada a 30°C por cerca de 13 dias.

4. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DA *E. coli*-DH5 α

Este teste foi realizado com o objetivo de se determinar a mínima concentração de manganês capaz de inibir (M.I.C.) o crescimento dessa linhagem em meio sólido.

A obtenção do meio LB contendo manganês foi dificultada devido ao pH do meio LB (7,5) determinar a precipitação do metal, o que foi evitado pela redução do pH do meio para 5,5, com ácido sulfúrico. Testes prévios de crescimento da *E. coli*-DH5 α numa faixa de pH de 5,0 a 7,0 e na ausência de manganês, demonstraram que esse valor de pH (5,5) não exerce nenhum efeito inibitório sobre o crescimento da bactéria, além de permitir uma boa solidificação do ágar.

Dessa forma, foi utilizado o meio sólido LB modificado, de pH 5,5 (LBm/ágar), contendo as seguintes concentrações de Mn (como $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 0 (controle), 5, 10, 15 e 20mM. O meio foi preparado pela adição de volumes iguais do meio LBm/ágar duas vezes concentrado e a respectiva solução de manganês de concentração igual ao dobro da desejada. Essa adição foi realizada quando a solução de LBm/ágar resfriou até cerca de 60°C, após sua autoclavagem (120°C, 20 minutos). O ajuste do pH para 5,5 do meio LBm e da solução de manganês foi realizado com ácido sulfúrico 1N e hidróxido de amônio 0,01N, respectivamente e a esterilização da solução de manganês foi feita por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μm de diâmetro de poro).

A cultura de *E. coli*-DH5 α foi obtida pelo inóculo de uma colônia isolada em meio LB líquido. Após incubação sob agitação a 37°C por uma noite, 1ml da cultura foi submetido a diluições sucessivas em 9ml de salina (NaCl 0,8%). Um volume de 50 μl da diluição 10^{-9} foi utilizado para plaqueamento (em triplicata) em cada uma das concentrações de manganês. A incubação foi realizada por 3 dias a 37°C.

5. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DO *T. ferrooxidans*-LR

5.1. Preparo da Suspensão de Células Lavadas

O cultivo do *T. ferrooxidans*-LR foi realizado em recipiente plástico contendo 10 litros de meio T&K, aerado com ar comprimido filtrado em lã de vidro esterilizada.

Após o crescimento da cultura (2-3 dias), indicado pela oxidação total do Fe^{2+} (titulação com $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - Vogel, 1986), foi realizada inicialmente uma filtração em papel de filtro comum, para eliminar precipitados de ferro formados durante o crescimento bacteriano. A seguir, a cultura foi filtrada em membrana (Millipore - $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro de poro) para separar as células do meio de cultura oxidado.

Posteriormente, foram feitas três lavagens sucessivas das células, com água a pH 1,8 (4°C , 30 minutos) em centrífuga refrigerada (MLW-ZENTRITUGENBAU ENGELSDORF, modelo K-70). Após essas lavagens, as células foram suspensas em um volume final de cerca de 50ml em água a pH 1,8 e mantidas a 4°C .

5.2. Obtenção do DNA Total

O DNA total foi preparado de acordo com Shiratori *et al.* (1989), com pequenas modificações, como descrito a seguir:

- a suspensão celular foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C em centrífuga de mesa Beckmann GPR e lavada quatro vezes com solução STE (NaCl 100mM; Tris-HCl 10mM, pH 7,8; EDTA 1mM);
- a seguir as células foram suspensas em 5ml de solução TGE(Tris-HCl 25mM, pH 8,0; glicose 50mM; EDTA 10mM), misturadas com igual volume de solução de lisozima (SIGMA-20mg/ml de solução TGE) e deixadas em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente;
- após essa incubação, foram adicionados $6,25\mu\text{l}$ de EDTA 0,5M na suspensão e manteve-se no gelo por 10 minutos;
- foram adicionados posteriormente 1,25ml de SDS 10% e $125\mu\text{l}$ de pronase E

(SIGMA, solução 20mg/ml, preparada segundo Sambrook *et al.*, 1989); misturou-se e incubou-se por 1 hora a 37°C;

- após esse período, a suspensão foi desproteinizada pela adição de igual volume de uma mistura de clorofórmio-fenol (1:1 v/v), sendo que o clorofórmio foi previamente misturado com álcool isoamílico (24:1 v/v) e o fenol equilibrado com Tris-HCl, como descrito por Sambrook *et al.* (1989); centrifugou-se a 4°C a 2500 rpm por 15 minutos;
- a seguir, a fase aquosa (superior) foi novamente extraída com igual volume de clorofórmio-fenol. Após centrifugação, a solução foi reextraída com igual volume de clorofórmio-isoamílico (24:1 v/v);
- à solução desproteinizada foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 0,6 volume de álcool isopropílico, misturando-se suavemente para precipitação do DNA;
- o DNA foi retirado da solução com uma pequena alça de vidro, lavado com etanol 70% e deixado a temperatura ambiente para secar;
- após a secagem, a alça contendo o DNA foi introduzida em 500µl de solução TE (Tris-HCl 100mM, pH 8,0; EDTA 1mM) e mantida a 4°C até a total solubilização do DNA;
- finalmente, foram adicionados 5µl de solução de RNase (SIGMA # R4875, 10mg/ml em Tris-HCl 10mM, pH 7,5, contendo 15mM de NaCl), preparada segundo Sambrook *et al.* (1989);
- a concentração do DNA extraído foi estimada pelo método espectrofotométrico (Sambrook *et al.*, 1989).

6. OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DO DNA DO *T. ferrooxidans*-LR

6.1. Avaliação Inicial do Padrão de Restrição

O DNA total do *T. ferrooxidans*-LR foi digerido com várias enzimas, as quais foram escolhidas com base na possibilidade de clonagem dos fragmentos resultantes no sítio de policlonagem do vetor pUC 19. Assim, alíquotas contendo cerca de 3µg de DNA total foram digeridas separadamente a 37°C por 2 horas, com *Eco* RI, *Bam* HI, *Sau* 3AI, *Pst* I e *Hind* III, em um volume total de 20µl, utilizando-se enzimas e seus tampões específicos de reação fornecidos pela Amersham.

Os fragmentos resultantes da digestão enzimática foram separados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato 40mM e EDTA 1mM, pH 8,0) contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio. Antes da eletroforese foram adicionados 4µl de tampão de amostra 6 vezes concentrado (bromofenol blue 0,25% e “Ficoll type 400” 15% em tampão TAE 6 vezes concentrado). Este mesmo procedimento foi adotado em todas as eletroforeses realizadas.

6.2. Digestão Total com *Pst* I

Uma alíquota contendo aproximadamente 20µg de DNA total do *T. ferrooxidans*-LR foi digerida com *Pst* I (~50U) em um volume total de 200µl do tampão específico (37°C, 2h). Após precipitação dos fragmentos obtidos a 20°C, por uma noite, com 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto, a solução foi centrifugada (em microcentrífuga Incibrás-Spin III por 30 minutos), o precipitado lavado com etanol 70% (centrifugação por 10 minutos) e seco a vácuo (5 minutos). Finalmente, os fragmentos de DNA foram suspensos em 30µl de água (solução S₁).

6.3. Digestão parcial com *Sau* 3AI

Para obtenção dos fragmentos de DNA de 500 a 2000pb e de 1000 a 5000pb, a serem utilizados na clonagem em pUC 19, foi realizada inicialmente a cinética de digestão com *Sau* 3AI, a fim de se determinar a concentração da enzima necessária para obtenção dos fragmentos de tamanhos acima mencionados.

6.3.1. Cinética Enzimática

A cinética com *Sau* 3AI foi realizada através da variação da concentração da enzima para uma mesma quantidade de DNA (2µg). As reações de digestão foram realizadas em um volume de 30µl do tampão específico, contendo as seguintes quantidades de enzima (em unidades de atividade): 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625. As reações foram mantidas a 37°C por 30 minutos.

Para interromper a reação foram adicionados 2µl de EDTA 0,5M (pH 8,0) e a seguir, incubou-se a 70°C por 5 minutos. As soluções foram então mantidas em gelo e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, paralelamente ao DNA não digerido.

6.3.2. Digestão com concentração definida de *Sau* 3AI

Com base na cinética enzimática (item anterior), foi determinada a concentração da enzima, necessária para obtenção dos fragmentos de DNA de 500 a 2000pb e de 1000 a 5000pb. Essa concentração foi aplicada às reações abaixo indicadas:

R.1. fragmentos de 500 a 2000pb: 20µl de solução de *Sau* 3AI 0,5U/µl (em tampão de reação) foram adicionados a cerca de 20µg de DNA contidos em 280µl do tampão de reação.

R.2. fragmentos de 1000 a 5000pb: 5µl de solução de *Sau* 3AI 0,5U/µl (em tampão de reação) foram adicionados a cerca de 20µg de DNA contidos em 295µl do tampão de reação.

Os tubos de reação foram incubados a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados então 20µl de EDTA 0,5M (pH 8,0) e a seguir, incubou-se a 70°C por 5 minutos, para a inativação enzimática. A precipitação dos fragmentos de DNA foi realizada a -20°C, por uma noite, com 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto. Após centrifugação (30 minutos), lavagem com etanol 70% e secagem, o precipitado foi suspenso em 30µl de água e submetido à eletroforese em gel de agarose, a fim de se obter os fragmentos desejados (item 6.3.3).

6.3.3. Isolamento dos fragmentos obtidos

Foi utilizado o método de Dretzen *et al.* (1981), com algumas modificações:

- as soluções de DNA provenientes da digestão parcial com *Sau* 3AI foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, paralelamente a um padrão constituído por fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos (kb);
- perpendicularmente às bandas de DNA contidas no intervalo de 500 a 2000pb (R_1) e de 1000 a 5000pb (R_2) foi introduzido, após incisão no gel, papel DEAE (Whatmann DE81), de largura coincidente com o intervalo de interesse e altura pouco maior que a do gel;
- após rotação de 90° do gel em relação à posição inicialmente adotada, a eletroforese foi prosseguida até que todo o DNA fosse transferido para o papel DEAE, o que foi indicado por monitoramento com lâmpada de luz ultravioleta;
- o papel foi removido cuidadosamente com auxílio de pinça estéril e introduzido no interior de uma ponteira descartável grande (normalmente utilizada com pipeta automática), contendo um pouco de lã de vidro siliconizada; foi montado um sistema através do qual o DNA foi eluído do papel, acoplando a ponteira à tampa perfurada de um tubo Eppendorf fechado;
- foram adicionados, na abertura superior da ponteira, 600µl de tampão de eluição (Tris-HCl 20mM, pH 8,0; EDTA 2mM, pH 8,0; NaCl 1,5M);
- após incubação do sistema a 37°C por 1 hora, a solução contida na ponteira foi centrifugada cuidadosamente de modo a ser totalmente transferida para o Eppendorf;
- foram adicionados mais 400µl de tampão de eluição no sistema e, após nova centrifugação, a solução contida no Eppendorf (cerca de 1ml) foi dividida em duas alíquotas, a cada uma das quais foi acrescentado 1ml de etanol absoluto;
- após centrifugação por 30 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo, suspenso em 10µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0) e a solução resultante foi mantida a 4°C.
- As soluções obtidas, contendo fragmentos de DNA de 500 a 2000pb e de 1000 a 5000pb, foram designadas S_2 e S_3 , respectivamente.

6.4. Estimativa das concentrações de DNA dos fragmentos obtidos

As soluções contendo fragmentos de DNA total do *T. ferrooxidans*-LR foram quantificadas por comparação com padrões de pUC 19, através da eletroforese em gel de agarose 1%. Tais soluções foram denominadas, como já referido anteriormente, S₁ (fragmentos de DNA total obtidos por digestão total com *Pst* I), S₂ (fragmentos de DNA total de 500 a 2000pb, obtidos por digestão parcial com *Sau* 3AI) e S₃ (fragmentos de DNA total de 1000 a 5000pb por digestão parcial com *Sau* 3AI). A 5µl de cada uma das soluções foram adicionados 15µl de água: as amostras assim diluídas foram aplicadas no gel.

A solução de pUC 19, quantificada espectrofotometricamente (100ng/µl) foi utilizada como padrão. Aliquotas de 1, 2 e 4µl foram diluídas a 20µl com água e aplicadas no gel.

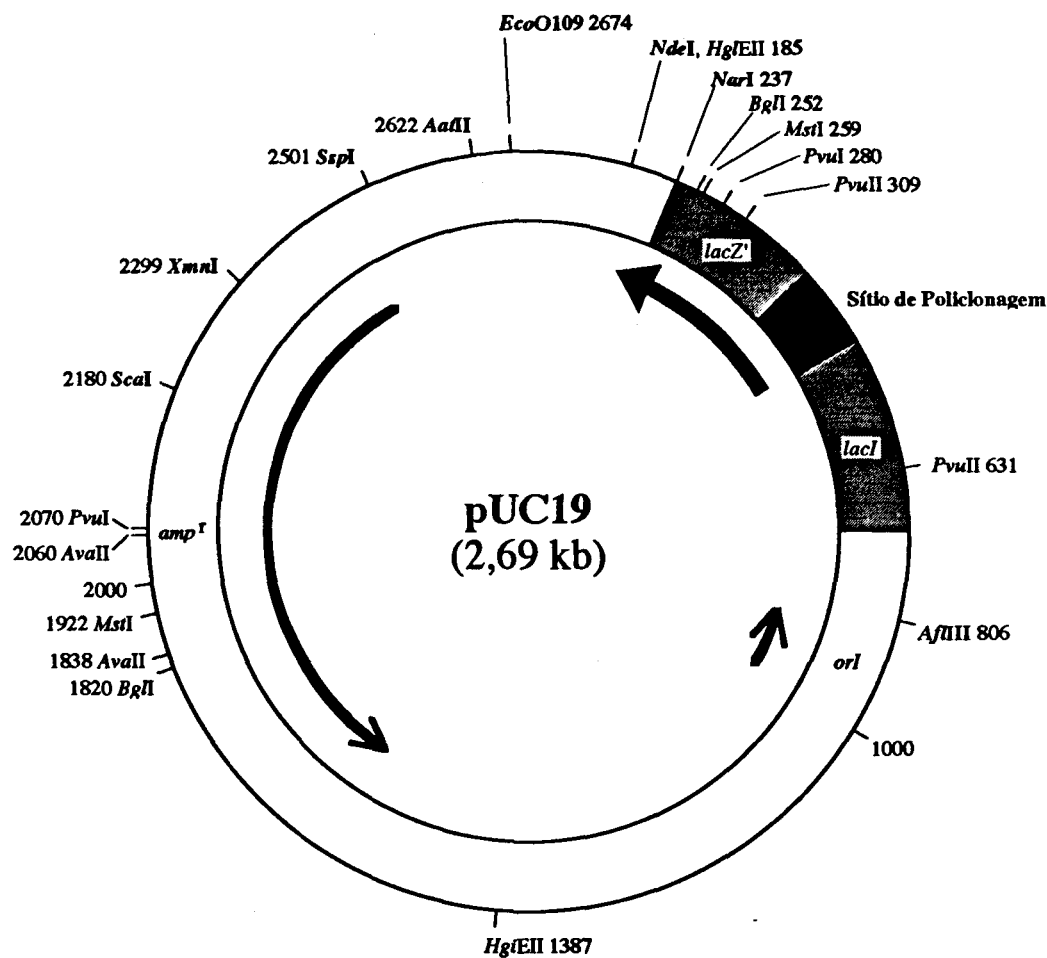
7. VETOR DE CLONAGEM

O vetor utilizado na clonagem dos fragmentos do DNA do *T. ferrooxidans*-LR foi o plasmídeo pUC 19 (Yanisch *et al.*, 1985), que contém um sítio de policlonagem (inserido no gene da β -galactosidase) e um gene que confere resistência à ampicilina, como pode ser visto no mapa de restrição da Figura 1. Esse plasmídeo produz o peptídeo α da β -galactosidase, o qual complementa a mutação de deleção *lac* em algumas linhagens de *E. coli*, dentre elas, a DH5 α .

