

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ROGÉRIO FARIA BERGAMO

**“EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE
Acidithiobacillus ferrooxidans SUBMETIDA A
ALTERAÇÕES NO PH IDEAL DE CULTIVO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ROGÉRIO FARIA BERGAMO
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Laura m. m. ottoboni

Orientadora: Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B452e	<p>Bergamo, Rogério Faria Expressão diferencial de genes de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> submetida a alterações no pH ideal de cultivo / Rogério Faria Bergamo. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>. 2. pH. 3. Expressão gênica. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Differential gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to pH alterations.

Palavras-chave em inglês: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; pH; Gene expression.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Laura Maria Mariscal Ottoboni, Maria Sílvia Viccari Gatti, Laurecir Gomes, Edi Lúcia Sartorato, Márcio José da Silva.

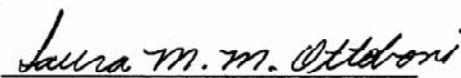
Data da defesa: 31/01/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)


Assinatura

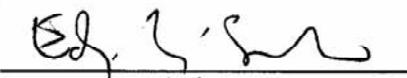
Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti


Assinatura

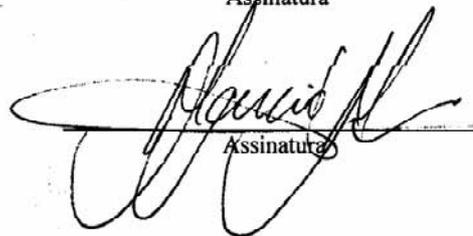
Profa. Dra. Laurecir Gomes


Assinatura

Dra. Edi Lúcia Sartorato


Assinatura

Dr. Márcio José da Silva


Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Assinatura

Dra. Fernanda de Castro Reis

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

Dedico este trabalho

Ao meu pai João Batista (*in memoriam*)

À minha mãe Maria José

Ao meu irmão Renato

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni pela orientação.

Aos membros do exame de qualificação: Profa. Dra. Maria Julia Marques, Profa. Dra. Laurecir Gomes e Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete pelo incentivo, comentários e sugestões.

Aos membros da pré-banca: Profa. Dra. Laurecir Gomes, Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti e Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pelos valiosos comentários.

Aos membros da banca examinadora: Laura M. M. Ottoboni, Laurecir Gomes, Maria Silvia Viccari Gatti, Edi Lúcia Sartorato, Márcio José da Silva, Wanderley Dias da Silveira, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Fernanda de Castro Reis.

À Liliam Alves Senne Panagio, secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo incentivo e ajuda na finalização deste trabalho.

Às secretárias do CBMEG: Sandra, Tânia, Andressa e Tamiris por facilitar meu dia -a-dia.

Aos amigos do laboratório e do CBMEG.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À minha família.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de figuras e tabelas	8
Resumo.....	11
Summary.....	12
Introdução.....	13
- <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	13
- Resistência e adaptação a metais em <i>A. ferrooxidans</i>	15
- Efeito do pH e da temperatura em <i>A. ferrooxidans</i>	16
Objetivos.....	19
Material e Métodos.....	20
- Linhagem bacteriana.....	20
- Preparo de meio de cultura.....	20
- Experimentos de respirometria e curvas de crescimento de <i>A. ferrooxidans</i>	21
- Obtenção de massa celular.....	21
- Isolamento de RNA de <i>A. ferrooxidans</i>	22
- RAP-PCR.....	22
- Tratamento do RNA com DNase.....	22
- Síntese de cDNA.....	23
- Isolamento e reamplificação das bandas diferenciais.....	24
- <i>Slot blot</i> de DNA.....	24
- Transferência das bandas diferenciais para membranas de nylon.....	24
- Hibridização das membranas.....	25
- Análise dos padrões de hibridização obtidos nos experimentos de <i>slot blot</i>	25
- Clonagem e seqüenciamento das bandas diferenciais.....	26
- Técnicas padrões de biologia molecular.....	26
Resultados e Discussão.....	27
- Efeito do pH no consumo de oxigênio e oxidação de ferro pela linhagem de <i>A. ferrooxidans</i> LR.....	27
- Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de RAP-PCR.....	29
- Confirmação da expressão diferencial através de <i>slot blot</i> de DNA.....	35
- Análise da expressão diferencial em pH 1,2 e 3,0.....	44
- Análise da expressão diferencial em pH 1,5 e 2,5.....	46

- Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs com expressão induzida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8.....	48
- Análise dos cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados.....	48
- Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs com expressão reprimida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8.....	53
- Análise dos cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados.....	53
Conclusões.....	58
Referências Bibliográficas.....	59
Artigo Publicado.....	67

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Efeito do pH na linhagem de *A. ferrooxidans* LR - Curvas de crescimento e consumo de oxigênio - **página 28.**

Figura 2. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0. *Primers* arbitrários OPF01 e OPF03 - **página 30.**

Figura 3. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0. *Primers* arbitrários OPF04 e OPF08 - **página 31.**

Figura 4. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5. *Primers* arbitrários OPJ04 e OPJ14 - **página 33.**

Figura 5. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5. *Primers* arbitrários OPF04 e OPF08 - **página 34.**

Figura 6. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,2 e pH 3,0 com o *primer* OPF01 - **página 36.**

Figura 7. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,2 e pH 3,0 com o *primer* OPF03 - **página 37.**

Figura 8. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,2 e pH 3,0 com o *primer* OPF08 - **página 38.**

Figura 9. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8 e pH 1,2 com o *primer* OPF04 - **página 39.**

Figura 10. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,5 e pH 2,5 com o *primer* OPJ04 - **página 40.**

Figura 11. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,5 e pH 2,5 com o *primer* OPJ14 - **página 41.**

Figura 12. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,5 e pH 2,5 com o *primer* OPF04 - **página 42.**

Figura 13. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados em pH 1,8, pH 1,5 e pH 2,5 com o *primer* OPF08 - **página 43.**

Figura 14. Análise, com os programas *Gene Cluster* e *TreeView v1.45*, do padrão de expressão, em pH 1,2, 1,8 e 3,0, dos cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada - **página 45.**

Figura 15. Análise, com os programas *Gene Cluster* e *TreeView v1.45*, do padrão de expressão, em pH 1,5, 1,8 e 2,5, dos cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada - **página 47**.

Figura 16. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 2F01 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína *small heat shock* – IbpA - **página 48**.

Figura 17. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 8F04 e a seqüência de aminoácidos de uma *L-2 haloalkanoic acid dehalogenase* - **página 51**.

Figura 18. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 27F04 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína hipotética de *Magnetospirillum magnetotasticum* - **página 52**.

Figura 19. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 3F08/4F08 e a seqüência de aminoácidos da proteína Res B de *A. ferrooxidans* - **página 52**.

Figura 20. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1F01 e a seqüência de aminoácidos de uma *fructose/tagatose biphosphate aldolase* - **página 53**.

Figura 21. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 12F01 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína DedA - **página 56**.

Figura 22. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1J04 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína ribossomal S19 – 30S - **página 56**.

Figura 23. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 10J14 e a seqüência de aminoácidos de uma DNA helicase ATP-dependente - **página 56**.

Tabela 1. Número de cDNAs diferenciais isolados nos experimentos de RAP-PCR a partir de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0 - **página 29**.

Tabela 2. Número de cDNAs diferenciais isolados nos experimentos de RAP-PCR a partir de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5 - **página 32**.

Tabela 3. Número de cDNAs com expressão diferencial confirmada nos experimentos de *slot blot* de DNA para *A. ferrooxidans* cultivada em diferentes pHs - **página 44**.

Tabela 4. Número de cDNAs com expressão diferencial confirmada nos experimentos de *slot blot* de DNA para *A. ferrooxidans* cultivada em diferentes pHs - **página 46**.

Tabela 5. cDNAs com expressão induzida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8 com coeficiente de expressão acima de um selecionados para clonagem e seqüenciamento - **página 49**.

Tabela 6. Análise das seqüências de cDNAs de *A. ferrooxidans* com expressão induzida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8 - **página 50.**

Tabela 7. cDNAs com expressão reprimida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8 com coeficiente de expressão abaixo de um selecionados para clonagem e seqüenciamento - **página 54.**

Tabela 8. Análise da seqüência dos cDNAs com expressão reprimida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8 - **página 55.**

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria não patogênica, Gram-negativa, que obtém a energia necessária para o seu crescimento pela oxidação de compostos inorgânicos. Essa bactéria tem despertado interesse por fazer parte de um consórcio de microrganismos envolvidos na biolixiviação de metais. O processo de biolixiviação é influenciado por vários fatores, dentre eles o pH. Apesar desse fator ser importante no crescimento e sobrevivência da bactéria, existem poucas informações sobre os mecanismos moleculares acionados pela bactéria para suportar mudanças envolvendo este parâmetro. Assim sendo, nesse trabalho foram realizados experimentos de respirometria e curvas de crescimento para analisar-se o comportamento da linhagem brasileira de *A. ferrooxidans* LR em situações que envolviam alterações no pH ideal de cultivo. Com esses experimentos, observou-se que, na presença de pHs acima (2,5 e 3,0) e abaixo (1,5 e 1,2) de 1,8, tanto a respiração quanto o crescimento de *A. ferrooxidans* LR são afetados. Os pHs dos experimentos de respirometria e curvas de crescimento foram utilizados para obtenção de células de *A. ferrooxidans* para o isolamento do RNA que foi analisado por RAP-PCR com os *primers* arbitrários OPF01, OPF03, OPF04, OPF08, OPJ04, OPJ14. Como controle, foi utilizado RNA isolado de células obtidas em pH ideal de cultivo da bactéria. Os cDNAs isolados tiveram a expressão diferencial confirmada por *slot blot* e foram, a seguir, clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados. As seqüências deduzidas de aminoácidos de quatro cDNAs com expressão induzida em pHs acima ou abaixo de 1,8 apresentaram similaridade com as seguintes proteínas: proteína hipotética, proteína *small heat shock*, L-2-haloalkanoic acid dehalogenase e ResB. As seqüências deduzidas de aminoácidos de quatro cDNAs com expressão reprimida em pHs acima ou abaixo de 1,8 apresentaram similaridade com as proteínas *fructose/tagatose biphosphate aldolase*, DedA, proteína ribossomal e DNA helicase dependente de ATP. Esses resultados sugerem que alterações no pH ideal de cultivo de *A. ferrooxidans* resultam em alterações da expressão de genes que codificam para proteínas pertencentes a diferentes categorias funcionais.

SUMMARY

Acidithiobacillus ferrooxidans are non pathogenic, Gram-negative bacteria that obtain energy for growth from the oxidation of inorganic compounds. These bacteria are part of a consortium of microorganisms involved in the bioleaching of metals. Among others, pH alterations can affect bioleaching. The pH is very important in the survival and growth of the bacteria, but very little is known about the molecular mechanisms used by the bacteria to bare pH alterations. This way, in this work respirometric experiments and growth curves were conducted to analyze the behavior of the *A. ferrooxidans* Brazilian strain LR in situations involving changes in the bacteria ideal pH. In pHs above (2.5 and 3.0) and below (1.5 and 1.2) 1.8 both oxygen consumption and growth were affected. The pHs used in the respirometric experiments and growth curves were selected to grow *A. ferrooxidans* cells to isolate the RNA that was used in the RAP-PCR experiments with the arbitrary primers OPF01, OPF03, OPF04, OPF08, OPJ04 and OPJ14. The differential expression of the isolated cDNAs was validated by slot blot. The cDNAs were cloned, sequenced and the obtained sequences were compared to the ones present in GenBank. The deduced amino acids sequences of four cDNAs up-regulated in pHs above and below 1.8 presented similarity with the following proteins: hypothetical protein, *small heat shock*, *L-2-haloalkanoic acid dehalogenase* and ResB. The deduced amino acids sequences of four cDNAs down-regulated in pHs above and below 1.8 presented similarity with the proteins: *fructose/tagatose biphosphate aldolase*, DedA, ribosomal protein and ATP-dependent DNA helicase. These results suggest that alterations in the *A. ferrooxidans* ideal pH change the expression of genes that encode proteins from different functional categories.

INTRODUÇÃO

Acidithiobacillus ferrooxidans

O gênero *Acidithiobacillus* (Kelly & Wood, 2000) é constituído por eubactérias em forma de bastonetes, Gram-negativas, não patogênicas e com metabolismo quimiolitotrófico. Estas bactérias obtêm a energia necessária para seu crescimento pela da oxidação de substratos inorgânicos, sendo capazes de fixar o CO₂ atmosférico (Kuenen *et al.*, 1992). Fazem parte deste gênero as espécies *Acidithiobacillus albertensis*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*.

As espécies do gênero *Acidithiobacillus* apresentam características diferentes quanto suas necessidades nutricionais, pH e temperatura ideais para o crescimento (Kuenen *et al.*, 1992). *A. ferrooxidans* é a única espécie do gênero capaz de obter energia pela oxidação do íon ferroso. Esta bactéria é acidofílica, com pH ótimo de crescimento em torno de 2,0 e temperatura ótima em torno de 30°C (Leduc & Ferroni, 1994).

A. ferrooxidans é uma das espécies mais estudadas do gênero *Acidithiobacillus*, já que é um dos principais microrganismos envolvidos na lixiviação bacteriana de metais, ou biolixiviação. Durante o processo de biolixiviação, o metabolismo microbiano causa a solubilização de minérios que apresentam em sua constituição formas reduzidas de enxofre e ferro. A bactéria pode solubilizar metais diretamente, pelo ataque enzimático oxidativo, ou indiretamente, pela produção de H₂SO₄ e Fe³⁺ (Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). No processo de biolixiviação os íons de metais pesados são acumulados e, a partir de certas concentrações, passam a ser tóxicos para os microrganismos, afetando, desse modo, as taxas de dissolução dos minérios. A biolixiviação vem sendo utilizada em escala industrial para obtenção de cobre, urânio e ouro. O processo poderá se tornar comercialmente viável para obtenção de zinco, níquel, cobalto e molibidênio (Bosecker, 1997).

A. ferrooxidans apresenta também importância ambiental, pois pode ser utilizada na degradação de resíduos químicos provenientes de minerais processados. Os métodos convencionais geralmente apresentam custos elevados e o emprego de *A. ferrooxidans* é uma alternativa econômica e rápida, com benefícios para o ambiente (Shiratori & Sonta, 1993; Hubert

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

Os estudos genéticos com *A. ferrooxidans* tiveram início no final da década de setenta com trabalhos realizados por Groudeva *et al.* (1978). Estes trabalhos demonstraram a existência de uma variabilidade genética natural na espécie. Trabalhos adicionais detectaram ainda variabilidade natural quanto às atividades de lixiviação de esfalerita e covelita (Groudev, 1980a, b), quanto à resistência ao urânio e tório e quanto a parâmetros cinéticos da bactéria (Dispirito & Tuovinen, 1982). Quatro linhagens brasileiras isoladas de minas de urânio e carvão apresentaram variabilidade quanto a resistência a metais como cobalto, cobre, prata e mercúrio (Garcia Jr. & Silva, 1991).

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

Nem todos os isolados classificados atualmente como *A. ferrooxidans* são filogeneticamente relacionados. Harrison (1982) utilizou hibridização DNA-DNA para realizar um estudo sistemático envolvendo um grande número de linhagens de *A. ferrooxidans*. Neste estudo, as linhagens foram divididas em sete grupos de homologia. Lane *et al.* (1992) utilizaram seqüências parciais de rDNA 16S para comparação filogenética de linhagens de *A. ferrooxidans*, sendo que a maioria delas, incluindo representantes de três grupos de homologia de Harrison (1982), foram agrupadas em um *cluster* filogenético distinto. Novo *et al.* (1996) analisaram oito linhagens de *A. ferrooxidans*, sendo seis brasileiras, pelo método de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As linhagens foram divididas em dois grupos principais, com apenas 0,5% de similaridade entre eles. Selenska-Pobell *et al.* (1998) utilizaram RAPD e amplificação dos elementos repetitivos ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (Hulton *et al.*, 1991) e BOX-PCR (Martin *et al.*, 1992) para classificação e identificação de linhagens do gênero

Acidithiobacillus. Os dados obtidos mostraram um alto grau de dissimilaridade de uma das linhagens de *A. ferrooxidans*. Segundo Rawlings & Kusano (1994), a variabilidade genética existente entre as diversas linhagens de *A. ferrooxidans* justificaria sua subdivisão em várias espécies.

Resistência e adaptação a metais em *A. ferrooxidans*

Uma característica interessante de *A. ferrooxidans* é a resistência natural generalizada a altas concentrações de íons metálicos (Tuovinen *et al.*, 1971; Brierley, 1978; Lundgren & Silver, 1980; Hutchins *et al.*, 1986). Isto pode ser atribuído à presença constante de metais no ambiente natural de crescimento da bactéria. Segundo revisão de Hutchins *et al.* (1986), *A. ferrooxidans* apresenta resistência ao alumínio (0,37 M), manganês (0,18 M), cobalto (0,17 M), cobre (0,16 M), zinco (0,15 M), cromo (0,1 M) e urânio (0,01 M). Os níveis de resistência da bactéria são menores para prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M), molibidênio, selênio, telúrio e arsênio (10^{-3} M).

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

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

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

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

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

Efeito do pH e da temperatura em *A. ferrooxidans*

Além de metais pesados, os efeitos de pH e temperaturas mais elevadas que as condições ótimas de crescimento da bactéria, têm sido estudados em *A. ferrooxidans*. Esses estudos são muito importantes devido ao papel que este organismo desempenha na biolixiviação. O pH e a temperatura afetam tanto o crescimento bacteriano quanto a solubilidade dos metais durante o processo de biolixiviação (Lombardi & Garcia, 1999). Além disso, a lixiviação ocorre muitas vezes sob temperaturas e pH mais elevados que as condições ótimas de crescimento de acidithiobacilli (Modak *et al.*, 1996).

Hubert *et al.* (1995) verificaram a capacidade de diferentes linhagens de *A. ferrooxidans* de responderem ao estresse à temperatura. Os autores observaram que uma das linhagens de *A. ferrooxidans* analisadas apresentou tolerância à temperatura elevada (42°C) após um choque

térmico de 20°C para 35°C. Resultados semelhantes haviam sido previamente relatados por Alvarez & Jerez (1989) que observaram que células de *A. ferrooxidans* eram protegidas dos efeitos deletérios resultantes da exposição a altas temperaturas após um choque térmico de 30°C para 41°C.

Jerez (1988) observou que a síntese de várias proteínas era inibida quando células de *A. ferrooxidans* eram transferidas de 30°C (temperatura ideal) para 41°C. Foi observado também que a síntese de algumas proteínas específicas (proteínas *heat shock*) aumentava. A indução de proteínas “*heat shock*” (HSPs) em resposta ao aumento da temperatura tem sido relatado em várias espécies de bactérias (Jerez, 1988; Cloutier *et al.*, 1992; Hubert *et al.*, 1995; Arsene *et al.*, 2000). Em *E. coli*, por exemplo, o aumento da temperatura de cultivo de 30°C para 42°C promove a indução da síntese de mais de 20 HSPs (Arsene *et al.*, 2000). As principais HSPs de *E. coli* são chaperonas, incluindo os sistemas DnaK (DnaK, DnaJ e GrpE) e GroE (GroEL e GroES) e proteases (Georgopoulos *et al.*, 1994; Gross, 1996; Arsene *et al.*, 2000). DnaK e GroEL também são as principais HSPs de *A. ferrooxidans*, como observado por Varela & Jerez (1992), em experimentos de *Western blot* e seqüenciamento do terminal amino de proteínas isoladas de géis de duas dimensões.

Modak *et al.* (1996) adaptaram uma linhagem de *A. ferrooxidans* à temperatura de 42°C, através de várias subculturas em meio 9K em temperaturas crescentes (de 30°C a 42°C). Esses autores observaram que a linhagem adaptada apresentou um aumento na eficiência da biolixiviação de pirita. Quando a linhagem voltou a ser cultivada a 30°C, a tolerância a 42°C foi perdida mostrando que ela era estresse-dependente. Assim sendo, segundo esses autores, para que linhagens adaptadas a temperaturas mais elevadas possam ser utilizadas, a biolixiviação tem que ser efetuada na mesma temperatura na qual a bactéria foi adaptada.

Como mencionado, *A. ferrooxidans* é acidofílica com pH ótimo de crescimento em torno de 2,0, o que faz com que a bactéria gere um gradiente de pH para manter o pH do citosol neutro (Cobley & Cox, 1983). Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares utilizados por *A. ferrooxidans* para responder a mudanças do pH externo. Amaro *et al.* (1991) analisaram o perfil eletroforético de proteínas de *A. ferrooxidans* cultivada em pH 1,5 e 3,5. Quando células cultivadas em pH 3,5 foram transferidas para pH 1,5, observou-se uma alteração na síntese de proteínas incluindo uma diminuição da síntese de uma proteína de 36 kDa (p36). Os autores

sugeriram que a p36 é uma porina cuja síntese é regulada pelo pH extracelular. Quando células cultivadas em pH 1,5 foram transferidas para pH 3,5 não foram observadas alterações significativas na síntese de proteínas. A exceção foi a proteína p36 que apresentou um aumento em sua síntese. Assim sendo, de acordo com Amaro *et al.* (1991), os dados obtidos indicam que alterações no pH em *A. ferrooxidans* são mais drásticas quando ocorre um aumento na acidificação.

Em *E. coli*, ao contrário de *A. ferrooxidans*, foram observadas alterações mais acentuadas na síntese protéica quando as células foram transferidas para pH mais alcalino do que aquele no qual elas estavam crescendo (Taglicht *et al.*, 1987). De acordo com os autores, as proteínas induzidas em *E. coli* pela alcalinização do pH eram HSPs, incluindo DnaK e GroE. Slonczewski *et al.* (2000) verificaram o efeito de alterações do pH em *Helicobacter pylori* em géis de duas dimensões. Segundo esses autores, em todas as condições de pH testadas, as proteínas mais induzidas eram UreB (urease) e GroEL. GroEL, juntamente com GroES e DnaK, também foram as proteínas mais induzidas em *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em pH ácido (pH 4,5) (Lim *et al.*, 2000).

Rince *et al.* (2000) analisaram, por eletroforese em gel de duas dimensões, o efeito de diferentes tipos de estresse, incluído pH e temperatura, em *Enterococcus faecalis*. Seis proteínas tiveram a síntese induzida por pelo menos seis das oito situações de estresse testadas. Duas das seis proteínas que respondiam a estresse de uma maneira geral (Gsp – *general stress proteins*) foram identificadas, por *Western blot*, como sendo DnaK e GroEL.

Apesar do pH, assim como a temperatura, serem fatores importantes no crescimento e sobrevivência de *A. ferrooxidans*, existem poucas informações sobre os mecanismos moleculares acionados pela bactéria para suportar modificações nesses parâmetros. Assim sendo, a identificação e análise de genes expressos diferencialmente em resposta a mudanças de pH e temperatura é de grande interesse em pelo menos dois aspectos: (1) ampliação dos nossos conhecimentos sobre os mecanismos de estresse a pH e temperatura em *A. ferrooxidans* e, (2) otimização da utilização de linhagens de *A. ferrooxidans* na biolixiviação.

OBJETIVO

Objetivo:

O presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente em células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* submetidas a alterações no pH ideal de cultivo.

Estratégias:

- Curva de crescimento e respirometria de *A. ferrooxidans* na presença de diferentes pH;
- Isolamento e identificação, por meio de RAP-PCR, de cDNAs expressos diferencialmente em resposta a alterações no pH;
- Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados por meio de *slot blot* de DNA;
- Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais;
- Comparação das seqüências obtidas com seqüências disponíveis em bancos de dados.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem bacteriana

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

Preparo de meio de cultura

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

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

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

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

O pH do meio foi ajustado para 1,8 com ácido sulfúrico concentrado e a solução foi esterelizada por filtração em membrana (Millipore).

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

Experimentos de respirometria e curvas de crescimento de *A. ferrooxidans*

Para a determinação dos pHs nos quais foram realizados os experimentos de RAP-PCR, a linhagem de *A. ferrooxidans* LR foi submetida a experimentos de respirometria e curvas de crescimento nos pHs 1,2, 1,5, 1,8 (controle), 2,5 e 3,0. As suspensões celulares foram padronizadas, antes dos experimentos de respirometria, por meio da determinação da quantidade de proteína total (Bradford, 1976). Os experimentos foram realizados em um respirômetro Warburg em frascos de 25 mL. O compartimento principal de cada frasco tinha 0,3 mL de suspensão celular e 2,2 mL de meio nos pHs testados. Um total de 0,5 mL de substrato oxidável (120 mM de Fe^{2+}) foi colocado no braço lateral do frasco de Warburg e 0,1 mL de KOH 20% (p/v) em papel Whatman n° 1 foi colocado no recipiente central. O experimento foi conduzido a 30°C, em um agitador a 150 rpm. O consumo de oxigênio pela bactéria foi medido em intervalos de 15 min, por 150 min. A quantidade de oxigênio consumida foi calculada para cada experimento pela parte linear da curva. Após os experimentos de respirometria, a viabilidade celular foi confirmada por meio do plaqueamento das células.

Para a realização das curvas de crescimento, células da linhagem de *A. ferrooxidans* LR ($0,75 \times 10^9$ células/mL) foram inoculadas em 50 mL de meio T&K, nos pHs testados, em frascos de 250 mL. As culturas foram incubadas em um agitador a 300 rpm, nas temperaturas testadas. O crescimento bacteriano foi monitorado a cada 24 h, por meio da titulação de ferro com dicromato de potássio, até a oxidação total do ferro (Garcia *et al.*, 1995).

Tanto os experimentos respirométricos quanto as curvas de crescimento foram realizados em duplicata. Como controle, foram realizados experimentos de respirometria e curva de crescimento bacteriano em pH 1,8.

Obtenção de massa celular

Para obtenção de massa celular suficiente para o isolamento de RNA, a linhagem de *A. ferrooxidans* LR foi cultivada sob agitação (300 rpm) em 600 mL de meio T&K modificado nos pHs 1,2, 1,5, 1,8 (controle), 2,5 e 3,0. Após o crescimento, as culturas foram filtradas em papel de filtro comum para eliminar os precipitados formados durante o crescimento. A seguir, as células foram coletadas através de filtração em membrana Millipore (0,45 μm). As células foram lavadas por várias vezes com água destilada pH 1,8 e estocadas a -70°C.

Isolamento de RNA de *A. ferrooxidans*

O RNA de *A. ferrooxidans* foi isolado de células cultivadas nos diferentes pHs testados segundo método descrito por Winderickx & Castro (1994). Para isto, as células obtidas a partir de 600 mL de meio de cultura foram lavadas por seis vezes com água tratada com DEPC. As células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de extração: EDTA 1 mM; LiCl 0,1 M; Tris 0,1 M; iodoacetato de sódio 10 mM, pH 7,5. A seguir, foi adicionado 1 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) contendo 100 µL de SDS 10% e as amostras submetidas à agitação por 2 min em vortex. Após centrifugação por 3 min (8000 rpm, 4°C) a fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf limpo e extraída novamente com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v) acrescido de SDS 10%. A extração com fenol foi repetida até que a interface não fosse mais visível.