Para clonagem dos fragmentos do *T. ferrooxidans*-LR obtidos com *Sau* 3AI utilizou-se o pUC 19 linearizado com *Bam* HI, enzima cuja restrição gera extremidades compatíveis com as extremidades produzidas pela *Sau* 3AI (a não utilização da *Sau* 3AI para linearização decorre do fato do plasmídeo apresentar vários sítios dessa enzima). No caso dos fragmentos obtidos com *Pst* I, a clonagem foi feita em pUC 19 linearizado com essa mesma enzima.

Para a linearização do plasmídeo com *Bam* HI foram adicionados 3 μ l da enzima (150U) a um volume de 97 μ l do tampão de reação específico contendo 10 μ g do DNA plasmidial (incubação a 37°C por 2 horas). Após diluição com 100 μ l de água, foi realizada a extração proteica com 1 volume de fenol-clorofórmio e, em seguida, com 1 volume de clorofórmio. Foram acrescentados 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto à fase aquosa para precipitação do DNA (por uma noite, a -20°C). Após centrifugação (30 minutos), o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 100 μ l de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0; RNase 40 μ g/ml). O DNA foi quantificado espectrofotometricamente (~100ng/ μ l) e a digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.

A digestão do pUC 19 com *Pst* I foi realizada de modo análogo ao descrito acima.



Sítio de Policlonagem

1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	5	6	7	8		
Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala		
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TTG	CAT	GCC	TGC	AGG	TCG	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CGG	GTA	CCG	AGC	TCG	AAT	TCA	CTG	GCC	

8. LIGAÇÃO INSERTO/VETOR

Foi realizada inicialmente uma análise exploratória da melhor proporção inserto/vetor (em torno da relação molar 3/1) a ser utilizada posteriormente na ligação definitiva dos fragmentos do DNA do *T. ferrooxidans*-LR no vetor pUC 19, para transformação e seleção de clone(s) da *E.coli*-DH5 α resistente(s) ao manganês. Para isso, plasmídios resultantes das ligações realizadas em diferentes proporções de inserto/vetor (1/1 a 4,5/1), foram utilizados na transformação prévia e a proporção que forneceu maior número de colônias recombinantes, foi utilizada na clonagem para transformação efetiva dessa linhagem.

Dessa forma, para se determinar os volumes das soluções de pUC 19 e de insertos a serem utilizados para obtenção de relação molar específica, os tamanhos médios dos insertos pertencentes aos bancos S₁, S₂ e S₃ foram estimados em aproximadamente 2700, 900 e 2700pb, respectivamente (ver resultados, Figura 7).

Todas as ligações foram realizadas a 15°C, por uma noite, com 7,5 unidades de atividade da T4 DNA ligase (Amersham) em 10 μ l de tampão de ligação constituído por Tris-HCl 40mM, pH 7,8; MgCl₂ 10mM; ditioneitol (DTT) 10mM e ATP 4mM.

Os plasmídios provenientes das ligações em diferentes proporções molares de inserto/vetor foram utilizados na transformação da *E. coli*-DH5 α (2 μ l de solução plasmidial/200 μ l de suspensão bacteriana) e a seleção dos clones foi realizada em meio sólido LA/Amp contendo X-Gal (todos os pormenores desses procedimentos serão descritos no item 9, que se refere à transformação e seleção definitivas). Para a seleção, foram plaqueados 100 μ l de suspensão bacteriana em cada placa (triplicatas) e após incubação (37°C por uma noite) foi determinada a proporção que forneceu o maior número de colônias brancas (recombinantes).

9. TRANSFORMAÇÃO DA *E. coli*-DH5 α E SELEÇÃO DE CLONES RESISTENTES AO MANGANÊS

9.1. Soluções e meios utilizados

Meio SOB

triptona	20 g
extrato de levedo.....	5 g
NaCl	0,585 g
KCl.....	0,186 g
água destilada	qsp 990 ml

O pH foi ajustado para 7,0 com KOH 1N e o meio autoclavado por 30 minutos.

Foram adicionados a seguir, 10ml de uma solução contendo MgCl₂ 1M e MgSO₄ 1M, esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μ m).

Solução SB₁

KCl.....	1,85 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,87 g
KMES 0,5M (pH 6,3).....	5 ml
água destilada	qsp 250 ml

Após a verificação do pH (6,2), a solução foi esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μ m).

Solução KMES (2 (N-morfolino) etano-sulfonato de potássio)

MES	9,76 g
-----------	--------

Após dissolução em cerca de 80ml de água, foi adicionada solução de KOH 1M até pH 6,3; o volume foi completado até 100ml com água destilada e a solução foi esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μ m).

Meio SOC

meio SOB contendo 1% (v/v) de glicose 2M; a solução de glicose foi esterilizada por filtração em membrana (Millipore - 0,22 μ m).

Meio Luria - Ágar com ampicilina (LA/Amp) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo)

meio LB..... 1000 ml
 ágar bacteriológico..... 15 g
 ampicilina..... 50 mg

O meio LB foi autoclavado juntamente com o ágar (120°C, 20 minutos) e 2 μ l de solução de ampicilina 25mg/ml, preparada em água esterilizada, foi adicionada após resfriamento do mesmo, imediatamente antes da distribuição nas placas. Após solidificação, 40 μ l da solução de X-Gal (20mg/ml de dimetilformamida) foram espalhados sobre o meio, mantendo-se as placas a 37°C por 1 hora, antes do plaqueamento.

9.2. Metodologia da transformação

Os experimentos de transformação consistiram na obtenção de células competentes de *E. coli*-DH5 α e na transformação propriamente dita destas células, com os plasmídios obtidos nas ligações. O método utilizado, transformação simples com cloreto de cálcio (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969, com modificações), é descrito a seguir:

- uma colônia de *E. coli*-DH5 α , isolada em placa recente de meio LB, foi inoculada em 10ml de meio SOB (contendo 20mM de Mg⁺²) e a incubação foi feita a 37°C, sob agitação (~250 rpm), por uma noite;
- 1ml da cultura assim obtida foi inoculada em 100ml de meio SOB, contido em erlenmeyer de capacidade para 500ml; a cultura, mantida a 37°C, permaneceu sob agitação (~250 rpm) até que a absorbância da solução a 550nm atingisse valor entre 0,45 e 0,55 (equivalente a cerca de 5x10⁷ células/ml), quando foi então mantida em gelo por 10 minutos;
- a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga de mesa, o sobrenadante foi descartado e as células, após serem suspendidas em 33ml de solução SB₁, foram mantidas em gelo por 60 minutos;
- após nova centrifugação nas mesmas condições, as células foram suspendidas em 8ml de solução SB₁;

- alíquotas da suspensão de células competentes assim obtidas, foram misturadas com todo o volume da solução de plasmídeo proveniente das ligações (200µl/2µl, respectivamente), permanecendo em gelo por 1 hora (para a análise prévia da melhor proporção inserto/vetor foi utilizado apenas 2µl de cada ligação para a transformação);
- para aumentar a eficiência da transformação, os tubos foram mantidos a 42°C por 90 segundos e imediatamente colocados em gelo;
- após adição de 800µl de meio SOC, os tubos foram mantidos a 37°C por 1 hora e a seguir foi realizado a plaqueamento para seleção dos clones recombinantes.

9.3. Seleção de recombinantes

Para seleção das colônias contendo vetores recombinantes, o plaqueamento da totalidade da suspensão (200 µl/placa) foi realizado em meio LA/Amp contendo X-Gal, um substrato da β -galactosidase que, por hidrólise enzimática, gera um precipitado azul. Portanto, as colônias que não possuem β -galactosidase ativa não apresentam coloração, como é o caso dos clones que possuem fragmento de DNA inserido no sítio de policlonagem do vetor pUC 19 (recombinantes).

A incubação das placas foi realizada a 37°C por uma noite.

9.4. Seleção de recombinantes resistentes a manganês

As colônias brancas (recombinantes), obtidas da seleção anterior, foram transferidas para meio sólido contendo 20mM de manganês (pH 5,5), sendo esta concentração inibitória do crescimento da *E. coli*-DH5 α (ver resultados do efeito do manganês no crescimento da *E. coli*). As placas foram mantidas a 37°C por 4 a 5 dias.

10. TESTES DE RESISTÊNCIA AO MANGANÊS DOS CLONES SELECIONADOS

10.1. Testes em meio sólido

Os clones selecionados, R3-37 e R1-76 (ver resultados) foram submetidos a testes complementares de resistência em diferentes concentrações de manganês, paralelamente à *E. coli*-DH5 α , não recombinante, transformada apenas com o vetor pUC (DH5 α /pUC 19), a fim de confirmar a resistência dos clones selecionados.

Cada colônia foi inoculada em meio líquido LB/Amp (LB contendo 50 μ g de ampicilina/ml de meio) e a incubação foi realizada a 37°C, por uma noite, sob agitação (~250 rpm). Após diluição seriada de 1ml de cultura em 9ml de salina (NaCl 0,8%), foram plaqueados 50 μ l da diluição 10⁻³ em meio LBm/ágar (com 50 μ g ampicilina/ml) contendo manganês nas concentrações 0,5 , 10 , 15 , 20 , 25 e 30mM. As placas foram incubadas a 37°C por, no máximo, 7 dias.

Em função dos resultados obtidos, um teste adicional foi realizado, o qual diferiu do anterior pelo inóculo das colônias R3-37 e DH5 α /pUC 19 em meio LBm/Amp contendo 5mM de manganês, paralelamente ao inóculo em LBm/Amp sem manganês.

10.2. Testes em meio líquido

Este teste foi realizado apenas com o clone R3-37, utilizando-se como controle a DH5 α /pUC 19. As culturas foram obtidas por inóculo das colônias em meio líquido LB/Amp (incubação a 37°C, ~250 rpm). Quando o crescimento atingiu absorbância de cerca de 0,100 (600nm), 15 μ l de cada cultura foram adicionados a tubos contendo 3ml de meio LBm/Amp com concentrações de manganês de 0,5 , 10 , 15 , 20 , 25 e 30mM. A incubação foi realizada a 37°C sob agitação (200 a 250rpm) por até 4 dias.

11. DETECÇÃO DO INSERTO NO PLASMÍDIO DO CLONE SELECIONADO

A presença de inserto no plasmídeo do clone R3-37 (p R3-37) foi confirmada através da eletroforese dos fragmentos resultantes da digestão do plasmídeo com as enzimas apropriadas. O plasmídeo foi extraído pelo método de “mini-preparação”, segundo procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989), com pequenas modificações.

11.1. Mini-preparação do plasmídeo

- foram transferidos para tubo Eppendorf 1,5ml de cada cultura (R3-37 e DH5 α /pUC 19) obtida em meio líquido LB/Amp (item 10.1);
- as culturas foram centrifugadas (2 minutos) e após descarte dos sobrenadantes, as células foram suspensas em 100 μ l de solução contendo Tris-HCl 25mM (pH 7,4), EDTA 10mM (pH 8,0) e glicose 50mM, com auxílio de vortex;
- após adição de 200 μ l de solução contendo NaOH 0,2M e SDS 1%, a mistura foi realizada por inversões durante 15 segundos e foram então adicionados 150 μ l de solução de acetato de potássio 3M (pH 4,8), misturando-se a seguir;
- após centrifugação por 3 minutos, 400 μ l do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo Eppendorf, aos quais foram adicionados 720 μ l de etanol absoluto;
- a solução foi mantida a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a seguir (1 minuto);
- o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e suspenso em 50 μ l de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 7,6; RNase 40 μ g/ml) e a concentração aproximada de DNA foi determinada espectrofotometricamente ($\sim$ 3 μ g/ μ l).

11.2. Digestão enzimática e eletroforese

O plasmídeo pR3-37 foi digerido com *Pst* I, *Eco* RI, *Hind* III e *Eco* RI e *Hind* III (digestão dupla). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.

12. RETRANSFORMAÇÃO DA *E. coli*-DH5 α COM O PLASMÍDIO RECOMBINANTE

12.1. Retransformação e seleção

Um volume de 200 μ l de células competentes de *E. coli*-DH5 α foram transformadas com 2 μ l de solução plasmidial obtida a partir do clone R3-37 (item 11.1) e selecionadas em meio LA/Amp. Uma das colônias, escolhida aleatoriamente (RpR3-37, retransformada com pR3-37), foi submetida ao teste de resistência ao manganês em meio sólido.

12.2. Teste de resistência ao manganês

Os clones R3-37 (controle positivo), DH5 α /pUC 19 (controle negativo) e RpR3-37 (a ser testado) foram inoculados previamente em meio líquido LBm/Amp contendo 5mM de manganês. Após diluição, o plaqueamento foi realizado em concentrações de manganês de 0,15 e 20mM em meio LBm/água com ampicilina, segundo o procedimento descrito no item 10.1.

13. LOCALIZAÇÃO DO INSERTO NO DNA TOTAL DO *T. ferrooxidans*-LR POR SOUTHERN BLOTTING E HIBRIDIZAÇÃO NÃO RADIOATIVA

Este experimento foi realizado com o objetivo de se determinar a origem, cromossomal ou plasmidial, do inserto *Pst* I do plasmídio pR3-37, utilizando-se o inserto como sonda. Além disso, foi realizada a hibridização da sonda com fragmentos resultantes da digestão do DNA total do *T. ferrooxidans*-LR com *Pst* I, além de outras enzimas.

13.1. Soluções e tampões utilizados

- Solução de depuração: HCl 0,25N
- Solução de Denaturação: NaCl 1,5M; NaOH 0,5M
- Tampão de transferência: NaOH 0,25M; NaCl 1,5M
- SSC: NaCl 0,15M; citrato trissódico 0,015M
- Tampão I: ácido maleico 0,1M; NaCl 0,15M; o pH é ajustado para 7,5 com NaOH sólido; esterilizada por autoclavagem
- Tampão de lavagem: tampão I contendo Tween 20 0,3% (v/v)
- Tampão II: tampão I contendo reagente bloqueador 1%
- Tampão III: Tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 50mM (pH 9,5)

13.2. Marcação do fragmento (sonda)

Foi utilizado como sonda o fragmento *Pst* I do plasmídio pR3-37, após purificação em gel de agarose, utilizando-se papel DEAE (método descrito no item 6.3.3.). Cerca de 60ng do fragmento foram inicialmente submetidas à denaturação (em um volume total de 20µl de água), por incubação a 95°C por 10 minutos; a seguir a solução foi mantida em gelo por 3 minutos. A marcação foi realizada por *random primer extension* utilizando-se *kit* de marcação do DNA com dUTP-11-digoxigenina (Boehringer Mannheim Biochemica): a 15µl da solução obtida após denaturação, foram acrescentados 2µl de mistura de hexanucleotídeos, 2µl de *dNTP labeling mixture* e 1µl de *Klenow* (2U), que corresponde ao maior fragmento da DNA polimerase I, obtido após sua clivagem com subtilisina (Jacobsen *et al.*, 1974). A reação foi mantida a 37°C por 4 horas. A precipitação da sonda foi realizada com 2µl de EDTA 0,2M (pH 8,0), 2,5µl de LiCl 4M e 75µl de etanol a -70°C por 30 minutos. Após centrifugação, lavagem com etanol 70% e

secagem do precipitado, o mesmo foi suspenso em 50µl de tampão TE a 37°C por 30 minutos.

Antes de se realizar a hibridização, a sonda foi denaturada (~95°C por 10 minutos) e colocada imediatamente em banho de gelo.

13.3. Digestão enzimática e eletroforese do DNA total

Em um volume de 25µl, foram digeridos separadamente 5µg de DNA total de *T. ferrooxidans*-LR pelas enzimas *Pst* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Eco* RI (37°C por uma noite) e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Também foram colocados no gel 5µg de DNA total não digerido. O fragmento *Pst* I do plasmídeo pR3-37 foi utilizado como controle, colocando-se cerca de 5 cópias no gel. Para cálculo da massa do plasmídeo que corresponde a uma única cópia, temos que:

$$\frac{\text{massa de plasmídeo } (\mu\text{g})}{\text{cópia}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ pb do plasmídeo}}{\text{n}^\circ \text{ pb do genoma } T. \text{ ferrooxidans}} \cdot \text{massa DNA total } (\mu\text{g})$$

Dados: $\text{n}^\circ \text{ pb do genoma do } T. \text{ ferrooxidans} = 2,8 \times 10^6 \text{ pb}$ (Yates & Holmes, 1987)

$\text{n}^\circ \text{ pb do plasmídeo pR3-37} \cong 4550 \text{ pb}$

massa DNA total = 5µg

Dos cálculos acima, temos que 5 cópias do plasmídeo (que correspondem a 5 cópias do inserto) equivalem a uma massa de 40,6ng. Aproximadamente 15µg do DNA plasmidial pR3-37 (obtido no item 11.1) foram submetidos à digestão com *Pst* I em um volume total de 20µl (37°C, 2h). Após digestão, a solução foi diluída 100 vezes com água e 5,4µl (equivalente a 40,6ng) foram colocados no gel (após diluição com água).

13.4. Transferência Alcalina

Antes da transferência, o gel foi submetido aos seguintes tratamentos:

- incubação em solução de depurinação a temperatura ambiente por 15 minutos, com agitação suave, seguida de lavagem do gel com água;
- incubação em solução de denaturação por 30 minutos com agitação suave;

- incubação em tampão de transferência

A transferência foi realizada, através do sistema esquematizado na Figura 2, para membrana de nylon Hybond N (Amersham), durante uma noite. A membrana foi lavada em solução SSC 2 vezes concentrada por cerca de 10 minutos e após secagem a temperatura ambiente, foi mantida a 80°C por 10 minutos, para fixação do DNA.

13.5. Hibridização e lavagens

A membrana foi pré-hibridizada a 42°C por 4 horas com solução SSC 5 vezes concentrada contendo sarcosil 0,1%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,02%, bloqueador 2% e formamida deionizada 50%.

Após remoção da solução de pré-hibridização, 50ml de solução de hibridização (mesma composição), contendo 50µl da sonda (obtida no item 13.2) foram adicionados à membrana, mantendo-se o sistema sob agitação moderada a 42°C, por uma noite.

A membrana foi lavada, sob agitação lenta, com solução SSC contendo SDS 0,1%, por 15 minutos a temperatura ambiente (2 vezes) e com solução SSC (diluída 10 vezes) contendo SDS 0,1%, por 15 minutos a 68°C (2 vezes).

13.6. Detecção da sonda com AMPPD

O DNA marcado com digoxigenina (DIG) foi detectado através da utilização de anti-digoxigenina conjugada com a enzima fosfatase alcalina (AP), cuja ação enzimática sobre o substrato AMPPD [3-(2'-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)-fenil-1,2-dioxetano] produz luminescência, a qual pode ser detectada por exposição a um filme de raio-X.

Os reagentes utilizados foram fornecidos pela Boehringer Mannheim Biochemica e o procedimento adotado é o que se segue (todas as etapas descritas foram realizadas a temperatura ambiente, sob agitação constante). Após incubação da membrana em tampão de lavagem (1 a 5 minutos), a mesma foi mantida em tampão II por 30 minutos. O conjugado anti DIG-AP foi diluído em tampão II para concentração de 75mU/ml e a incubação da membrana foi realizada em 20ml dessa solução, por 30 minutos. A membrana foi então mantida em 100ml de tampão de

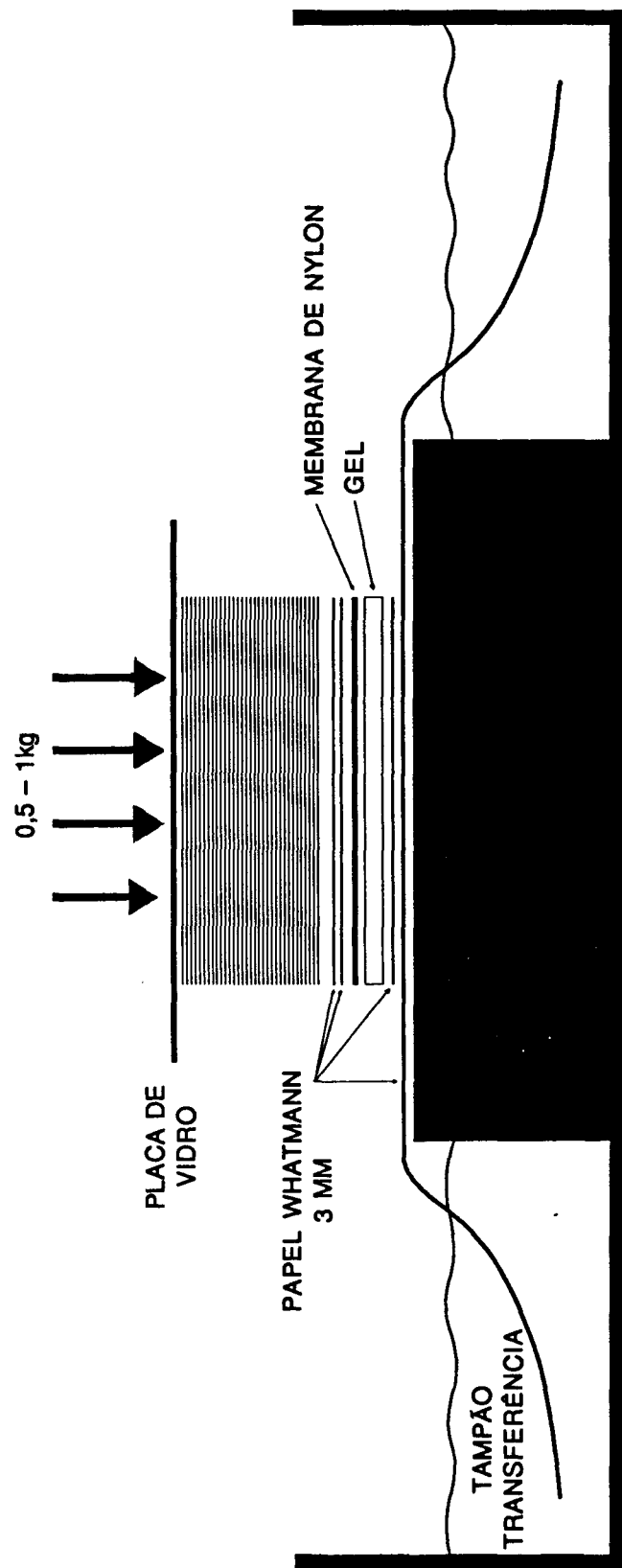


FIGURA 2. Esquema do sistema utilizado na transferência do DNA para membrana de nylon a partir do gel de agarose.

lavagem por 15 minutos (2 vezes) e equilibrada em 20ml de tampão III (2 a 5 minutos); a seguir, foi incubada com 10ml da solução de AMPPD diluída (0,1mg/ml de tampão III) por 5 minutos.

Finalmente, a membrana, selada no interior de um invólucro plástico apropriado, foi mantida a 37°C por 10 minutos e a seguir, exposta ao filme de raio-X por 5 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DO *T. ferrooxidans*-LR

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos no teste de crescimento do *T. ferrooxidans*-LR em meio sólido T&K contendo diferentes concentrações de manganês. Pode-se notar que não ocorreu nenhum efeito inibitório sobre o crescimento, ou seja, o número médio de colônias do *T. ferrooxidans*-LR permaneceu praticamente constante em todas as concentrações de manganês testadas. Além disso, também não foi verificada qualquer redução no tamanho das colônias, como pode ser visto na Figura 3. Essa linhagem mostrou ainda total resistência a 100mM de manganês (resultados não mostrados). De fato, o crescimento do *T. ferrooxidans* não é inibido nem por concentrações de manganês de 600mM (Wong *et al.*, 1982). Esses mesmos autores ainda observaram que a inibição do crescimento do *T. ferrooxidans* em concentrações maiores que 600mM pode não ser devido ao íon manganês, mas sim, a alta osmolaridade da solução.

Deve-se ressaltar ainda que devido às condições de pH do meio (pH 1,8), praticamente não ocorreu formação de precipitado do hidróxido metálico ($Mn(OH)_2$) na preparação do meio sólido. Dessa forma, os íons Mn^{2+} permaneceram praticamente “livres” em solução e a não detecção de seu efeito inibitório sobre o crescimento da linhagem testada, pode ser certamente atribuída a algum mecanismo genético de resistência dessa espécie bacteriana.

**TABELA 1. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DO
T. ferrooxidans-LR EM MEIO SÓLIDO T&K**

Mn (mM)	NÚMERO MÉDIO DE COLÔNIAS/PLACA
0	95
5	95
10	100
15	85
20	106
25	110
50	92

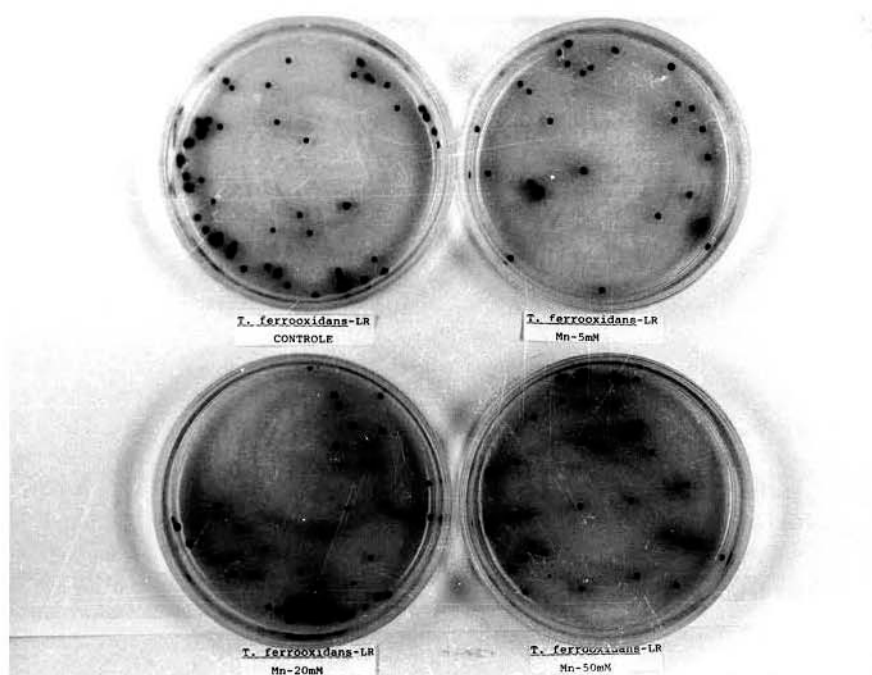


FIGURA 3. Crescimento do *T. ferrooxidans*-LR em meio sólido T&K contendo diferentes concentrações de manganês.

2. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DA *E. coli*-DH5 α

Os resultados obtidos (Tabela 2) demonstram que o crescimento dessa linhagem bacteriana é totalmente inibido pela presença de 15mM de manganês e que, mesmo em 10mM, já ocorre um efeito inibitório significativo, como revelado pela diminuição do tamanho das colônias nessa concentração (Figura 4). Essa Figura mostra ainda que o efeito inibitório é mesmo do manganês e não do pH do meio LBm (5,5), pois em valores de pH ainda menores (5,0) obtidos com HCl ou H₂SO₄, o crescimento da bactéria é normal quando comparado ao controle (pH 7,5; sem manganês).