O RNA foi precipitado através da adição de 1/20 do volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA foi mantido a -20°C por pelo menos 2 h. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 3 min (8000 rpm, 4°C). O precipitado foi lavado com etanol 70% e deixado à temperatura ambiente para secar. O precipitado foi solubilizado em aproximadamente 100 µL de água e estocado a -70°C. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de 1% de agarose / 6% de formaldeído em tampão MOPS 1x (Tampão MOPS 10x: 41,8 g de MOPS; 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0; água q.s.p. 1000 mL; pH 7,0).

RAP-PCR

Os experimentos de RAP-PCR (*RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction*) foram realizados segundo metodologia descrita por Welsh *et al.* (1992) e Wong & McClelland (1994).

Tratamento do RNA com DNase

O RNA isolado de *A. ferrooxidans* cultivada em pH 1,2, 1,5, 1,8, 2,5 e 3,0 foi tratado com DNase para eliminar possíveis contaminações com DNA. Para isto, a 80 µL de RNA (aproximadamente 1 µg) foram adicionados 0,5 µL de inibidor de RNase (RNA guard, 37,8 U/µL – Amersham Biosciences), 24 µL de tampão para DNase (0,8 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,3; 1,34 mL de KCl 3 M; 0,12 mL de MgCl₂ 1 M; H₂O q.s.p. 24 mL) e 1,6 µL de DNase (10

U/ μ L – Amersham Biosciences). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 h. A seguir, foram acrescentados 200 μ L de água e foi efetuada uma extração com 225 μ L de fenol e 75 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). O RNA foi precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA foi mantido a -20°C por no mínimo 2 h. Após centrifugação e lavagem com etanol 70%, as amostras foram ressuspensas em aproximadamente 20 μ L de água.

Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit *ready-to-go* RT-PCR *beads* (Amersham Biosciences). As *beads* foram ressuspensas em água DEPC e, a seguir, foi adicionado 1 μ g de RNA e 1 μ M do *primer* arbitrário. O volume final da reação foi completado para 50 μ L e a reação foi incubada por 30 min a 42°C. A transcriptase reversa foi inativada através de incubação a 95°C por 5 min. O cDNA foi guardado a -20°C.

Dois μ L da reação da primeira fita foram utilizados na síntese da segunda fita de cDNA. Para isto, foram adicionados 4 μ L de *primer* arbitrário (10 μ M); 2 μ L de tampão da *Taq* polimerase 10x concentrado; 2 μ L de dNTP (20 μ M); 0,5 μ L de MgCl₂ (50 mM); 0,5 μ L de [α -³³P]dATP; 0,3 μ L de *Taq* polimerase (2,5 U/ μ L) (Amersham Biosciences); em um volume final de reação de 20 μ L. As amplificações foram realizadas em duplicata em um termociclador Perkin Elmer 2400. Foram realizados 40 ciclos de amplificação a baixa estrigência (94°C por 30 s, 40°C por 2 min, 72°C por 30 s).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de 5% de acrilamida e 50% de uréia. Para isto, 7 μ L de cada reação de PCR foram misturados com 5 μ L de formamida 80% contendo azul de bromofenol e xileno cianol. A seguir, as amostras foram denaturadas a 80°C por 4 min e 10 μ L foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 1320 V - 35 mA, até a frente de xileno cianol chegar ao final do gel. Após o processo de eletroforese, o gel foi seco a vácuo sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e o *fingerprinting* de RNA foi visualizado por exposição a filme de raio-X.

Isolamento e reamplificação das bandas diferenciais

As bandas diferenciais foram cortadas dos géis. Para isto, os géis foram alinhados com as autoradiografias e as bandas de interesse foram cortadas e colocadas em tubos eppendorf. O DNA foi eluído através de incubação por 20 min a 95°C em 200 µL de água Milli-Q. O DNA foi precipitado através da adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. O DNA foi mantido a -20°C durante a noite, centrifugado e ressuspendido em 10 µL de água.

Quatro µL do DNA eluído foram amplificados novamente em uma reação com volume final de 40 µL contendo: 4 µL de *primer* arbitrário (10 µM), 4 µL de tampão da *Taq* polimerase 10x concentrado, 0,8 µL de dNTP (1 mM), 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,5 µL de *Taq* polimerase (2,5 U/µL) (Amersham Biosciences). A amplificação foi realizada em termociclador Perkin Elmer 2400, através de 40 ciclos de amplificação a baixa estringência (94°C por 30 s, 40°C por 2 min, 72°C por 30 s). As amostras reamplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de 2% de agarose para confirmação do tamanho e quantificação através de comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi174/Hae$ III. As bandas que apresentaram contaminação com fragmentos de tamanho aproximado ao esperado foram purificadas com o kit *Concert Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL).

Slot blot de DNA

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

Transferência das bandas diferenciais para membranas de nylon

Dez ng de DNA de cada banda diferencial foram diluídos em TE (volume final de 200 µL) e desnaturados a 95°C por 10 min. A seguir, foram adicionados 200 µL de SSC 20x e as amostras foram transferidas, com o auxílio de um *slot blot* (Hybri-Slot, Gibco BRL), para membranas de *nylon* (Hybond-N, Amersham Biosciences) previamente umedecidas em SSC 10x. Após a transferência das amostras para a membrana, os *slots* foram lavados com 500 µL de SSC 10x. A

membrana foi seca à temperatura ambiente e o DNA fixado a 80°C por 2 h. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Hibridização das membranas

As membranas foram hibridizadas utilizando-se como sonda os cDNAs obtidos a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas nos diferentes pHs testados. As sondas foram quantificadas em gel de 2% de agarose, pela comparação com o padrão de massa e peso molecular $\phi\chi 174/Hae$ III. Aproximadamente 30 ng das sondas foram marcadas com [α - 32 P]dCTP utilizando-se o kit *Megaprime DNA labelling system* (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. Para remoção dos nucleotídeos não incorporados, as sondas foram purificadas através da utilização do kit Probe QuantTM G-50 (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42°C por 5 h em solução contendo: formamida deionizada 50%, SSC 5x, Denhardt's 10x, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, DNA de esperma de salmão denaturado 100 μ g/mL. As membranas foram hibridizadas em: formamida deionizada 50%, SSC 5x, Denhardt's 2x, Tris-HCl pH 7,5 20 mM, SDS 1%, sulfato de dextran 5%, DNA de esperma de salmão denaturado 100 μ g/mL e 10^7 - 10^8 cpm/mL da sonda denaturada. As membranas foram hibridizadas durante a noite a 42°C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas à temperatura ambiente por duas vezes, 15 min cada vez, em solução contendo SSC 2x e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas duas vezes, a 60°C, em solução contendo SSC 0,1x e SDS 0,1%. O período de cada lavagem foi de 30 min. As membranas foram expostas pelo tempo necessário a filmes de raio-X (Amersham Biosciences) a -70°C.

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

Os sinais de hibridização dos cDNAs foram quantificados com o programa *Digital Science 1D v. 2.0.3* da Kodak. A análise dos dados da quantificação foi baseada em Gill *et al.* (1999). Após a quantificação, fez-se a média da intensidade do sinal das repetições de cada amostra hibridizada e os dados foram normalizados. A seguir, foi feita uma análise de dispersão como

descrito por Paulino *et al.* (2002) e calculou-se o coeficiente de expressão (CE) (Paulino *et al.*, 2002).

Foram considerados diferenciais os cDNAs que apresentaram coeficiente de expressão acima ou abaixo de 1. Os cDNAs com CE acima de 1 representam genes induzidos na presença de pHs diferentes do ideal e os cDNAs com CE abaixo de 1 representam genes com expressão reprimida na presença de pHs diferentes de 1,8.

Clonagem e seqüenciamento das bandas diferenciais

Dentre as bandas cuja expressão diferencial foi confirmada, foram selecionadas para clonagem e seqüenciamento aquelas que apresentaram os maiores (10 bandas) e os menores (10 bandas) coeficientes de expressão (CE). As amostras foram amplificadas e clonadas no vetor pGEM-T *Easy* (Promega), seguindo-se as especificações do fabricante. Os cDNAs foram seqüenciados em um seqüenciador automático ABI Prism 377 (Perkin Elmer). As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em banco de dados.

Técnicas padrões de biologia molecular

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH no consumo de oxigênio e oxidação de ferro pela linhagem de *A. ferrooxidans* LR

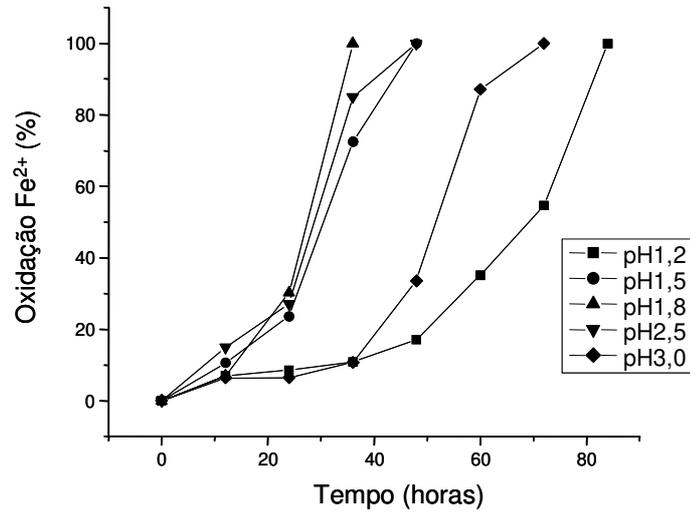
Para determinar os pHs utilizados nos experimentos de RAP-PCR foram realizados experimentos de respirometria e curvas de crescimento na presença de quatro pHs (1,2, 1,5, 2,5 e 3,0). Como controle, foi utilizada bactéria cultivada em pH ideal (pH 1,8). A figura 1 mostra os resultados obtidos com estes experimentos.

Como mostra as curvas de crescimento (Figura 1A), não foi observada inibição total do crescimento da bactéria em nenhum dos quatro pHs testados. Em pHs mais extremos, 1,2 e 3,0, observou-se um aumento do tempo requerido para a oxidação total de ferro. Em pH 1,5 e 2,5, a oxidação total do ferro foi observada em 2 dias (Figura 1A).

O efeito dos diferentes pHs na velocidade de consumo de oxigênio pela bactéria foi monitorado através de respirometria (Figura 1B). Não foi verificada inibição total no consumo de oxigênio nos pHs testados. Foi observada uma inibição mais acentuada na velocidade de consumo de oxigênio nos pHs 1,2, 2,5 e 3,0 (Figura 1B). A velocidade de consumo de oxigênio nestes pHs foi de aproximadamente 0,46 $\mu\text{L}/\text{min}$, ou seja uma inibição de 42,5%, quando comparada com o controle (pH 1,8). Em pH 1,5 houve uma inibição menos acentuada, 0,60 $\mu\text{L}/\text{min}$, ou seja 25%. Em pH 1,8 (pH ideal de cultivo) a velocidade de consumo de oxigênio foi de 0,8 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figura 1B).

Esses experimentos demonstraram que o maior efeito inibitório, no crescimento e consumo de oxigênio, foi nos pHs 1,2 e 3,0, enquanto que nos pHs 1,5 e 2,5 os efeitos foram menos drásticos, quando comparados com a condição controle (pH 1,8).

A



B

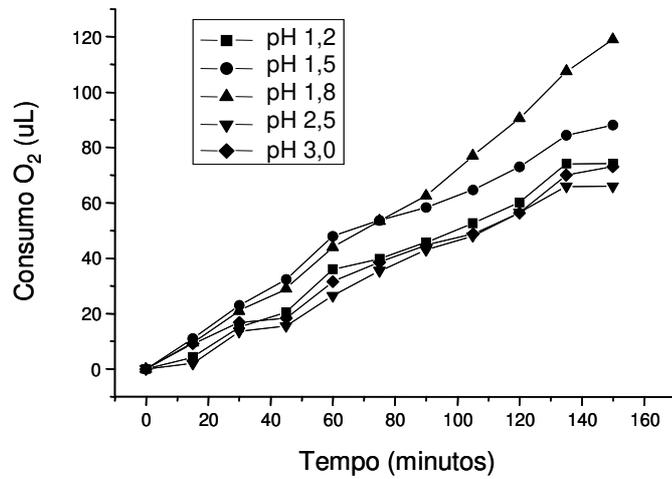


Figura 1. Efeito do pH (1,8 - controle, 1,2, 1,5 2,5 e 3,0) na linhagem de *A. ferrooxidans* LR. (A) Curvas de crescimento e (B) Consumo de oxigênio (respirometria).

Isolamento de cDNAs expressos diferencialmente através de RAP-PCR

Os métodos de *fingerprinting* de RNA, como o RAP-PCR e *display* diferencial de mRNA, vêm sendo utilizados no isolamento de genes expressos diferencialmente em diversos organismos (Welsh *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 1993; Wong & McClelland, 1994; McClelland *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1998; Shepard & Gilmore, 1999, Collin & Olsén, 2001, Paulino *et al.*, 2002, Sharma *et al.*, 2004; Demanou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, para a realização dos experimentos de RAP-PCR foram sintetizados cDNAs a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,5, 2,5 e 3,0 e em pH 1,8 (controle). Foram realizados experimentos de RAP-PCR em pH 1,2, 1,8 e 3,0. Os *primers* arbitrários utilizados nos experimentos e o número de cDNAs isolados com cada *primer* são mostrados na Tabela 1.