Os resultados obtidos nesses testes iniciais evidenciaram as significativas diferenças quanto à resistência ao manganês, das duas espécies bacterianas utilizadas neste trabalho. Dessa forma, justifica-se a utilização do *T. ferrooxidans*-LR como um microrganismo doador do(s) gene(s) que confere resistência ao manganês para a *E. coli*-DH5 α , a qual é notoriamente sensível a baixas concentrações do metal, objetivando-se o isolamento e caracterização desse(s) gene(s).

TABELA 2. EFEITO DO MANGANÊS NO CRESCIMENTO DA *E. coli*-DH5 α EM MEIO SÓLIDO LBm.

Mn (mM)	NÚMERO MÉDIO DE COLÔNIAS/PLACA
0	100
5	94
10	95 (*)
15	0
20	0

(*) indica redução significativa do tamanho das colônias em relação ao crescimento na ausência de manganês (0mM)

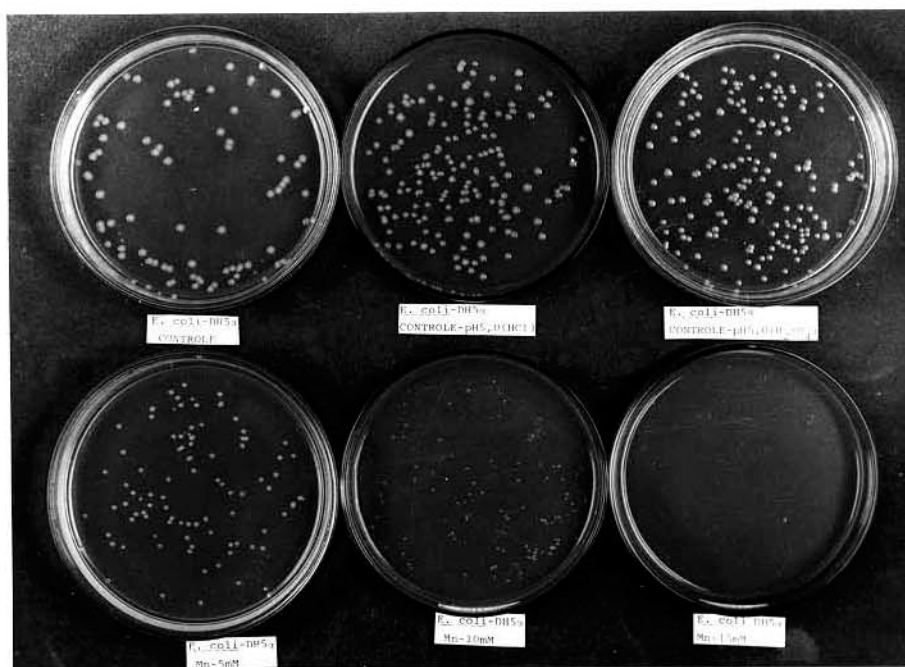


FIGURA 4. Crescimento da *E. coli*-DH5 α em meio sólido LBm (pH 5,5) contendo diferentes concentrações de manganês, comparativamente ao crescimento nos controles sem manganês, a pH 5,0 e 7,5 (meio LB normal).

3. OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS DO DNA TOTAL DO *T. ferrooxidans*-LR

Os fragmentos do DNA total dessa linhagem, obtidos por digestão total com diferentes enzimas de restrição, podem ser vistos na Figura 5. As enzimas que possibilitaram uma maior restrição do DNA foram *Sau3AI* e *PstI*, sendo que a enzima *Sau3AI* gerou os menores fragmentos (de cerca de 500pb), como esperado para uma enzima cujo sítio de reconhecimento é composto por apenas 4 pares de bases; as demais enzimas utilizadas reconhecem hexanucleotídeos e, portanto, restringem o DNA com uma frequência menor.

A digestão total com *PstI* produziu fragmentos de tamanho bastante variável (de ~800 a 7000pb), a princípio adequados à clonagem destes em pUC 19 para a construção da biblioteca genômica do *T. ferrooxidans*-LR. Entretanto, devido à possível ocorrência de uma clivagem do(s) gene(s) de interesse durante a digestão total com essa enzima, construiu-se também biblioteca genômica com *Sau3AI*. Neste caso, realizou-se uma digestão parcial, pois como visto na Figura 5, a digestão total produziu fragmentos pequenos (de ~500pb), com possibilidade reduzida de possuírem genes intactos. Assim, para a obtenção dos fragmentos com *Sau3AI* foi realizada inicialmente uma cinética enzimática com o objetivo de se determinar a concentração da enzima a ser utilizada na digestão parcial.

A Figura 6 mostra o resultado da eletroforese dos fragmentos resultantes da digestão do DNA total com diferentes concentrações de *Sau3AI*. Pode-se observar que a maior parte dos fragmentos gerados na digestão apresentou tamanhos entre 0,5 a 2kb e entre 1 a 5kb, quando foram utilizadas concentrações da enzima (em unidades de atividade/30µl) de 1 e 0,25, respectivamente. Esses dois bancos de DNA, considerados adequados à construção de bibliotecas genômicas em pUC 19, foram finalmente obtidos por digestão parcial do DNA com *Sau3AI* nas concentrações acima indicadas e, após eletroforese, isolados a partir do gel de agarose, utilizando-se papel DEAE (ítems 6.3.2 e 6.3.3 de Materiais e Métodos). Os bancos de fragmentos de DNA (0,5 a 2kb e 1 a 5kb) foram escolhidos de maneira a apresentarem sobreposição, a fim de se assegurar a representatividade do genoma. Embora a parte estrutural de um gene possa ser estimada em torno de 1kb, fragmentos maiores, que possam conter ainda seqüências regulatórias, também foram de interesse para a clonagem, devido à eventual possibilidade do(s) promotor(es) do *T. ferrooxidans*-LR, relacionado(s) à resistência ao manganês, ser(em) funcional(is) em *E. coli*.

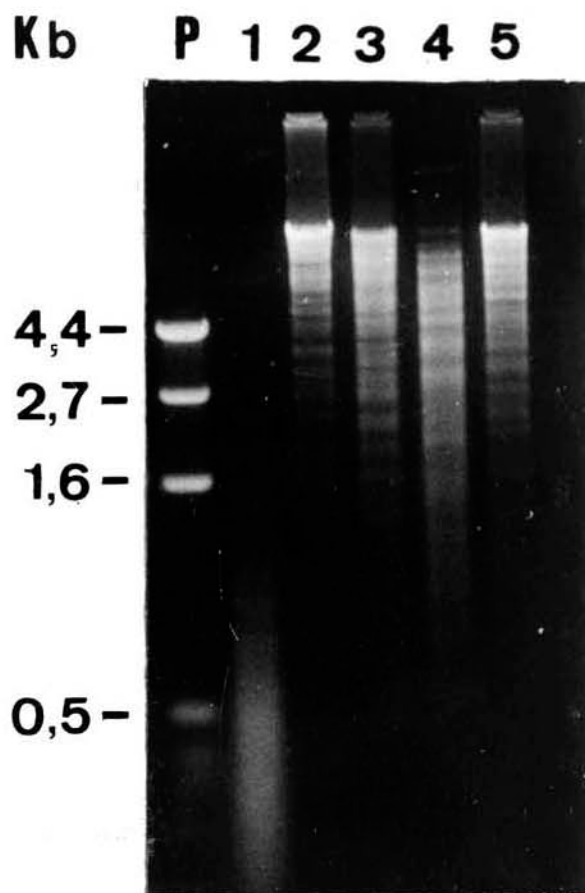


FIGURA 5. Padrão de restrição do DNA total do *T. ferrooxidans*-LR em gel de agarose 1%, com as enzimas: (1) *Sau3AI*; (2) *HindIII*; (3) *BamHI*; (4) *PstI*; (5) *EcoRI*. Os números à esquerda indicam o tamanho (kb) do fragmento correspondente a cada banda referente ao padrão (P): plasmídeo pBR 322 digerido separadamente com *EcoRI* e *HinfI* e plasmídeo pUC 8 digerido com *EcoRI*.

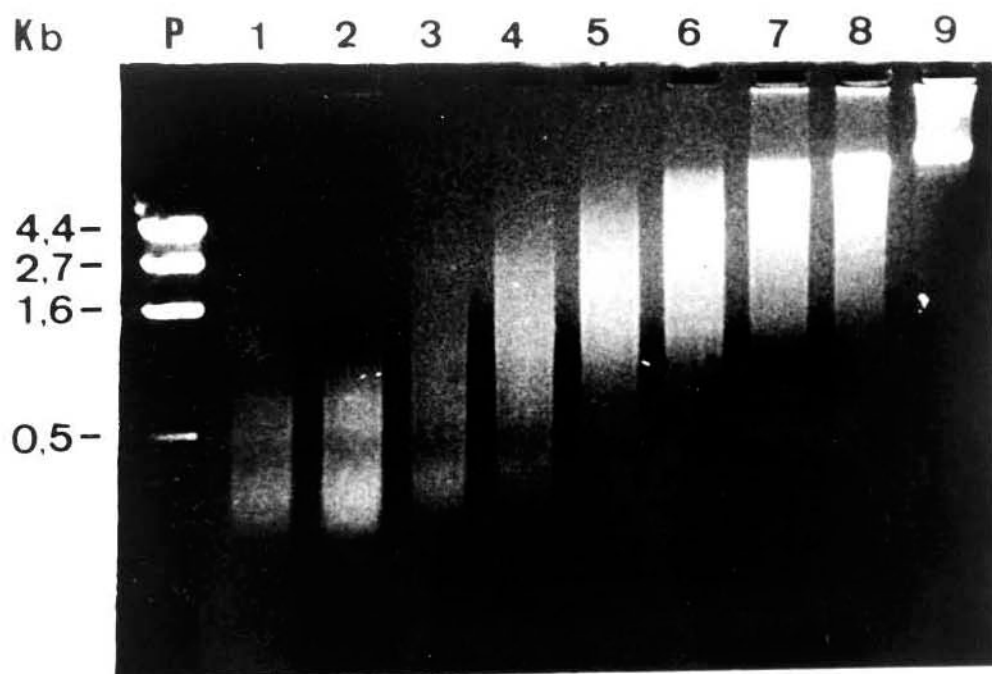


FIGURA 6. Cinética enzimática da digestão do DNA total do *T. ferrooxidans*-LR em gel de agarose 1% com as seguintes concentrações de *Sau3AI* (unidades de atividade/30µl): (1) 8,0; (2) 4,0; (3) 2,0; (4) 1,0; (5) 0,5; (6) 0,25; (7) 0,125; (8) 0,0625; (9) DNA total não digerido. Os números à esquerda indicam o tamanho (kb) do fragmento correspondente a cada banda referente ao padrão (P).

4. LIGAÇÃO INSERTO/VETOR

Inicialmente, determinou-se a proporção inserto/vetor a ser utilizada na ligação dos fragmentos de DNA do *T. ferrooxidans*-LR com o vetor pUC 19. Embora a ligação inserto/vetor seja geralmente realizada em proporção molar de 3/1, respectivamente, testou-se algumas variações em torno desse valor, devido aos fragmentos de DNA de cada banco apresentarem uma grande variedade de tamanho, como pode ser observado na Figura 7. As concentrações de DNA (ng/μl) das soluções S₁ (DNA/*Pst*I), S₂ (DNA/*Sau*3AI de 0,5 a 2kb) e S₃ (DNA/*Sau*3AI de 1 a 5kb) foram estimadas, por comparação com padrões de pUC 19, em 60, 20 e 20ng/μl, respectivamente (Figura 7). Com base na concentração de DNA e no tamanho médio estimado dos fragmentos de cada um desses bancos, foram realizadas ligações em diferentes proporções e os resultados, obtidos após transformação e seleção, são mostrados na Tabela 3.

Pode-se observar que as proporções inserto/vetor de 3/1, 1,5/1 e 1/1, utilizadas nas ligações S₁, S₂ e S₃ em pUC 19, respectivamente, produziram o maior número de colônias recombinantes, sendo então esses valores utilizados nas ligações efetivas para transformação da *E. coli*-DH5α.

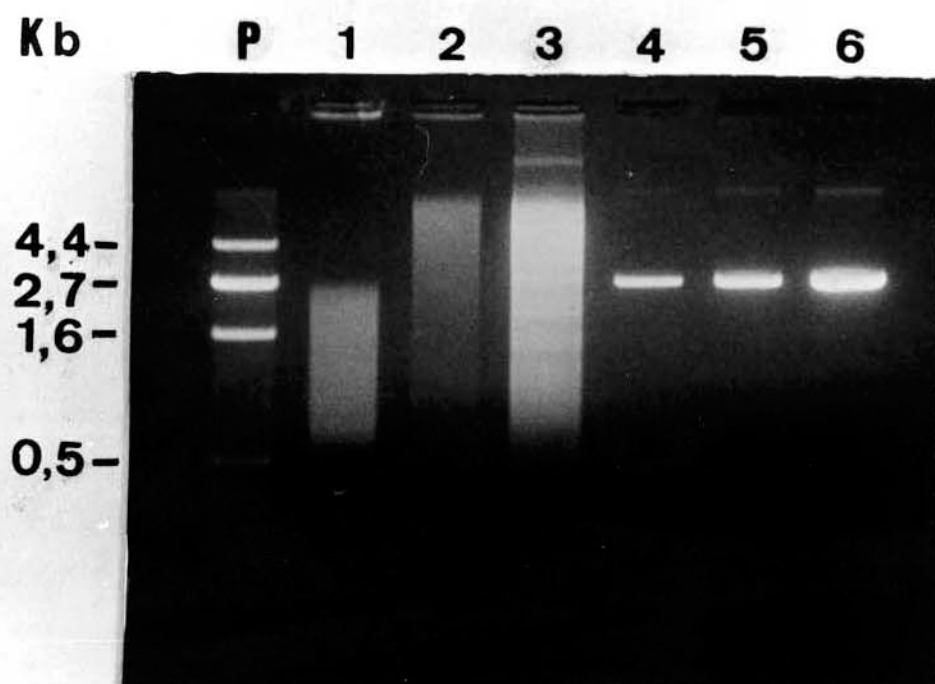


FIGURA 7. Estimativa das concentrações de DNA das soluções S₁, S₂ e S₃ em gel de agarose 1% por comparação com padrões de pUC 19: (1) Solução S₂; (2) Solução S₃; (3) Solução S₁; (4) 100ng pUC 19; (5) 200ng pUC 19; (6) 400ng pUC 19. Os números à esquerda indicam o tamanho (kb) do fragmento correspondente a cada banda referente ao padrão (P).