Como pode ser visto na Tabela 1, um total de 71 cDNAs diferenciais foram isolados, sendo 41 no controle (pH 1,8), 22 em pH 1,2 e oito em pH 3,0 (Tabela 1, Figuras 2 e 3). Os *primers* que permitiram o isolamento de um maior número de cDNAs diferenciais foram: OPF01 (19 cDNAs diferenciais, sendo três em pH 1,2, 15 em pH 1,8, e um em pH 3,0) e OPF04 (20 cDNAs, sendo 11 em pH 1,2 e nove em pH 1,8). Alguns destes cDNAs estão indicados por setas nas Figuras 2 e 3.

Tabela 1. Número de cDNAs diferenciais isolados nos experimentos de RAP-PCR a partir de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0.

<i>Primer</i>	Seqüências (5' – 3')	1,2 ¹	pH 1,8 ²	3,0 ³	Total
OPF01	ACGGATCCTG	3	15	1	19
OPF03	CCTGATCACC	2	8	5	15
OPF04	GGTGATCAGG	11	9	0	20
OPF08	GGGATATCGG	6	9	2	17
Total		22	41	8	71

(1) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 1,2, (2) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 1,8 e (3) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 3,0.

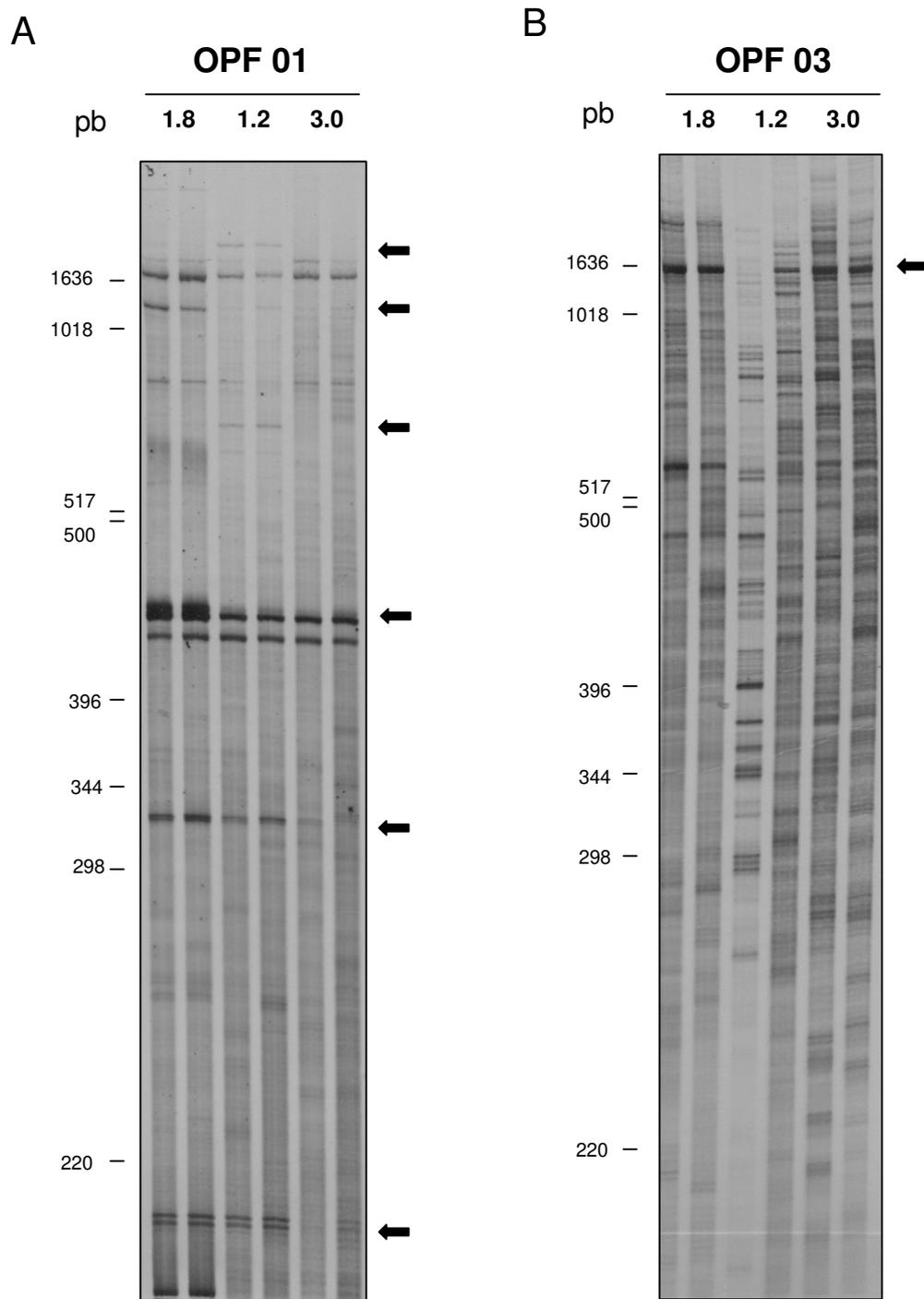


Figura 2. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0. Em (A) foi utilizado o *primer* arbitrário OPF01 e em (B) OPF03. Alguns cDNAs diferenciais estão indicados por seta.

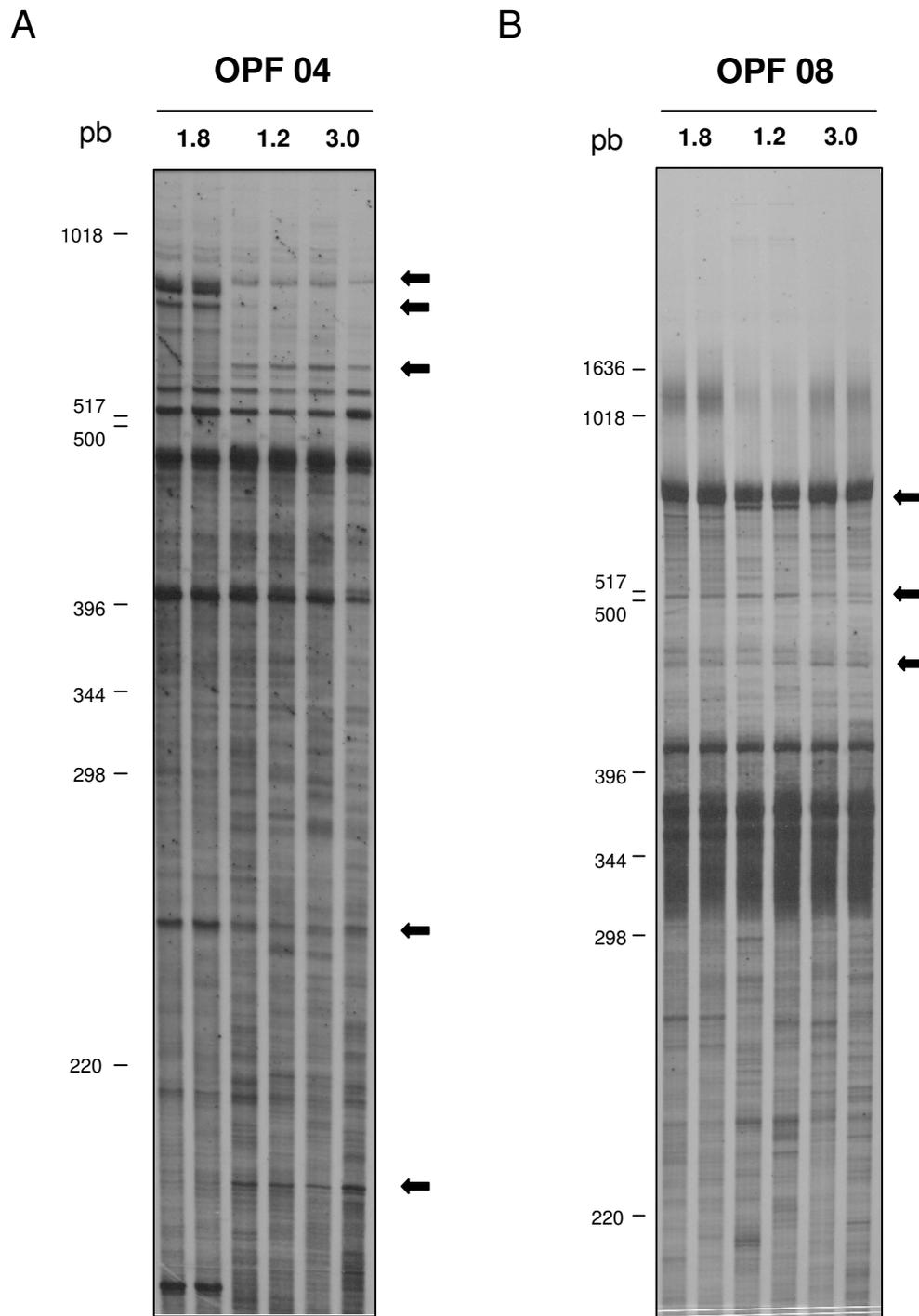


Figura 3. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0. Em (A) foi utilizado o *primer* arbitrário OPF04 e em (B) OPF08. Alguns cDNAs diferenciais estão indicados por seta.

A seguir, foram realizados experimentos de RAP-PCR utilizando RNA de células cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5. Estas alterações de pH são mais brandas, quando comparadas com o pH ideal de cultivo (pH 1,8), do que as utilizadas anteriormente (1,2 e 3,0). Os *primers* arbitrários utilizados nos experimentos e o número de cDNAs isolados com cada *primer* estão mostrados na Tabela 2. Um total de 136 cDNAs diferenciais foram isolados, sendo 70 no controle (pH 1,8), 22 em pH 1,5 e 44 em pH 2,5 (Tabela 2, Figuras 4 e 5). Os *primers* que permitiram o isolamento de um maior número de cDNAs diferenciais foram: OPJ14 (42 cDNAs diferenciais, sendo 6 em pH 1,5, 24 em pH 1,8 e 12 em pH 2,5) e OPF04 (36 cDNAs diferenciais, sendo 5 em pH 1,5, 18 em pH 1,8 e 13 em pH 2,5). Alguns destes cDNAs estão indicados por setas nas Figuras 4 e 5.

Tabela 2. Número de cDNAs diferenciais isolados nos experimentos de RAP-PCR a partir de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5.

<i>Primer</i>	Seqüências (5' – 3')	1,5 ¹	pH 1,8 ²	2,5 ³	Total
OPF04	GGTGATCAGG	5	18	13	36
OPF08	GGGATATCGG	3	17	10	30
OPJ04	CCGAACACGG	8	11	9	28
OPJ14	CACCCGGATG	6	24	12	42
Total		22	70	44	136

(1) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 1,5, (2) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 1,8 e (3) cDNAs com expressão mais acentuada em pH 2,5.

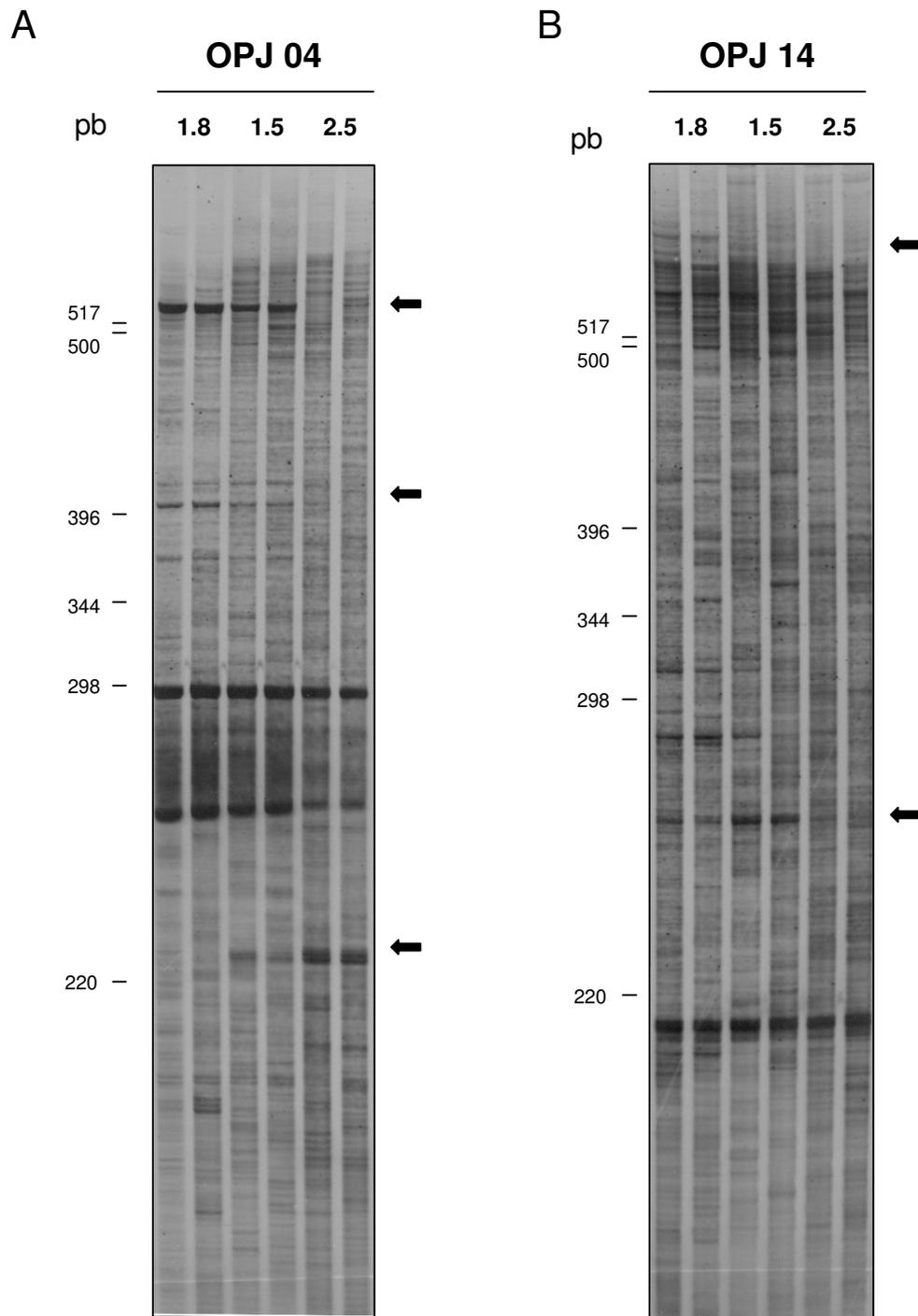


Figura 4. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5. Em (A) foi utilizado o *primer* arbitrário OPJ04 e em (B) OPJ14. Alguns cDNAs diferenciais estão indicados por seta.

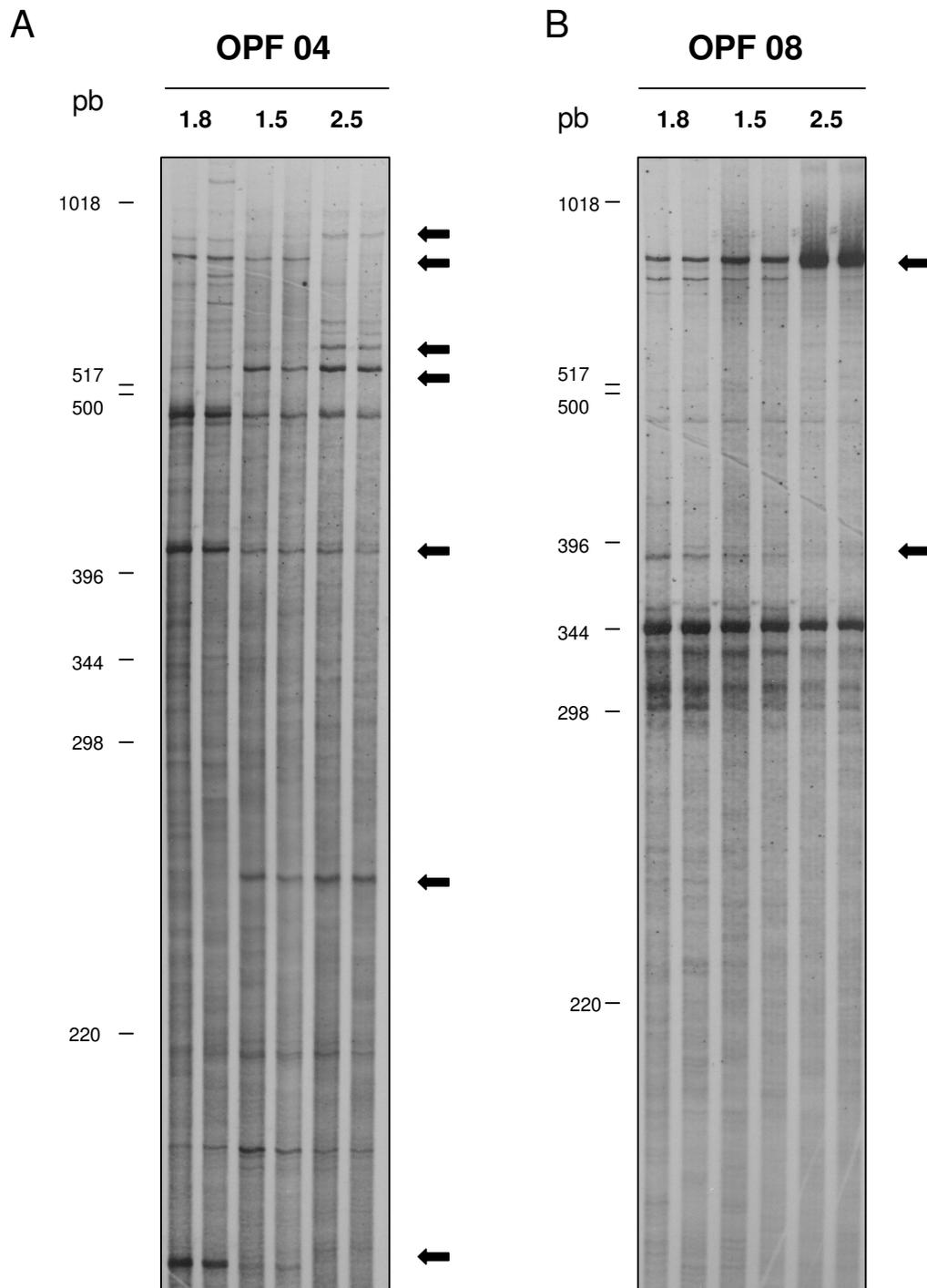


Figura 5. RAP-PCR a partir de RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5. Em (A) foi utilizado o *primer* arbitrário OPF04 e em (B) OPF08. Alguns cDNAs diferenciais estão indicados por seta.

Confirmação da expressão diferencial através de *slot blot* de DNA

A ocorrência de falsos positivos em experimentos de RAP-PCR e *display* diferencial de mRNA está documentada na literatura (Liang *et al.*, 1993; Callard *et al.*, 1994; Liang & Pardee, 1992, 1995; Fleming *et al.*, 1998; Nagel *et al.*, 2001; Paulino *et al.*, 2002). Assim sendo, a expressão diferencial das bandas isoladas por RAP-PCR foi confirmada através de *slot blot* de DNA. A utilização de *slot blot* ou *dot blot* na confirmação da expressão diferencial de genes vem sendo amplamente utilizada (Mou *et al.*, 1994; Corton & Gustafsson, 1997, Gill *et al.*, 1999, Leung *et al.*, 2000, Paulino *et al.*, 2002). Estas técnicas permitem a confirmação da expressão diferencial de um grande número de cDNAs de uma só vez (Xu *et al.*, 1997).

Para a confirmação da expressão diferencial, as bandas isoladas dos géis de RAP-PCR foram amplificadas, quantificadas e 10 ng de DNA foram transferidos para membranas de nylon e hibridizados com sondas de cDNAs, obtidos a partir de RNA de células crescidas nos diferentes pHs testados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As Figuras de 6 a 13 mostram os resultados das hibridizações das membranas e as análises realizadas para a confirmação da expressão diferencial dos cDNAs.

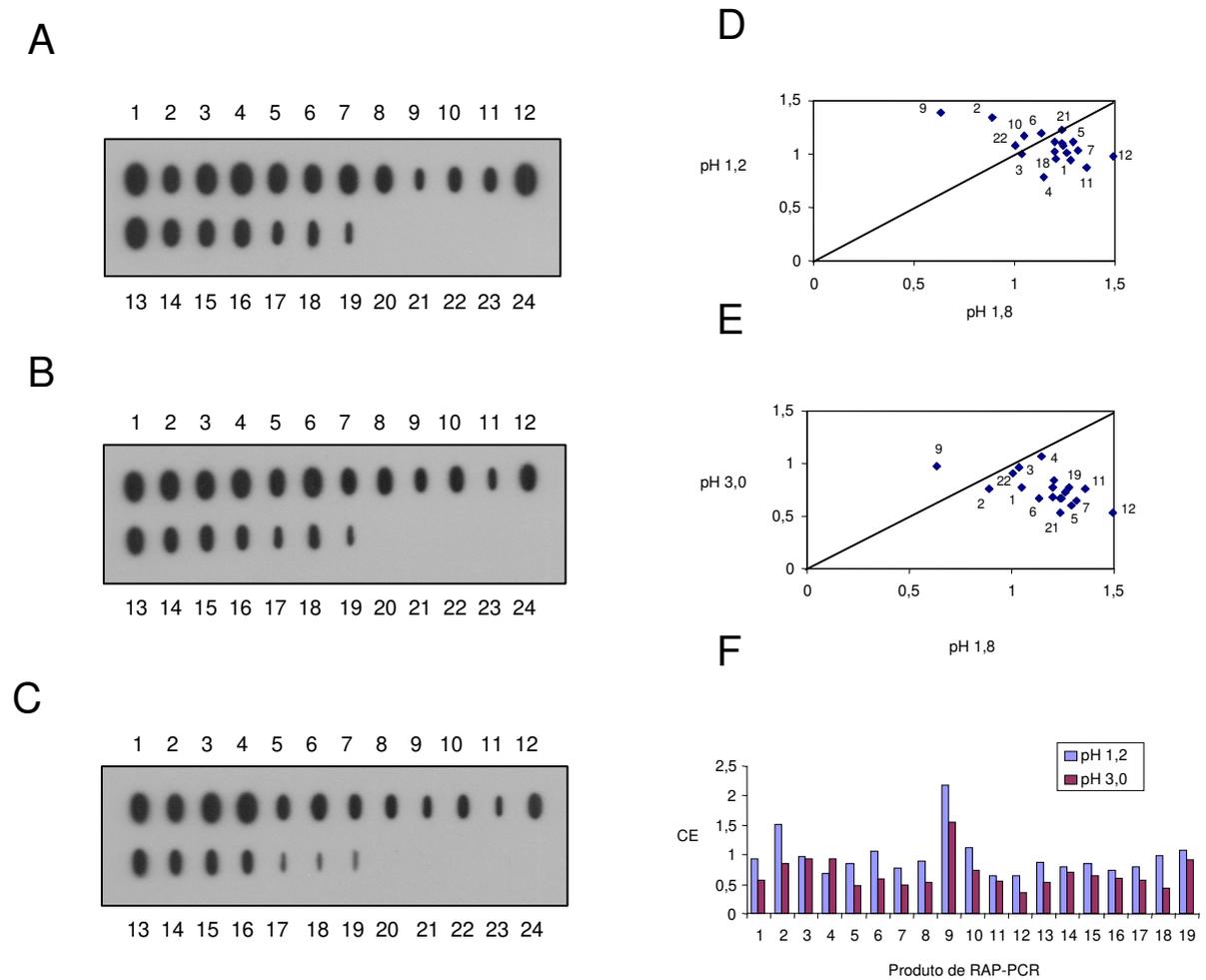


Figura 6. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPF01. cDNAs isolados em pH 1,8 (1, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, e 19), pH 1,2 (2, 9 e 10) e pH 3,0 (6). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,2 e (C) pH 3,0. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizadas acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 3,0 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

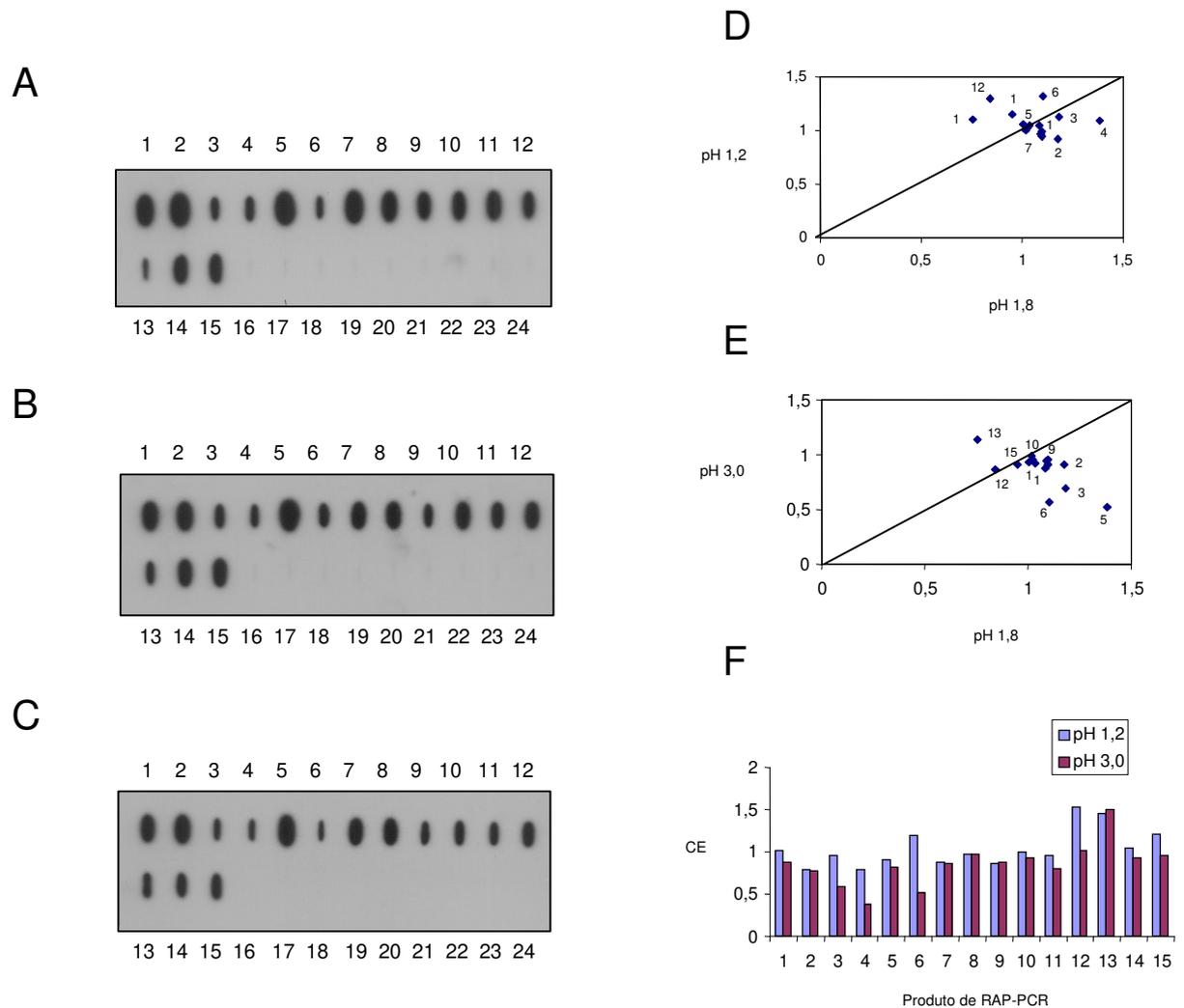


Figura 7. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isoladas com o *primer* OPF03. cDNAs isolados em pH 1,8 (1, 2, 4, 5, 10, 11, 14 e 15), pH 1,2 (12 e 13) e pH 3,0 (3, 6, 7, 8 e 9). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,2 e (C) pH 3,0. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizadas acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 3,0 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D) e (E).