TABELA 3. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO NÚMERO DE *E. coli* RECOMBINANTES OBTIDAS PELA TRANSFORMAÇÃO COM PLASMÍDIOS RESULTANTES DAS LIGAÇÕES REALIZADAS EM DIFERENTES PROPORÇÕES MOLARES DE INSERTO/VETOR

LIGAÇÃO	PROPORÇÃO MOLAR APROXIMADA INSERTO/VETOR	NÚMERO MÉDIO DE COLÔNIAS RECOMBINANTES
S ₁ + pUC 19 / <i>Pst</i> I	1,5:1	16
	3:1	10
	4,5:1	8
S ₂ + pUC 19 / <i>Bam</i> HI	1:1	110
	2:1	56
	3:1	46
S ₃ + pUC 19 / <i>Bam</i> HI	1,5:1	6
	3:1	106
	4,5:1	80

5. TRANSFORMAÇÃO DA *E. coli*-DH5 α E SELEÇÃO DE CLONES RESISTENTES AO MANGANÊS

Após transformação da *E. coli*-DH5 α com as bibliotecas de DNA total de *T. ferrooxidans*-LR, cerca de 6000 colônias brancas (recombinantes) foram transferidas para meio seletivo contendo 20mM de manganês. Dois clones, R1-76 e R3-37, originados das bibliotecas cujos insertos foram obtidos com *Sau3AI* e *PstI*, respectivamente, apresentaram crescimento no meio seletivo (os números 76 e 37 se referem ao número da colônia em determinada placa, após a transferência). Esses clones foram submetidos a testes complementares de resistência ao manganês.

6. TESTES DE RESISTÊNCIA AO MANGANÊS DOS CLONES SELECIONADOS

Como pode ser observado na Tabela 4, o clone R3-37 apresentou resistência a níveis de manganês maiores que o apresentado pela *E. coli* transformada apenas com o pUC 19 (clone-controle). Em 10mM de manganês nenhum efeito inibitório sobre o crescimento do clone R3-37 foi constatado, enquanto que nessa mesma concentração o clone-controle apresentou crescimento muito lento, resultando em colônias muito pequenas e em menor número. Nas concentrações de 15,20 e 25mM de manganês o clone R3-37 apresentou crescimento depois de cerca de 2 a 4 dias de incubação, enquanto que tais concentrações inibiram completamente o crescimento do clone-controle, não se observando colônias nem mesmo após 7 dias de incubação. O comportamento do controle (*E. coli* transformada com o pUC 19) foi praticamente o mesmo observado para a *E. coli* não transformada (Tabela 2), evidenciando a não influência do vetor pUC 19 no fenótipo de resistência apresentado pelo clone resistente.

Na Tabela 4 pode-se observar ainda que o nível de resistência ao manganês apresentado pelo clone R3-37 foi maior que o do clone R1-76, o qual apresentou um nível de resistência menos diferenciado em relação ao clone-controle, razão pela qual as investigações seguintes se concentraram apenas no clone R3-37.

O teste de resistência ao manganês do clone R3-37 em meio líquido apresentou praticamente os mesmos resultados obtidos em meio sólido, confirmando o nível maior de resistência desse clone em relação ao controle (resultados não mostrados).

Pode-se observar, pela Figura 8, uma redução progressiva do número de colônias do clone R3-37 em concentrações crescentes de manganês. Numa segunda etapa do experimento foi investigado se esse efeito deve ser considerado relevante no que se refere ao nível de resistência apresentado pelo clone. Como demonstra a Figura 9, tal efeito é minimizado quando o inóculo é cultivado previamente no meio líquido contendo baixa concentração de manganês (5mM), não mais se observando diminuição significativa do número de colônias quando o plaqueamento é posteriormente realizado em 15mM de manganês. A Figura 10 mostra que esse comportamento também ocorreu no plaqueamento em meio contendo 20mM de manganês; por outro lado, pode-

TABELA 4. TESTE DE RESISTÊNCIA AO MANGANÊS DOS CLONES SELECIONADOS R1-76 E R3-37, EM COMPARAÇÃO COM O CONTROLE DH5 α /pUC 19 (TODOS OS MEIOS CONTÊM 50 μ g/ml DE AMPICILINA)

Mn (mM)	CRESCIMENTO		
	DH5 α /pUC 19 (clone-controle)	R1-76	R3-37
0	+	+	+
5	+	+	+
10	+ (*)	+	+
15	–	+	+
20	–	+ (*)	+
25	–	–	+ (*)
30	–	–	–

- os sinais + e – indicam crescimento e total inibição do crescimento (mesmo após 7 dias de incubação), respectivamente.
- (*) indica redução significativa do tamanho das colônias em relação às colônias crescidas na ausência de manganês (0mM).

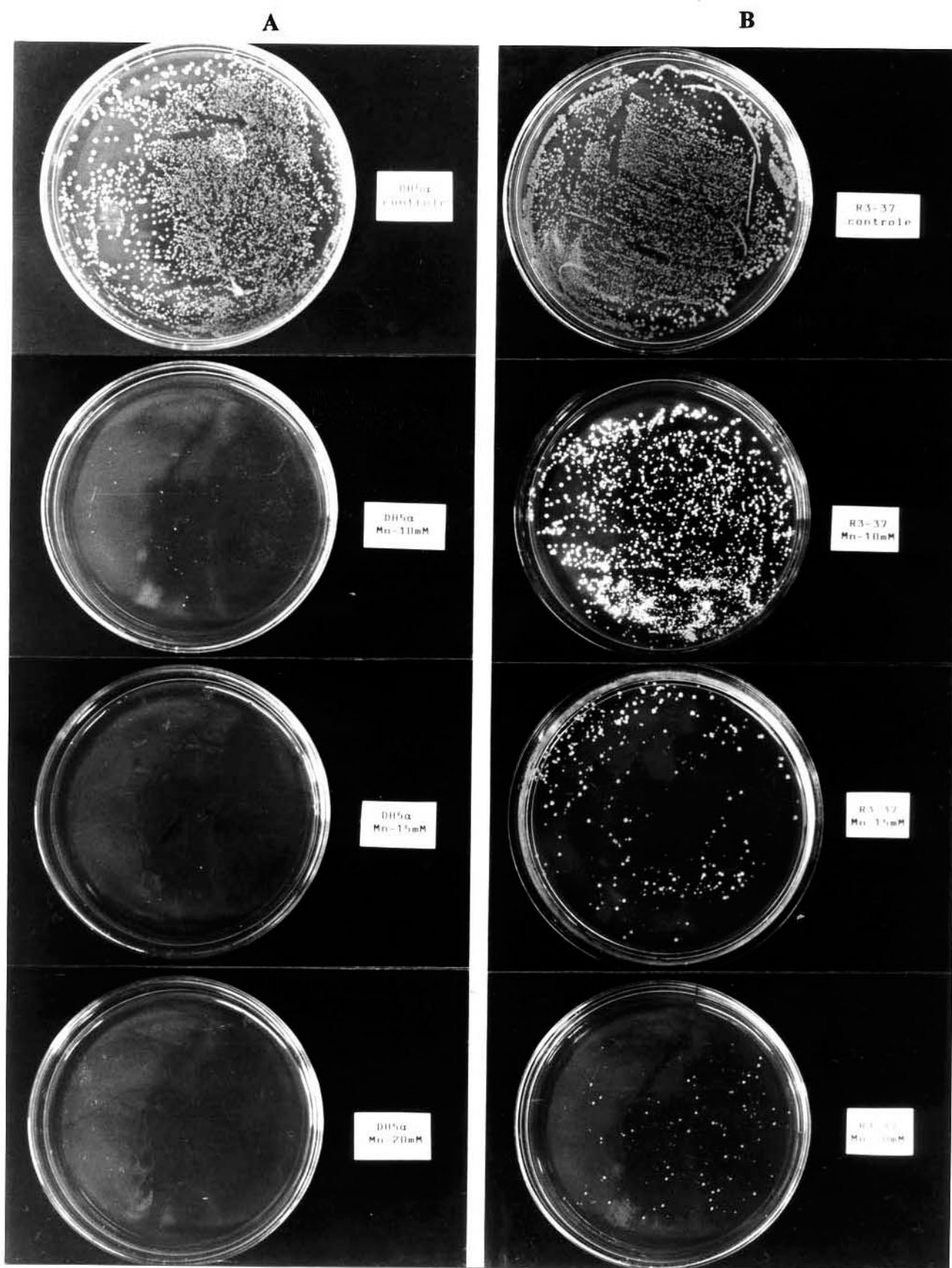
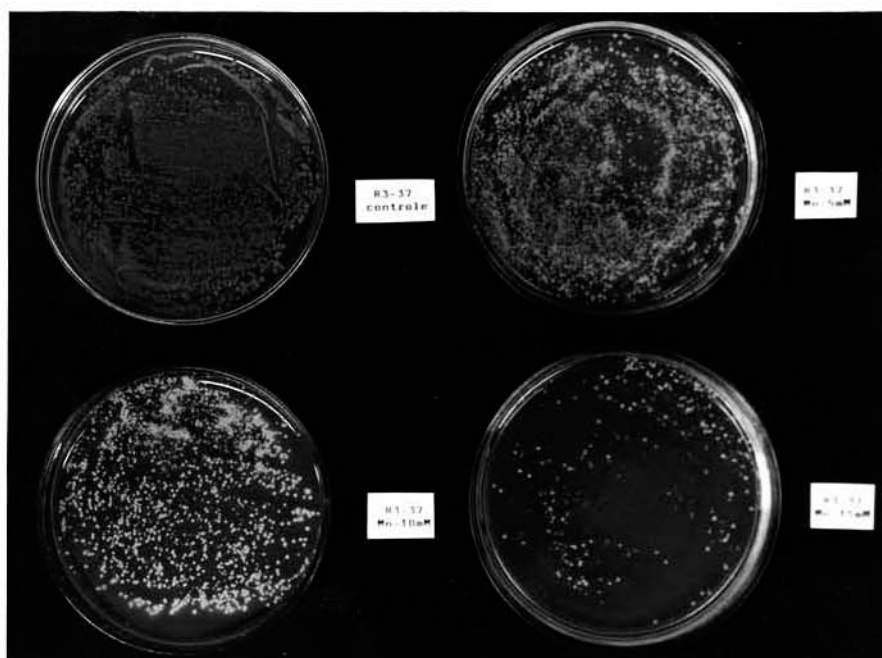


FIGURA 8. Efeito do manganês no crescimento do clone recombinante R3-37 (B), comparativamente ao crescimento da *E. coli*-DH5α não recombinante (A).

A



B

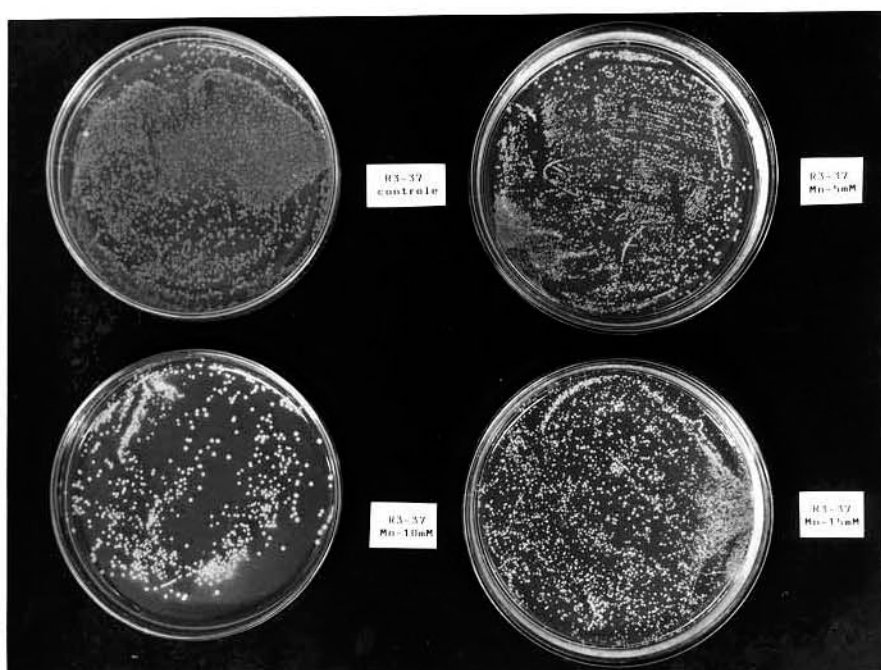


FIGURA 9. Efeito do manganês no crescimento do clone R3-37 após seu cultivo prévio em baixa concentração do metal. O crescimento do inóculo para o plaqueamento foi realizado: (A) na ausência de manganês; (B) na presença de 5mM de manganês.