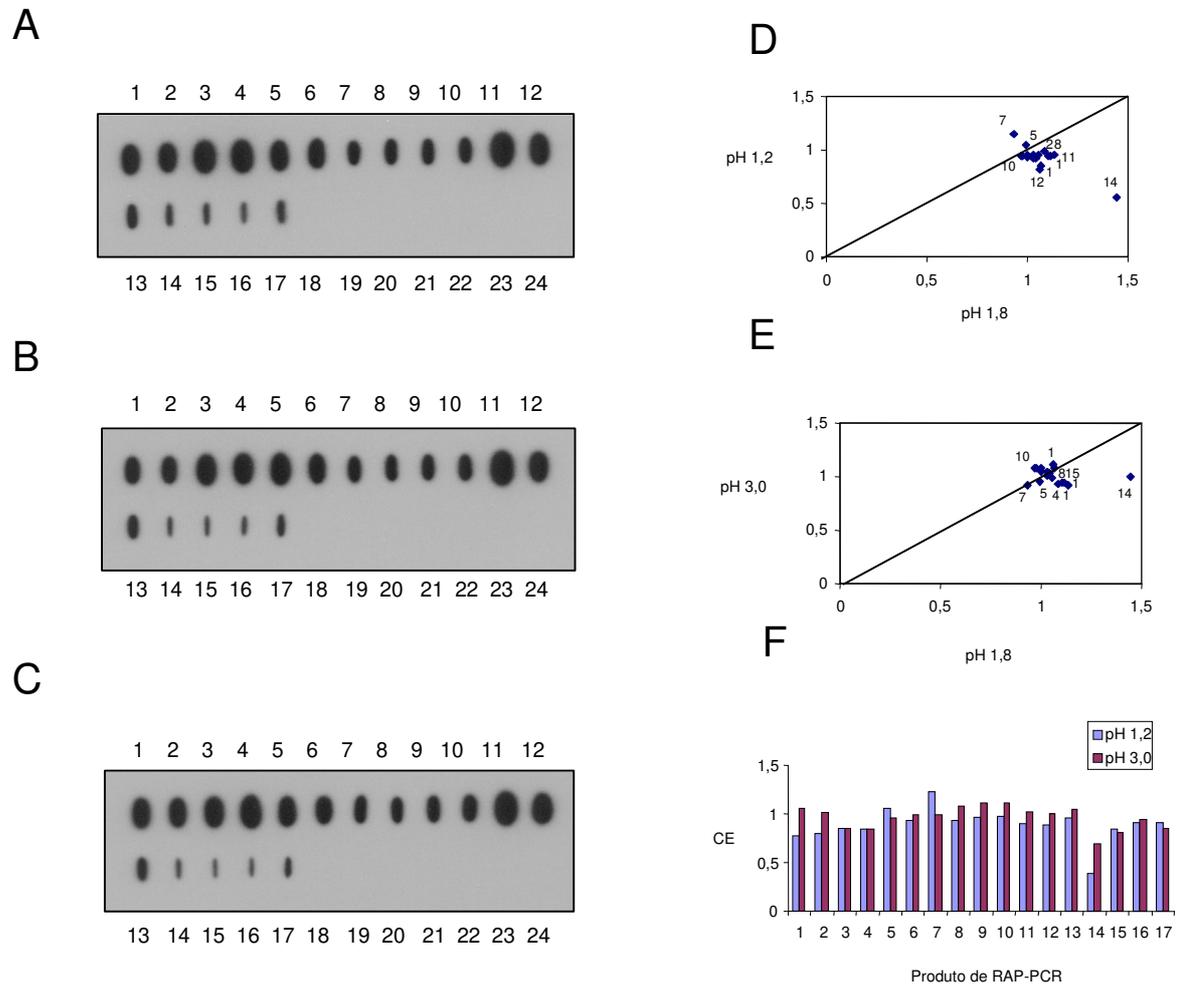


Figura 8. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isoladas com o *primer* OPF08. cDNAs isolados em pH 1,8 (1, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16 e 17), pH 1,2 (2, 7, 8, 11, 12 e 13) e pH 3,0 (9 e 10). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,2 e (C) pH 3,0. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizadas acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 3,0 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

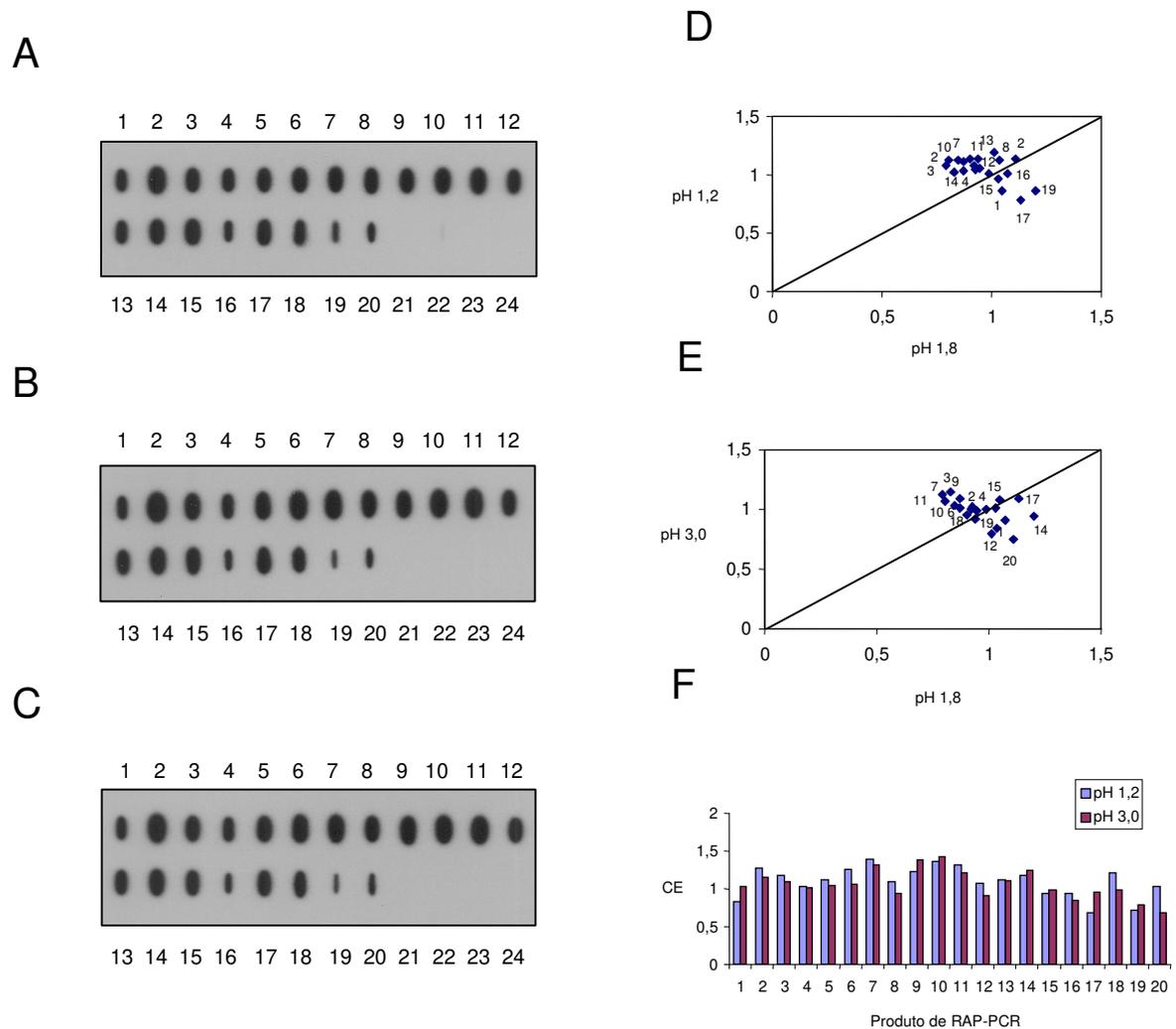


Figura 9. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPF04. cDNAs isolados em pH 1,8 (1, 4, 5, 6, 8, 9, 16, 19 e 20) e pH 1,2 (2, 3, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,2 e (C) pH 3,0. (D e E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizados acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e em pH 3,0 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

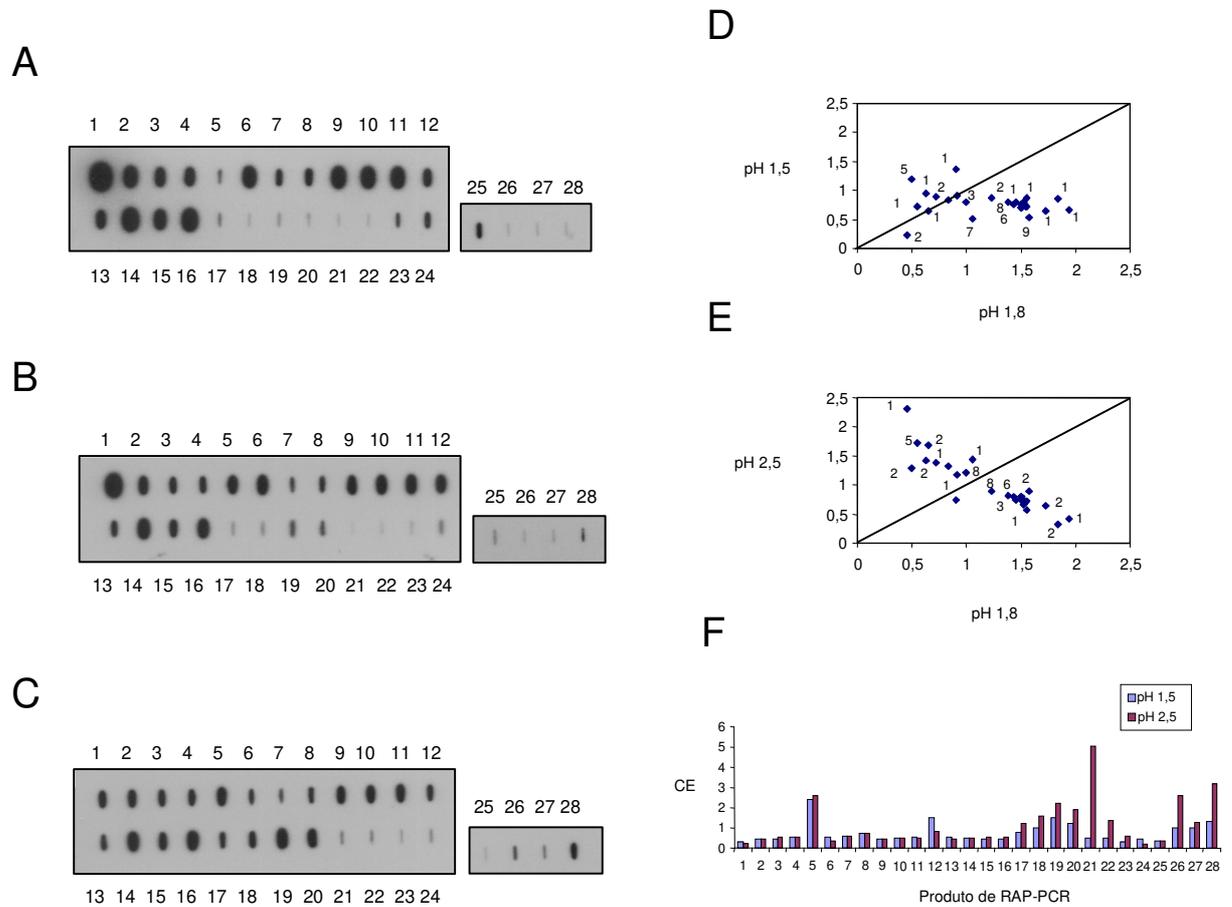


Figura 10. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPJ04. cDNAs isolados em pH 1,8 (1, 2, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15 e 16), pH 1,5 (3, 4, 5, 8, 13, 23, 24 e 25) e pH 2,5 (17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27 e 28). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,5 e (C) pH 2,5. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizados acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 2,5 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

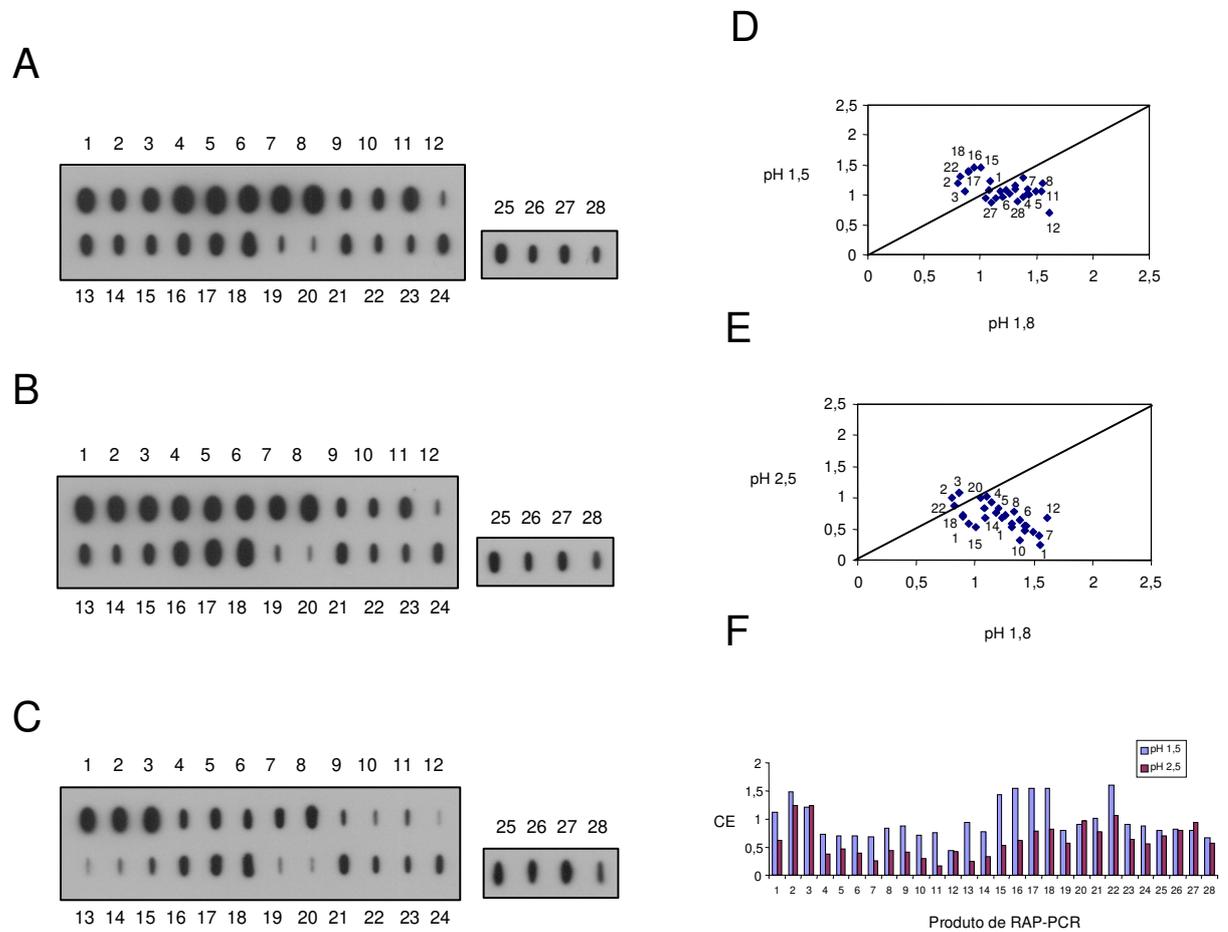


Figura 11. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPJ14. cDNAs isolados em pH 1,8 (4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 24 e 25), pH 1,5 (9, 14, 15, 16, 17 e 18) e pH 2,5 (1, 2, 3, 12, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 27 e 28). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,5 e (C) pH 2,5. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizados acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 2,5 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

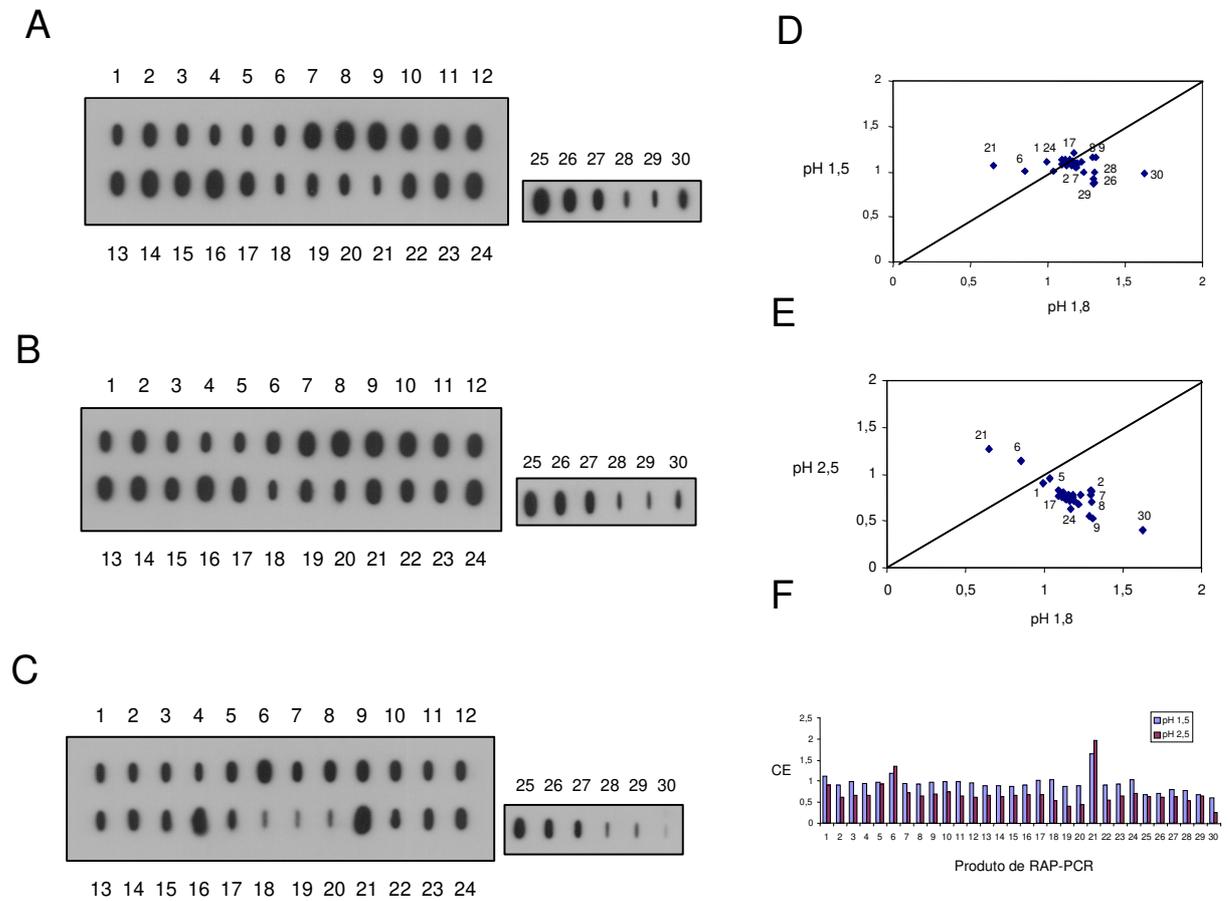


Figura 12. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPF04. cDNAs isolados em pH 1,8 (2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20 e 30), pH 1,5 (22, 24, 25, 26 e 27) e pH 2,5 (1, 3, 4, 5, 6, 18, 21, 23, 28 e 29). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,5 e (C) pH 2,5. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizados acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 2,5 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D e E).

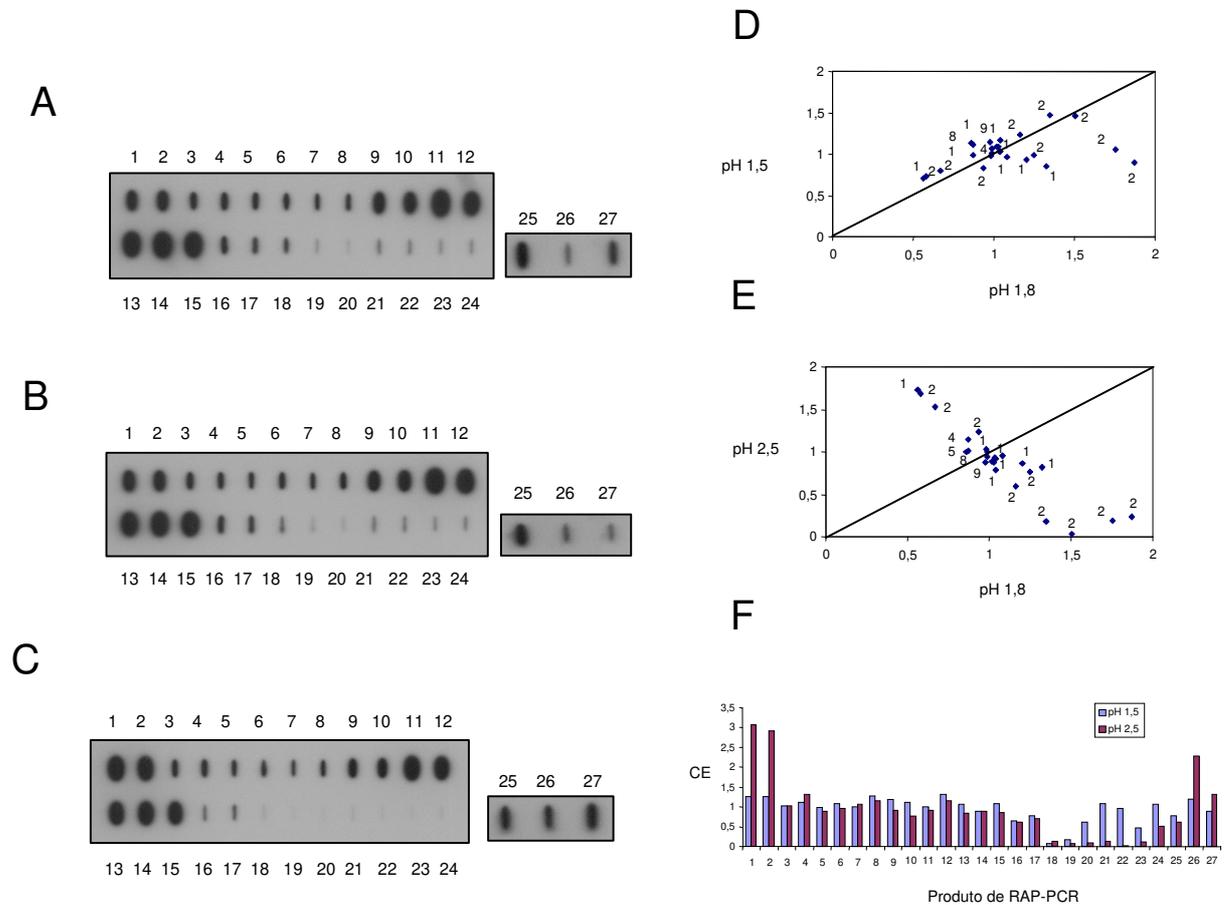


Figura 13. Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados com o *primer* OPF08. cDNAs isolados em pH 1,8 (9, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25), pH 1,5 (10, 12 e 13) e pH 2,5 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 26, e 27). (A) Amostras hibridizadas com sonda de cDNAs obtidos em pH 1,8, (B) pH 1,5 e (C) pH 2,5. (D) e (E) Análise de dispersão indicando em qual tratamento ocorre maior expressão dos cDNAs. Alguns destes cDNAs são mostrados na figura (D) e (E). cDNAs localizados acima da reta $x=y$ possuem expressão mais acentuada em pH 1,2 (D) e 2,5 (E). (F) Coeficiente de expressão dos cDNAs. O coeficiente de expressão (CE) foi calculado a partir dos dados mostrados em (D) e (E).

Análise da expressão diferencial em pH 1,2 e 3,0

De um total de 71 cDNAs isolados com os *primers* OPF01, OPF03, OPF08 e OPF04, nos experimentos de RAP-PCR com RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,2, 1,8 e 3,0, 41 (58%) tiveram a expressão diferencial confirmada, sendo 25 em pH 1,8, 14 em pH 1,2 e dois em pH 3,0 (Tabela 3, Figuras 6 a 9).

Tabela 3. Número de cDNAs com expressão diferencial confirmada nos experimentos de *slot blot* de DNA para *A. ferrooxidans* cultivada em diferentes pHs.

<i>Primer</i>	Total de cDNAs analisados	Total de cDNAs confirmados			Total
		pH 1,2	pH 1,8	pH 3,0	
OPF01	19	3	13	0	16
OPF03	15	2	5	0	7
OPF08	17	1	5	2	8
OPF04	20	8	2	0	10
Total	71	14	25	2	41

Como pode ser observado na Tabela 3, os *primers* que tiveram o maior número de cDNAs com expressão diferencial confirmada foram: OPF01, de um total de 19 cDNAs analisados 16 (84%) tiveram a expressão diferencial confirmada, e OPF04, de um total de 20 cDNAs analisados 10 (50%) tiveram a expressão diferencial confirmada.

Os cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada foram analisados com os programas *Gene Cluster* e *TreeView v 1,45* (<http://rana.stanford.edu/software>) (Figura 14). A análise mostra a expressão de cada cDNA nos diferentes pHs testados. Na Figura 14, a expressão mais acentuada é mostrada em vermelho e ausência de expressão em amarelo. Expressão intermediária é mostrada por uma combinação das duas cores.