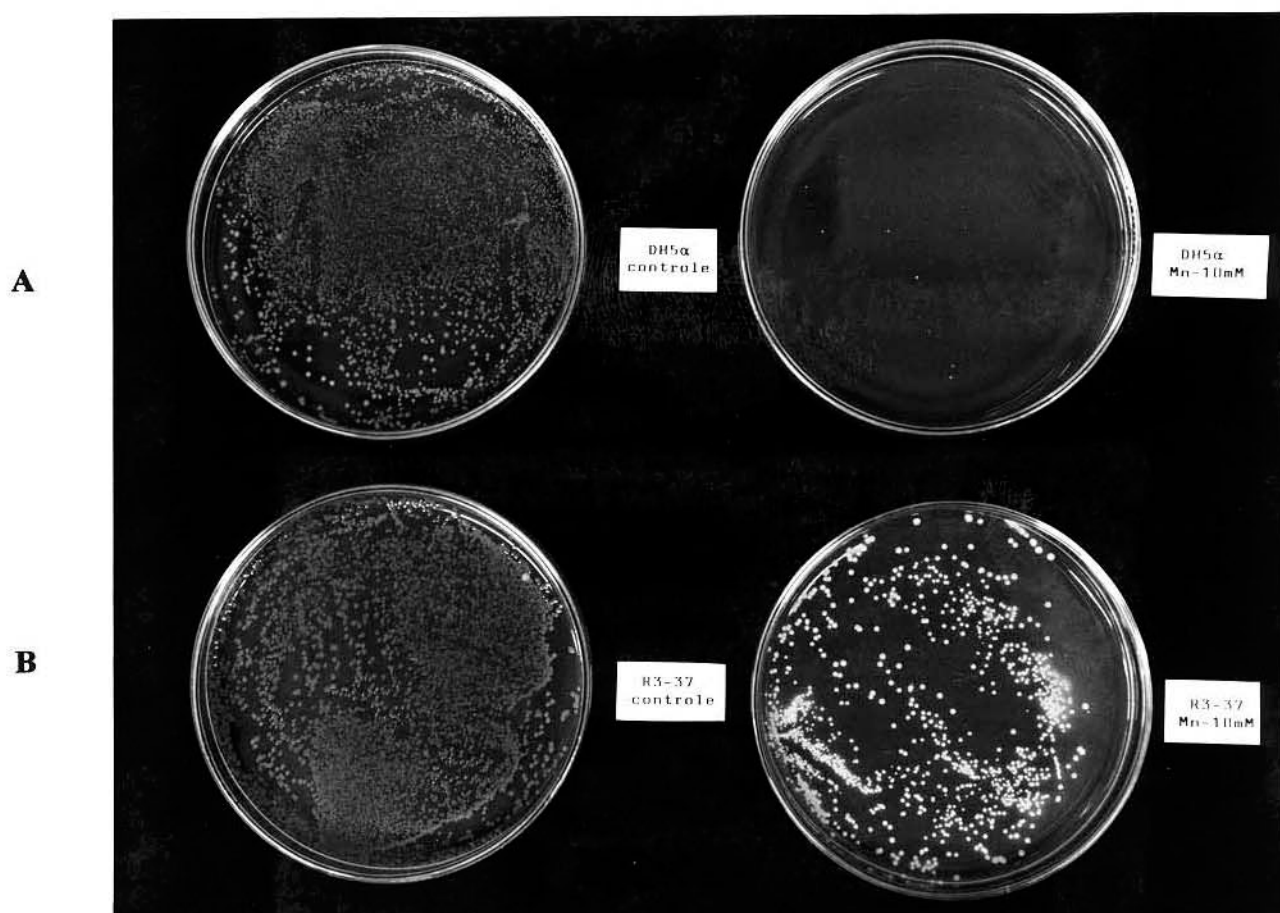
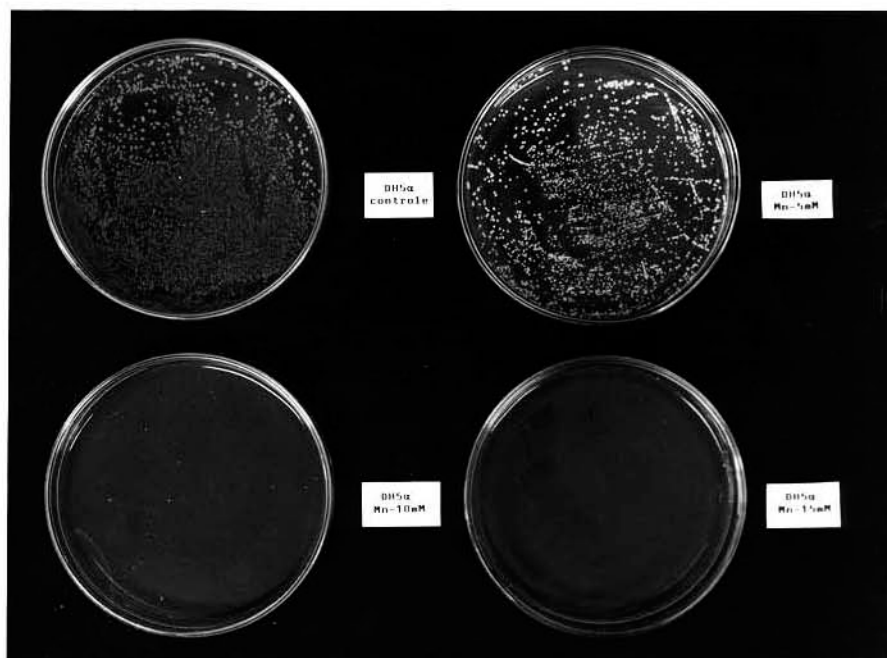


FIGURA 10. Efeito do manganês no crescimento da *E. coli*-DH5α não recombinante (A) e do clone R3-37 (B), após cultivo prévio em baixa concentração do metal (5mM).

se observar pela mesma figura, a total inibição do crescimento da *E. coli* não recombinante (clone-controle), mesmo tendo sido previamente cultivada na presença do metal. A Figura 11 mostra que o cultivo prévio em manganês desse clone, apenas possibilitou um crescimento mais efetivo em 10mM de manganês, não tendo sido observado porém, nenhum crescimento em 15mM (Figura 11) e em 20mM, conforme já destacado (Figura 10).

Independentemente do pré-cultivo do inóculo em baixa concentração de manganês, o qual, sem dúvida, melhora o desempenho de ambos os clones, os resultados evidenciaram claramente as diferenças significativas entre o clone recombinante (R3-37) e o clone-controle, quanto ao nível de resistência ao manganês.

A



B

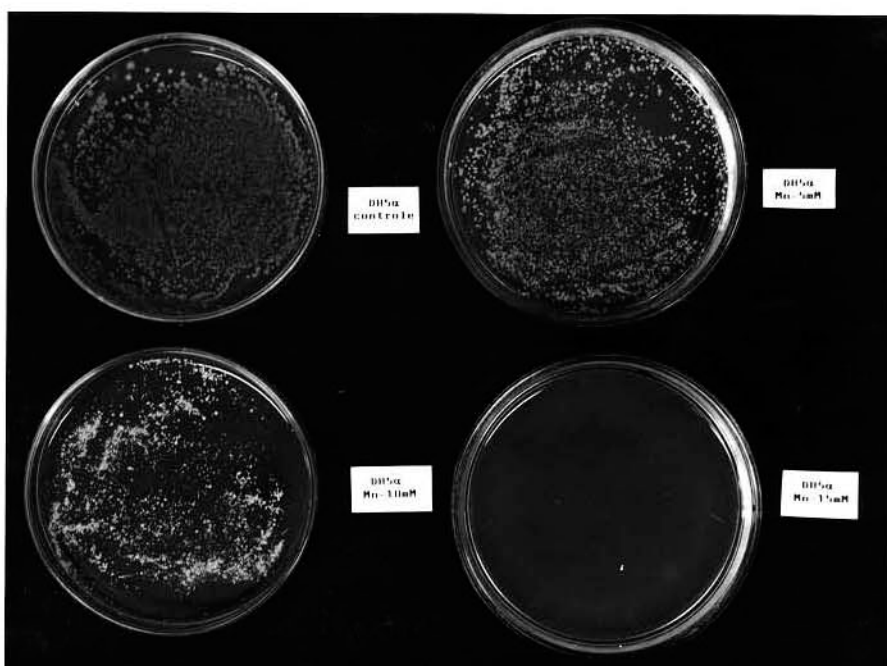


FIGURA 11. Efeito do manganês no crescimento da *E.coli*-DH5α não recombinante após seu cultivo prévio em baixa concentração do metal. O crescimento do inóculo para plaqueamento foi realizado: (A) na ausência de manganês; (B) na presença de 5mM de manganês.

7. DETECÇÃO DO INSERTO NO PLASMÍDIO DO CLONE SELECIONADO

Na Figura 12 pode-se observar os fragmentos resultantes da digestão enzimática do plasmídeo designado pR3-37, isolado a partir do clone recombinante resistente R3-37. A digestão do plasmídeo com *Pst*I produziu dois fragmentos de DNA de aproximadamente 2 e 3kb, os quais correspondem respectivamente ao inserto e ao pUC 19 linearizado (2,7kb). Este resultado está de acordo com o fato de que esse plasmídeo foi isolado a partir de biblioteca construída pela clonagem em pUC 19 (sítio *Pst*I) de fragmentos de DNA de *T. ferrooxidans*-LR obtidos por digestão total com *Pst*I. A digestão com *Pst*I, bem como com as demais enzimas (*Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RI+*Hind*III) comprovaram definitivamente a presença de inserto no plasmídeo isolado a partir do clone R3-37.

Com base nos resultados mostrados na Figura 12 e também nos resultados (não mostrados) de outras digestões enzimáticas (inclusive digestões duplas) realizadas com o pR3-37 e com o inserto (obtido a partir do gel de agarose com papel DEAE), foi possível a construção de um mapa de restrição parcial do mesmo (Figura 13). A partir deste, será possível o estudo para obtenção posterior de subclones para futuro seqüenciamento.

O inserto de cerca de 2kb, detectado no plasmídeo pR3-37, é possivelmente o responsável pelos níveis maiores de resistência ao manganês apresentado pelo clone R3-37 em relação a *E. coli* contendo o pUC 19 não recombinante (DH5 α /pUC 19).

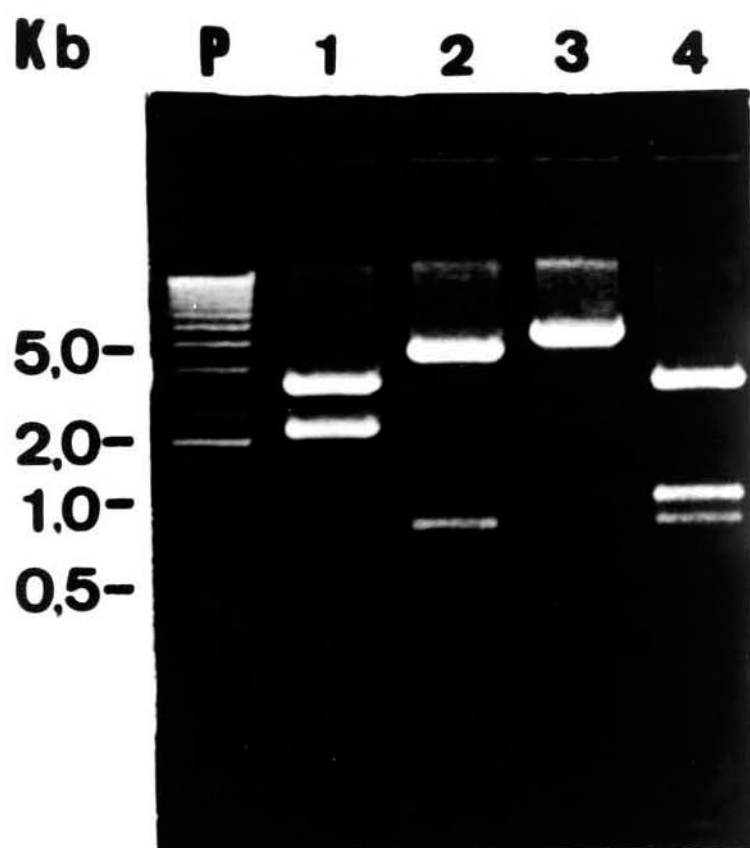


FIGURA 12. Análise de restrição enzimática do plasmídeo pR3-37 em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial do clone R3-37 foi digerido com: (1) *Pst*I; (2) *Eco*RI; (3) *Hind*III; (4) *Eco*RI + *Hind*III. Os números à esquerda indicam o tamanho dos fragmentos (kb) correspondentes às bandas do padrão *Ladder* de 1kb (Gibco BRL).

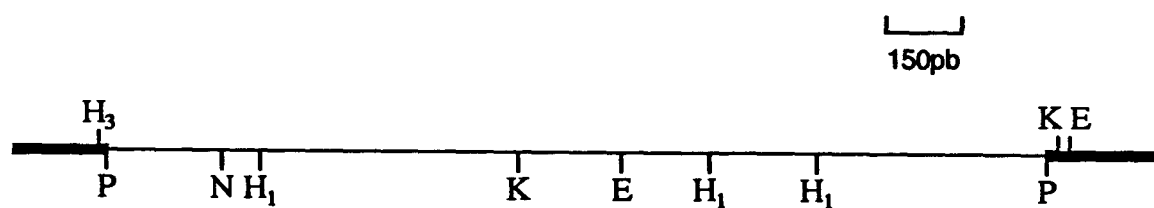


FIGURA 13. Mapa de restrição enzimática parcial do inserto *Pst*I (—) do plasmídeo pR3-37. Os sítios de restrição são: E, *Eco*RI; H₁, *Hinf*I; P, *Pst*I; N, *Nco*I; H₃, *Hind*III; K, *Kpn*I. As extremidades limitantes (—) representam segmentos pertencentes ao pUC 19.

8. RETRANSFORMAÇÃO DA *E. coli*-DH5 α COM O PLASMÍDIO RECOMBINANTE

Após retransformação da *E. coli*-DH5 α com o plasmídeo pR3-37, um dos clones obtidos (RpR3-37), no qual foi confirmada a presença do plasmídeo recombinante (resultados não mostrados), foi submetido a testes de resistência ao manganês, apresentando crescimento em até 20mM do metal (Tabela 5). Isso demonstra claramente um nível de resistência significativamente maior que o do clone-controle (DH5 α /pUC 19), cujo crescimento é totalmente inibido nessa concentração e evidencia uma resistência semelhante ao apresentado pelo clone R3-37. Tal resultado indica que o inserto proveniente do DNA do *T. ferrooxidans*-LR, clonado no plasmídeo pR3-37, é o responsável pela elevação do nível de resistência ao manganês nesses clones.

Deve ser destacado, entretanto, que em alguns experimentos realizados, outros clones retransformados, obtidos da mesma maneira que o clone RpR3-37, não apresentaram o nível de resistência esperado. Tal fato parece indicar uma dificuldade, por alguma razão ainda desconhecida, na expressão da característica de “resistência do manganês”, mesmo quando o plasmídeo recombinante, responsável pela determinação dessa característica no clone R3-37 e em alguns retransformantes, está presente nesses outros clones, objetos de retransformação. A possibilidade da eventual deficiência na expressão ser talvez um dos fatores responsáveis pelo comportamento anômalo de determinados retransformantes, deve ser considerada devido ao fato de alguns deles terem apresentado o crescimento esperado após o inóculo prévio na presença de 5mM de manganês (resultados não mostrados).

**TABELA 5. TESTE DE RESISTÊNCIA AO MANGANÊS DO CLONE RpR3-37
(*E. coli*-DH5 α RETRANSFORMADA COM O PLASMÍDIO pR3-37)**

Mn (mM)	CRESCIMENTO		
	DH5 α /pUC 19 (controle negativo)	R3-37 (controle positivo)	RpR3-37
0	+	+	+
15	–	+	+
20	–	+	+

(*) indica redução significativa do tamanho das colônias em relação às colônias crescidas na ausência de manganês (0mM).

9. LOCALIZAÇÃO DO INSERTO NO DNA TOTAL DO *T. ferrooxidans*-LR

Uma vez evidenciada a correlação entre a presença do plasmídeo recombinante pR3-37 com a elevação do nível de resistência ao manganês em *E. coli*-DH5 α , determinou-se a localização (cromossomal ou plasmidial) no DNA total do *T. ferrooxidans*-LR, do inserto clonado.

A Figura 14B mostra a origem cromossomal do inserto clonado no plasmídeo recombinante pR3-37, através da hibridização da sonda (inserto marcado com digoxigenina) com o DNA não digerido de alto peso molecular. Na Figura 14A (coluna 6) pode-se observar uma banda na região de 3 a 8kb, possivelmente de DNA plasmidial, a qual não apresentou hibridização com a sonda (Figura 14B, coluna 6).

Esses resultados demonstram que o determinante genético da resistência ao manganês no *T. ferrooxidans*-LR está localizado no DNA cromossomal e não em plasmídios. Shiratori *et al.* (1989) demonstraram que os genes que conferem resistência ao mercúrio em *T. ferrooxidans* também estão localizados no DNA cromossomal. Assim, é possível que vários genes que conferem resistência a metais, normalmente codificados por plasmídios na maioria das bactérias (Tynecka *et al.*, 1981; Silver & Misra, 1988; Ohtake *et al.*, 1987) sejam codificados pelo DNA cromossomal em *T. ferrooxidans*, pois a característica por eles conferida é essencial para a sobrevivência dessa espécie no seu habitat natural (pH ácido e altas concentrações de metais), hostil à maioria das outras espécies bacterianas.

Na Figura 14B pode-se notar também a hibridização da sonda com vários fragmentos resultantes da digestão total do DNA com *Pst*I (coluna 2). Como esperado, um desses fragmentos, de aproximadamente 2kb, corresponde exatamente ao inserto clonado no plasmídeo pR3-37 e utilizado como sonda (coluna 1); esse resultado está de acordo com o fato de que esse inserto foi isolado a partir do banco obtido por digestão total do DNA do *T. ferrooxidans*-LR com *Pst*I.

Várias bandas, no entanto, apresentaram hibridização, independentemente da enzima utilizada na digestão do DNA, o que pode ser atribuído à presença, no fragmento clonado, de seqüências ou partes de seqüências intergênicas que são repetitivas no genoma. De fato, embora seqüências de DNA repetitivo não sejam comumente encontradas em procariontes, Yates &

Holmes (1987) demonstraram que o genoma do *T. ferrooxidans* contém cerca de 6% de DNA moderadamente repetitivo, cuja função é ainda desconhecida. Esses autores demonstraram a existência de duas seqüências repetitivas distintas, designadas famílias 1 e 2, ambas de aproximadamente 1kb, apresentando 20 a 30 cópias por genoma – tais famílias de DNA repetitivo comprovadamente se encontram dispersas pelo genoma, não estando organizadas em um bloco de seqüências repetitivas *in tandem*. Este trabalho evidenciou também a presença de seis cópias de uma das famílias de DNA repetitivo no plasmídio de 45kb da linhagem de *T. ferrooxidans* utilizada.

Os poucos exemplos conhecidos de seqüências repetitivas em procariontes ocorrem em espécies bastante diferenciadas: a arqueabactéria *Halobacterium halobium* tem ao menos 50 famílias diferentes de seqüências repetitivas com 2 a 20 membros por família (**Sapienza & Doolittle, 1982**). Tais seqüências são também conhecidas na bactéria gram-negativa *Caulobacter crescentus* (**Wood et al., 1976**) e *Pseudomonas cepacia* (**Lessie & Gaffey, 1986**), bem como em várias espécies do gênero gram-positivo *Streptomyces* (**Fishman & Hershberger, 1983; Robinson et al., 1981**), incluindo um exemplo no qual seqüências repetitivas amplificadas representam 45% do genoma (**Hasegawa et al., 1985**).

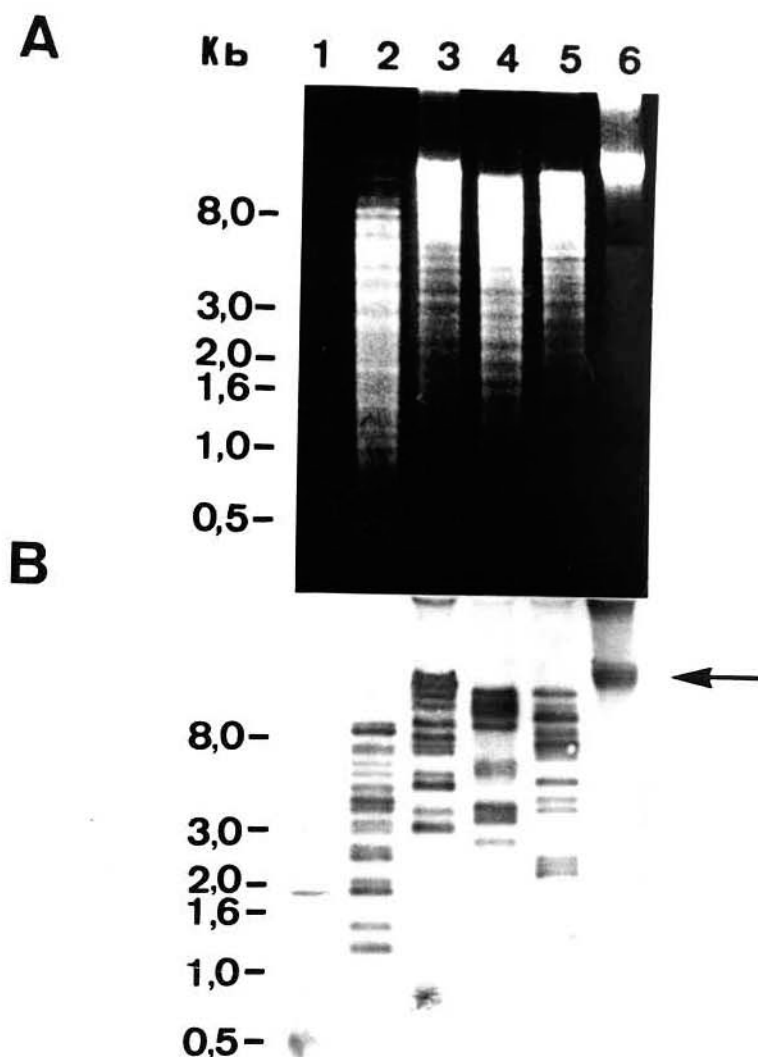


FIGURA 14. Localização do inserto *Pst*I do plasmídeo pR3-37 no DNA total do *T. ferrooxidans*-LR por hibridização não radioativa do *Southern*. (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA após digestão enzimática: (1) 40,6ng de pR3-37 digerido com *Pst*I (~ 5 cópias); 5µg do DNA total do *T. ferrooxidans*-LR digeridos com: (2) *Pst*I, (3) *Hind*III, (4) *Bam*HI, (5) *Eco*RI; (6) DNA total não digerido. Após eletroforese, os fragmentos de DNA foram transferidos para membrana de nylon. (B) a membrana foi hibridizada com o fragmento *Pst*I do pR3-37, marcado com dUTP-11-digoxigenina e a revelação foi realizada com AMPPD. A seta indica a hibridização da sonda com o DNA cromossomal do *T. ferrooxidans*-LR. Os números à esquerda se referem ao tamanho (kb) dos fragmentos de DNA do padrão (*Ladder* de 1kb, da Gilco BRL).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A implantação de um programa de manipulação genética do *T. ferrooxidans* para o isolamento de genes de resistência a metais, é altamente interessante sob o ponto de vista biotecnológico, em pelo menos dois aspectos. O primeiro deles se refere à transferência desses genes entre linhagens do *T. ferrooxidans*, que apresentam variabilidade genética natural para essa característica, de tal forma a reunir em uma única linhagem resistência elevada múltipla a metais, objetivando em última análise, a otimização do processo de biolixiviação de minérios. Um segundo aspecto se relaciona com a possível utilização do *T. ferrooxidans* como um doador desses genes para outras espécies bacterianas e outros organismos de interesse biotecnológico, nos quais a baixa ou total ausência de resistência a determinado metal, possa comprometer ou limitar o processo nos quais estão envolvidos.

Assim, o trabalho realizado teve por objetivo mais amplo, iniciar um estudo que possibilite explorar essa potencialidade do *T. ferrooxidans*, mesmo não dispondo de sondas heterólogas ou do conhecimento prévio do mecanismo de resistência a determinado metal. Mais especificamente, o trabalho objetivou o isolamento do(s) gene(s) associado(s) com o alto nível de resistência ao manganês apresentado por essa espécie, sendo que o interesse no isolamento desse(s) gene(s) se justifica por uma eventual utilização futura do(s) mesmo(s) na transformação de, por exemplo, plantas sensíveis à presença de manganês no solo.

A metodologia utilizada consistiu na transformação da *E. coli*-DH5 α com bibliotecas de DNA total do *T. ferrooxidans*-LR em pUC 19 e seleção de clones transformantes mais resistentes que a linhagem original não recombinante. Um clone obtido (R3-37) foi comprovadamente mais resistente ao manganês, apresentando crescimento em até 25mM do metal, enquanto que o crescimento do controle, *E. coli*-DH5 α transformada apenas com pUC 19, foi totalmente inibido a partir de 15mM. O clone R3-37, além de ter sido isolado de um número bastante significativo de recombinantes (~6000 clones), apresentou um inserto cujo tamanho é compatível com a presença de um gene, o qual seria responsável pelo fenótipo apresentado pelo clone. Além disso, na retransformação da *E. coli*-DH5 α com o plasmídio pR3-37, foram obtidos alguns

retransformantes que apresentaram o mesmo nível de resistência do clone R3-37. Esses resultados praticamente evidenciam que a elevação do nível de resistência no clone R3-37 em relação à *E. coli*-DH5 α não recombinante é conferida pelo fragmento inserido no pUC 19, comprovadamente originário do *T. ferrooxidans*-LR, como demonstrado pelo *Southern*; além disso, pôde-se constatar a origem cromossomal desse inserto.

É perfeitamente admissível supor a funcionalidade em *E. coli* de promotor(es) eventualmente presente(s) no fragmento clonado. Como já citado, alguns trabalhos evidenciaram a ocorrência, no DNA do *T. ferrooxidans*, de seqüências (possíveis promotores), semelhantes a seqüências consenso de promotores conhecidos em bactérias heterotróficas e também de seqüências altamente homólogas àquelas reconhecidas por proteínas regulatórias da *E. coli* (Rawlings *et al.*, 1987; Pretorius *et al.*, 1987). Esses trabalhos evidenciaram ainda a complementação de determinados mutantes de *E. coli*, após transformação com DNA do *T. ferrooxidans*, possivelmente devido ao reconhecimento dessas regiões regulatórias pelo sistema de transcrição da *E. coli* como também ao reconhecimento de outros sinais pelo sistema de tradução (códon de terminação e seqüências com certa homologia com o sítio de ligação ao ribossomo de *E. coli*). Além disso, a transcrição e tradução de proteínas codificadas pelo DNA do *T. ferrooxidans* foi demonstrada em um sistema livre-de-células da *E. coli* (Rawlings *et al.*, 1984b). Com base nesses dados, pode-se admitir a transcrição e tradução do fragmento clonado do *T. ferrooxidans* (ou de parte dele) em *E. coli*, embora provavelmente em níveis mais reduzidos.

Alguns trabalhos de isolamento de genes do *T. ferrooxidans*, realizados através da clonagem em *E. coli*, se referem a genes que possuem um análogo nessa espécie receptora (como por exemplo, glutamina sintetase e RecA), o qual se encontra inativado por mutação. Pode-se considerar que, nesse caso, a proteína exógena, muitas vezes altamente homóloga à proteína não-mutante da espécie receptora, atuará sem muita dificuldade sob as mesmas condições da proteína endógena e, portanto o fenótipo será mais facilmente detectado. Neste trabalho isolou-se um fragmento de DNA do *T. ferrooxidans*-LR relacionado com a resistência ao manganês, sendo possível que o determinante genético desta característica dificilmente possua análogo altamente homólogo na *E. coli*-DH5 α , a qual é altamente sensível ao metal (pelo menos 20 vezes mais) em

comparação com *T. ferrooxidans*-LR. Assim, é possível que a funcionalidade de uma proteína sintetizada a partir desse inserto, possa ser dificultada em maior ou menor grau, dependendo do novo microambiente ao qual é exposta e o seu desempenho em *E. coli* possa ser influenciado por fatores não identificados e, portanto não controlados, o que pode ter determinado um comportamento não reprodutível dos clones retransformantes.

Finalmente, foi constatado que o clone transformante R3-37 não apresentou o alto nível de resistência ao manganês característico do *T. ferrooxidans*. Esse fato é também admissível, devido a uma possível redução no nível de expressão e/ou ao possível “desempenho” diferenciado em *E. coli* de uma proteína que normalmente atua em um organismo de fisiologia e habitat tão peculiares como o *T. ferrooxidans*.

Em prosseguimento a este trabalho, deverá ser realizado o sequenciamento de nucleotídios do fragmento do DNA do *T. ferrooxidans* presente no plasmídeo pR3-37. Através da caracterização desse fragmento (identificação de possíveis promotores, comparação com seqüências conhecidas, etc) vários aspectos poderão ser elucidados. Posteriormente, poderão também ser realizados experimentos que determinem um aumento da expressão gênica em *E. coli* de possível(is) proteína(s) identificada(s) através desse sequenciamento, a fim de finalmente determinar a região do fragmento determinante da resistência ao manganês.

Este trabalho abre uma perspectiva da utilização do *T. ferrooxidans* como microrganismo doador de genes de resistência a metais e do conhecimento do mecanismo altamente eficiente de resistência ao manganês, característico dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, M. E. C.; RAWLINGS, D. E. & WOODS, D. R. 1985. Cloning and expression of the *Thiobacillus ferrooxidans* glutamine synthetase gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **164**: 1386-1389.
- BECK, J. V. & ISHAFIA, F. M. 1964. Effect of phosphate ion and 2,4-dinitrophenol on the activity of intact cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, **88**: 850-857.
- BENDER, C. L. & COOKSEY, D. A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Journal of Bacteriology**, **169**: 470-474.
- BOYER, H. W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969. **Journal of Molecular Biology**, **41**: 459.
- BRIERLEY, C. L. 1978. Bacterial leaching. **Critical Review of Microbiology**, **6**: 207-262.
- CHAKRABARTY, A. M. 1978. Genetic mechanisms in metal-microbe interactions. In: L. E. Murr, A. E. Torma, J. A. Brierley (Eds.), **Metalurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena**: Academic Press, N. York, p. 137-149.
- COBLEY, J. G. & HADDOCK, B.A. 1975. The respiratory chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: the reduction of cytochromes by Fe^{2+} and the preliminary characterization of rusticyanin, a novel "blue" copper protein. **FEBS Letters**, **60**: 29-33.
- COX, J. C. & BOXER, D. H. 1978. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron (II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biochemical Journal**, **174**: 497-502.
- CRIPPS, R. E. 1980. The recovery of metals by microbial leaching. In: A. Verbraeck (Ed.). **Proceedings of 13th International TNO Conference ("Biotechnology, a Hidden past a Shining future")** – Rotterdam, Holanda. Netherlands Central Organization-TNO, p. 102-115.

- DAVIDSON, M. S. & SUMMERS, A. O. 1983. Wide-host-range plasmids function in the genus *Thiobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, **46**: 565-572.
- DISPIRITO, A. A. & TUOVINEN, O. H. 1982. Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Archives of Microbiology**, **133**: 33-37
- DOLAN, K. M. & TUOVINEN, O. H. 1985. Characterization and mapping of plasmid DNA of *Thiobacillus ferrooxidans* by restriction endonuclease digestion. Paper presented at International Symposium on Biohydrometallurgy, Vancouver, Canada, 13pp.
- DORRINGTON, R. A. & RAWLINGS, D. E. 1989. Identification an sequence of the basic replication region of a broad-host-range plasmid isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, **171**: 2735-2739.
- DORRINGTON, R. A. & RAWLINGS, D. E. 1990. Characterization of the minimum replicon of the broad-host-range plasmid pTF-FC2 and similarity between pTF-FC2 and the IncQ plasmids. **Journal of Bacteriology**, **172**: 5697-5705.
- DORRINGTON, R. A.; BARDIEN, S. & RAWLINGS, D. E. 1991. The broad-host-range plasmid pTF-FC2 requires a primase-like protein for autonomous replication in *Escherichia coli*. **Gene**, **108**: 7-14.
- DRETZEN, G.; BELLARD, M.; SASSONE-CORSI, P.; CHAMBON, P. 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, **112**: 295-298.
- FISHMAN, S. E. & HERSHBERGER, C. L. 1983. Amplified DNA in *Streptomyces fradiae*. **Journal of Bacteriology**, **155**: 459-466

- GARCIA Jr., O. 1991. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, **22**: 1-6.
- GARCIA Jr., O. & SILVA, L. L. 1991. Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. **Biotechnology Letters**, **13**: 567-570.
- GARCIA Jr., O.; MUKAI, J. K. & ANDRADE, C. B. 1992. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effects of some surface-active agents on colony formation. **Journal of General and Applied Microbiology**, **38**: 279-282.
- GOLOMZIK, A. I. & IVANOV, V. I. 1965. Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* increased hydrogen iron and ion concentrations. **Mikrobiologiya**, **34**: 465-468.
- GROUDEV, S. N. 1980a. Differences between *Thiobacillus ferrooxidans* strains with respect to their ability to oxidize covellite. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 659-662.
- GROUDEV, S. N. 1980b. Leaching of sphalerite with different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 1119-1122.
- GROUDEVA, V. I., GROUDEV, S. N. & MARKOV, K. I. 1980. Nitrosoguanidine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the levels of its oxidizing activity. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 1401-1404.
- GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I. & GENTCHEV, G. J. 1978a. Survival of *Thiobacillus ferrooxidans* after UV Irradiation. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 599-602.

- GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I. & GENTCHEV, G. J. 1978b. UV induced mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* possessing high oxidizing activity. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 1197-1200.
- GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I. & GENTCHEV, G. J. 1978c. Ethylenimine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 1477-1479.
- HARRISON, Jr., A. P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. **Archives of Microbiology**, **131**: 68-76.
- HASEGAWA, M.; HINTERMANN, G.; SIMONET, J-M.; CRAMERI, R.; PIRET, J. & HUTTER, R. 1985. Certain chromosomal regions in *Streptomyces glaucescens* tend to carry amplifications and deletions. **Molecular and General Genetics**, **200**: 375-384.
- HOLMES, D. S.; LOBOS, J. H.; BOPP, L. H. & WELCH, G. C. 1984. Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **157**: 324-326.
- HOWARD, A. & LUNDGREN, D. G. 1970. Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). **Canadian Journal of Biochemistry**, **48**: 1302-1307.
- HUTCHINS, S. R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A. & BRIERLEY, C. L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Annual Review of Microbiology**, **40**: 311-336.
- INGLEDEW, W. J. 1986. Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology and Bioengineering, Symposium n° 16** ("Biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries"), p. 23-34.

- INGLEDEW, W. J. & COBLEY, J. G. 1980. A potentiometric and Kinetic study on the respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **590**: 141-158.
- INOUE, C.; SUGAWARA, K. & KUSANO, T. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans mer* operon: sequence analysis of the promoter and adjacent genes. **Gene**, **96**: 115-120.
- 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.
- JACOBSEN, H.; KLENOW, H. & OVARGAARD-HANSEN, K. 1974. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and the small fragments obtained by a limited proteolysis. **European Journal of Biochemistry**, **45**: 623.
- KULPA, C. F.; ROSKEY, M. T. & TRAVIS, M. J. 1983. Transfer of plasmid RP1 into chemolithotrophic *Thiobacillus neapolitanus*. **Journal of Bacteriology**, **156**: 434-436.
- KUSANO, T.; SUGAWARA, K.; INOUE, C. & SUZUKI, N. 1991a. Molecular cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal ribulose biphosphate carboxylase genes in *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, **22**: 35-41.
- KUSANO, T.; TAKESHIMA, T.; INOUE, C. & SUGAWARA, K. 1991b. Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, **173**: 7313-7323.
- KUSANO, T.; SUGAWARA, K.; INOUE, C.; TAKESHIMA, T.; NUMATA, M. & SHIRATORI, T. 1992. Eletrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. **Journal of Bacteriology**, **174**: 6617-6623.

- LANDESMAN, J.; DUNGAN, D. W. & WALDEN, C. C. 1966. Iron oxidation by washed cell suspensions of the chemoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, **12**: 957-964.
- LESSIE, T. G. & GAFFEY, T. 1986. Catabolic potential of *Pseudomonas cepacia*. In J. R. SOKATCH & L. N. ORNSTON (Ed.). **The Bacteria**. Academic Press, Inc., Orlando, Fla, p. 439-481.
- LUNDGREN, D. G. & SILVER, M. 1980. Ore leaching by bacteria. **Annual Review of Microbiology**, **34**: 263-283.
- MACKINTOSH, M. E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of General Microbiology**, **105**: 215-218.
- MANDEL & HIGA. 1970. **Journal of Molecular Biology**, **53**: 154.
- MAO, M. W. H.; DUGAN, P. R.; MARTIN, P. A. W. & TUOVINEN, O. H. 1980. Plasmid DNA in chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus*. **FEMS Microbiology Letters**, **8**: 121-125.
- MARTIN, P. A. W.; DUGAN, P. R. & TUOVINEN, O. H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic chemolithotrophic *Thiobacilli*. **Canadian Journal of Microbiology**, **27**: 850-853.
- NIES, D.; MERGEAY, M.; FRIEDRICH, B. & SCHLEGEL, H. G. 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. **Journal of Bacteriology**, **169**: 4865-4868.
- OHTAKE, H.; CERVANTES, C. & SILVER, S. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. **Journal of Bacteriology**, **169**: 3853-3856.

- PECK, H. D. 1968. Energy coupling mechanisms in chemolithotrophic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, **22**: 489-518.
- PIVOVAROVA, T. A. & GOLOVACHEVA, R. S. 1985. Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. In: G. I. Karavaiko & S. N. Groudev (Eds.). **Biogeotechnology of metals**. Proceedings of International Seminar and Training Course (Moscow and Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects-GKNT, Moscow, p. 27-55.
- PRETORIUS, I. -M.; RAWLINGS, D. E.; O'NEILL, E. G.; JONES, W. A.; KIRBY, R. & WOODS, D. R. 1987. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, **169**: 367-370.
- RAMESAR, R. S.; WOODS, D. R. & RAWLINGS, D. E. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of General Microbiology**, **134**: 1141-1146.
- RAMESAR, R. S.; ABRATT, V.; WOODS, D. R. & RAWLINGS, D. E. 1989. Nucleotide sequence and expression of a cloned *Thiobacillus ferrooxidans recA* gene in *Escherichia coli*. **Gene**, **78**: 1-8.
- RAWLINGS, D. E. & WOODS, D. R. 1985. Notes. Mobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmids among *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, **49**: 1323-1325.
- RAWLINGS, D. E.; PRETORIUS, I. & WOODS, D. R. 1984a. Expression of a *Thiobacillus ferrooxidans* origin of replication in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **158**: 737-738.

- RAWLINGS, D. E.; PRETORIUS, I. -M. & WOODS, D. R. 1984b. Construction of arsenic-resistant *Thiobacillus ferrooxidans* recombinant plasmids and the expression of autotrophic plasmid genes in a heterotrophic cell-free system. **Journal of Bacteriology**, 1: 129-133.
- RAWLINGS, D. E.; PRETORIUS, I. -M. & WOODS, D. R. 1986a. Expression of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid functions and the development of genetic systems for the *Thiobacilli*. **Biotechnology Bioeng. Symp.**, 29: 291-297.
- RAWLINGS, D. E.; SEWCHARAN, R. & WOODS, D. R. 1986b. Characterization of a broad-host-range mobilizable *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid and the construction of *Thiobacillus* cloning vectors. In: Lawrence, R. W., Branion, R. M. R. and Ebnes, H. G. (Eds.), **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy**. Elsevier, Amsterdam, pp. 419-427.
- RAWLINGS, D. E.; GAWITH, C.; PETERSEN, A. & WOODS, D. R. 1983. Characterization of plasmids and potential genetic markers in *Thiobacillus ferrooxidans*. In: G. Rossi & A. E. Torma (Eds.) **Recent Progress in Biohydrometallurgy** (International Symposium on Biohydrometallurgy, Cagliari, Italy), F. & F. Parretti Grafiche-Firenze, p. 555-570.
- RAWLINGS, D. E.; JONES, W. A.; O'NEILL, E. G. & WOODS, D. R. 1987. Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene and its controlling region the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **Gene**, 53: 211-217.
- ROBINSON, M.; LEWIS, E. & NAPIER, E. 1981. Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion. **Molecular and General Genetics**, 182: 336-340.
- ROHRER, J. & RAWLINGS, D. E. 1992. Sequence analysis and characterization of the mobilization region of a broad-host-range plasmid, pTF-FC2, isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, 174: 6230-6237.

- SADLER, W. R. & TRUDINGER, P. A. 1967. The inhibition of microorganisms by heavy metals. **Miner. Deposita**, 2: 158-168.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. E. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SAPIENZA, C. & DOOLITTLE, W. F. 1982. Unusual physical organization of the *Halobacterium* genome. **Nature**, 295: 384-389.
- SHIRATORI, T.; INOUE, C.; NUMATA, M. & KUSANO, T. 1991. Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Current Microbiology**, 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*. **Journal of Bacteriology**, 171: 3458-3464.
- SILVER, S. 1992. Plasmid - determined metal resistance mechanisms: range and overview. **Plasmid**, 27: 1-3.
- SILVER, S. & MISRA, T. K. 1988. Plasmid - mediated heavy metal resistances. **Annual Review of Microbiology**, 42: 717-743.
- SUGIO, T.; TANO, T. & IMAI, K. 1981. Isolation and some properties of two kinds of cytochrome *c* oxidase from iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. **Agricultural Biological Chemistry**, 45: 1791-1799.
- SUMMERS, A. O. 1986. Organization, expression and evolution of genes for mercury resistance. **Annual Review of Microbiology**, 40: 607-637.

- TAKAMIYA, M.; SALAZAR, O.; VARGAS, D.; JEDLICKI, E. & ORELLANA, O. 1990. Identification and structural analysis of a ribosomal RNA gene promoter from *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEBS Letters**, 272: 50-54.
- TUOVINEN, O. H. & KELLY, D. P. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ore. **Z. Allg. Mikrobiologie**, 12: 311-346.
- 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 $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, 88: 285-298.
- TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A. & TSUCHIYA, H. M. 1979. Nitrogen requirement of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, 37: 954-958.
- TYNECKA, Z.; GOS, Z. & ZAJAC, J. 1981. Reduced cadmium transport determined by resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, 147: 305-312.
- VALENTI, P.; POLIDORO, M.; BUONFIGLIO, V.; VISCA, P. & ORSI, N. 1990. Plasmid DNA profiles in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of General and Applied Microbiology**, 36: 351-355.
- VOGEL, A. I. 1986. Vogel: Análise Inorgânica Quantitativa. Revisão por J. Bassett *et al.* Traduzido por Aida Espinola. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara. p268-9.
- WEINBERG, E. D. (Editor). 1977. Microorganisms and minerals. Marcel Dekker, New York.
- WONG, C.; SILVER, M. & KUSHNER, D. 1982. Effects of chromium and manganese on *Thiobacillus ferrooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, 28: 536-544.
- WOOD, N.; RAKE, A. & SHAPIRO, L. 1976. Structure of *Caulobacter* deoxyribonucleic acid. **Journal of Bacteriology**, 126:1305-1315.
- YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J. & MESSING, J. 1985. **Gene** 33: 103.

- YANKOFSKY, S. A.; GUREVICH, R.; GRIMLAND, N. & STARK, A. A. 1983. Genetic transformation of obligately chemolithotrophic *Thiobacilli*. **Journal of Bacteriology**, **153**: 652-657.
- YATES, J. R. & HOLMES, D. S. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, **169**: 1861-1870.