A



B

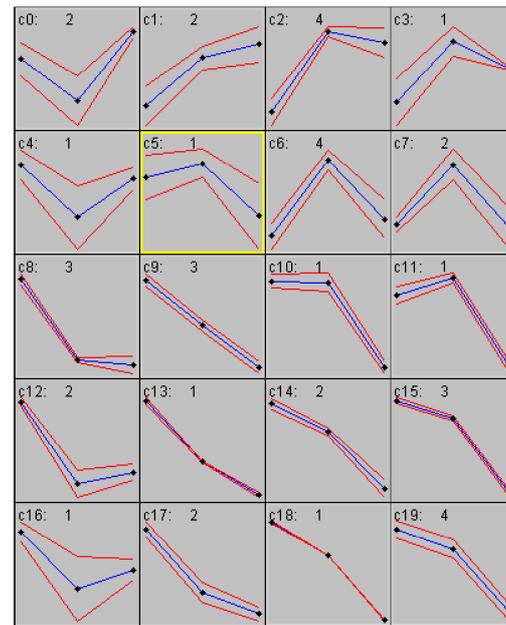


Figura 14. Análise do padrão de expressão, em pH 1,2, 1,8 e 3,0, dos cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada. Cada linha representa um cDNA e as colunas os pHs. O vermelho indica expressão mais acentuada e o amarelo indica ausência de expressão. Expressões intermediárias são indicadas através da combinação dessas duas cores.

Análise da expressão diferencial em pH 1,5 e 2,5

De um total de 113 cDNAs isolados com os *primers* OPJ04, OPJ14, OPF04 e OPF08, nos experimentos de RAP-PCR com RNA isolado de células de *A. ferrooxidans* cultivadas em pH 1,5, 1,8 e 2,5, 74 (65%) tiveram a expressão diferencial confirmada, sendo 48 em pH 1,8, seis em pH 1,5 e 20 em pH 2,5 (Tabela 4, Figuras 10 a 13).

Tabela 4. Número de cDNAs com expressão diferencial confirmada nos experimentos de *slot blot* de DNA para *A. ferrooxidans* cultivada em diferentes pHs.

<i>Primer</i>	Total de cDNAs analisados	Total de cDNAs confirmados			Total
		pH 1,5	pH 1,8	pH 2,5	
OPJ04	28	0	9	9	18
OPF08	27	2	14	6	22
OPF04	30	0	15	2	17
OPJ14	28	4	10	3	17
Total	113	6	48	20	74

Como pode ser observado na Tabela 4, o *primer* que permitiu a confirmação de um maior número de cDNAs diferenciais foi o OPF08. De um total de 27 cDNAs isolados com este *primer*, 22 (81%) tiveram a expressão diferencial confirmada. Os maiores CEs (acima de 1,5) foram observados para os cDNAs isolados com os *primers* OPJ04 e OPF08 (Figuras 10 e 13, respectivamente).

Os cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada foram analisados com os programas *Gene Cluster* e *TreeView v 1,45* (<http://rana.stanford.edu/software>) (Figura 15). A análise mostra a expressão de cada cDNA nos diferentes pHs testados. Na Figura 15, a expressão mais acentuada é mostrada em vermelho e ausência de expressão em amarelo. Expressão intermediária é mostrada por uma combinação das duas cores.

A



B

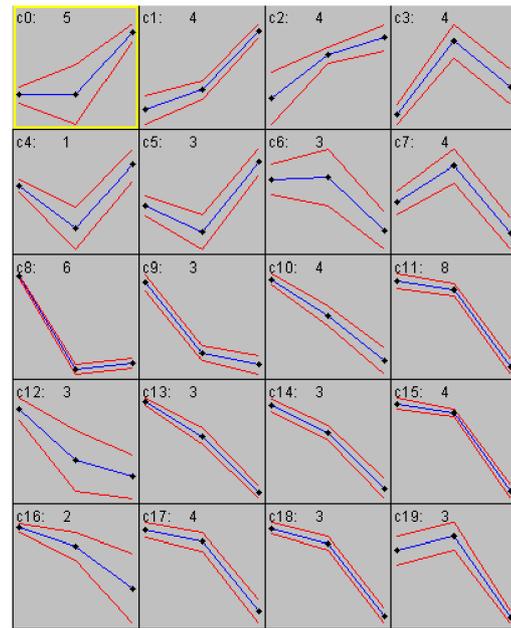


Figura 15. Análise do padrão de expressão, em pH 1,5, 1,8 e 2,5, dos cDNAs que tiveram a expressão diferencial confirmada. Cada linha representa um cDNA e as colunas os pHs. O vermelho indica expressão mais acentuada e o amarelo indica ausência de expressão. Expressões intermediárias são indicadas através da combinação dessas duas cores.

Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs com expressão induzida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8

Entre os cDNAs com expressão induzida por pH foram selecionados 21, que apresentaram os maiores CEs (acima de 1,0), para clonagem e seqüenciamento. Entre os cDNAs selecionados estavam sete induzidos em pH 1,2, quatro em pH 1,5, nove em pH 2,5 e um em pH 3,0 (Tabela 5). Os cDNAs foram clonados em pGEM-T *easy* (Promega) e seqüenciados. Alguns cDNAs apresentaram seqüências repetidas. São eles: 15J14, 16J14, 17J14 e 18J14; 20J04 e 21J04; 3F08 e 4F08. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 6. Como mostra a Tabela 6, os cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados foram: 2F01, 3F08/4F08, 8F04 e 27F04.

Análise dos cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 2F01 apresentou similaridade com uma proteína *small heat shock* - IbpA de *Geobacter metallireducens* (Figura 16).

```

2F01: 934 MALMKWEP---LREIDDMFDRYVMMSGWPSRRQELITAGDWSRVDISETDNRV 782
      MA++K+ P LR + + +R ++ M W E + G W P VDI E +N V
IbpA: 1 MAIVKYTPFGDLRNLQEQMNR-LLDMAWSRESGEELREGVWQPPVDIFEDENGV 53

```

Figura 16. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 2F01 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína *small heat shock* – IbpA (acesso ZP_00082416.1).

Tabela 5. cDNAs com coeficiente de expressão acima de um selecionados para clonagem e seqüenciamento.

cDNA	<i>Primer</i>	pH	Tamanho (pb)	Coeficiente de Expressão (CE)
2F01	OPF-01	1,2	985	1,51
9F01	OPF-01	1,2	521	2,17
12F03	OPF-03	1,2	405	1,53
13F03	OPF-03	1,2	379	1,46
8F04	OPF-04	1,2	641	1,39
11F04	OPF-04	1,2	488	1,32
12F04	OPF-04	1,2	371	1,36
15J14	OPJ14	1,5	258	1,44
16J14	OPJ14	1,5	258	1,54
17J14	OPJ14	1,5	258	1,55
18J14	OPJ14	1,5	258	1,55
18J04	OPJ04	2,5	227	1,60
19J04	OPJ04	2,5	226	2,23
20J04	OPJ04	2,5	223	1,92
21J04	OPJ04	2,5	223	5,02
26J04	OPJ04	2,5	187	2,59
28J04	OPJ04	2,5	166	3,16
27F04	OPF04	2,5	257	1,96
3F08	OPF08	2,5	643	3,06
4F08	OPF08	2,5	643	2,90
12F08	OPF08	3,0	512	1,17

Tabela 6. Análise das seqüências de cDNAs de *A. ferrooxidans* com expressão induzida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8.

cDNA	Similaridade	% similaridade	% identidade	Score (bits) E-value
2F01	lbpA, <i>small heat shock</i> (ZP_00082416.1)	53%	35%	4e ⁻⁰⁴
9F01	nenhuma	-	-	-
12F03	nenhuma	-	-	-
13F03	nenhuma	-	-	-
8F04	L-2-haloalkanoic acid <i>dehalogenase</i> (NP_691853.1)	61%	40%	2e ⁻¹²
11F04	nenhuma	-	-	-
12F04	nenhuma	-	-	-
15J14	nenhuma	-	-	-
16J14	nenhuma	-	-	-
17J14	nenhuma	-	-	-
18J14	nenhuma	-	-	-
18J04	nenhuma	-	-	-
19J04	nenhuma	-	-	-
20J04	nenhuma	-	-	-
21J04	nenhuma	-	-	-
26J04	nenhuma	-	-	-
28J04	nenhuma	-	-	-
27F04	Proteína hipotética (ZP_00050869.1)	55%	33%	2e ⁻⁰⁵
3F08/4F08	Proteína ResB (AAC68692.1)	48%	40%	7e ⁻¹⁵
12F08	nenhuma	-	-	-

As proteínas *small heat shock* (sHsps) são chaperonas moleculares envolvidas na renaturação de proteínas e na prevenção da formação de agregados. As sHsps IbpA e IbpB foram identificadas por Allen *et al.* (1992) em *Escherichia coli*. Kitagawa *et al.* (2000) observaram que linhagens de *E. coli* que produziam grandes quantidades destas proteínas apresentavam resistência mais elevada ao calor e ao estresse oxidativo. O aumento da expressão do cDNA 2F01 na presença de pH 1,2 sugere que proteínas *small heat shock* podem ajudar a célula tolerar pHs diferentes do ideal de cultivo.

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 8F04 apresentou similaridade com uma L-2-haloalkanoic acid dehalogenase de *Oceanobacillus iheyensis* (Figura 17).

```

8F04: 590 FALPEMRALGIKKYFDVRVISGDYGYRKPDPRLFTTAAEQLEVAPHETIYVGNDMYRDIY 411
      F + ++ALGI++YFDV ++S  G +KPDP +F  A E+L+V P ++I+VG+  D+
L-2  : 121 FQMDNIKALGIERYFDVILVSEWEGIKKPDPEIFKKALEKLDVPEQSIFVGDHPKNDVK 180

8F04: 410 GAQQAGMKTIFVDSNQGSKSYNDVAPDYARDL 312
      AQ  GMK I+   Q   +NDV D+  DL
L-2  : 181 AAQSIGMKGIWKKDLQ----WNDVEADFTVNDL 209

```

Figura 17. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 8F04 e a seqüência de aminoácidos de uma L-2 haloalkanoic acid dehalogenase (acesso NP_691853.1).

Os compostos halogenados constituem uma classe importante de produtos químicos que podem ser degradados por microrganismos (Janssen *et al.*, 2001). Por volta de 1968, considerava-se que compostos orgânicos que apresentavam ligação covalente com halogêneos eram infreqüentes em organismos vivos (Fowden, 1968). Contudo, compostos organo-halogenados têm sido encontrados em plantas, fungos, bactérias, insetos, animais e humanos (Gribble, 1996a,b, 1998, 1999, 2000; Winterton, 2000). Em bactérias, foram encontrados metabólicos organo-halogenados em mais de 50 espécies de *Streptomyces* (Gribble, 2003). A bactéria *Amycolatopsis orientalis*, por exemplo, produz o antibiótico vancomicina que é usado no tratamento de infecções que resistem a penicilina (Williams, 1996; Williams & Bardsley, 1999). A enzima L-2-haloalkanoic acid dehalogenase está envolvida na hidrólise de compostos organo-halogenados. O aumento da expressão do cDNA 8F04 em *A. ferrooxidans* na presença de pH 1,2 pode indicar a

necessidade de uma maior quantidade da enzima *L-2-haloalkanoic acid dehalogenase* para hidrólise de metabólicos organo-halogenados.

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 27F04 apresentou similaridade com uma proteína hipotética de *Magnetospirillum magnetotasticum* (Figura 18).

```

27F04: 252 ISNPG---NKSASADISNGQVI IQKNSGLVQFYLQAGAYNVMSLGSNFVSTGTFTQNTFG 82
          I +PG  ++    D +N Q  IQK  G +QFY+ AG Y++ +LG   S+   T + FG
Sbjct: 107 ILSPGAEQDRFGRVDFTNLQGWIQKADGPLQFYVHAGLYSIPALGLPLYSSFEQTDLSFG 166

27F04: 81  ALPVGYLEIAPTDFNFVQIGKLPILI 4
          +PV + +    D +++Q G++ T I
Sbjct: 167 PVPVAFGKWQINDEWSIQAGRMFTNI 192

```

Figura 18. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 27F04 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína hipotética de *Magnetospirillum magnetotasticum* (acesso ZP_00050869.1).

A seqüência deduzida de aminoácidos dos cDNAs 3F08/4F08 apresentaram similaridade com a proteína ResB de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Figura 19).

```

3F08/4F08: 266 SVIGTVLNQQQPYEDYVLKFGSLWL-LFS*RGLTMLPD*LYLRCWFLGCV-----YTC 421
          SVIGTVLNQQQPYEDYVLKFGS W +F  GL   +Y  W+L          TC
ResB:      15  SVIGTVLNQQQPYEDYVLKFGSFWFAVFRDVGLYN----VYRTNWLAI VGLFLVLTSTC 70

3F08/4F08: 422 LIEYT----AQLRNAD-PIAGGWTSQDGIN--ESFA*ISEDMGSRSGVFTTPGRDECARL 580
          LI  T      ++R  D  +  G+  +  +N  E  F+  ++   S  V   GR   +L
ResB:      71  LIRNTPRMLREMREPD LAVGSGYDPRGMVNNTMFSPLAIQSASNMVVAVMRGRGYRPKL 130

3F08/4F08: 581 -----ILTHAIIIVFCAAALYNADIP 643
          ILTHAIIIVFCAAALYNADIP
ResB:      131 HESNGGVVVTGRKGRYNRLGYILTHAIIIVFCAAALYNADIP 172

```

Figura 19. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 3F08/4F08 e a seqüência de aminoácidos da proteína Res B de *A. ferrooxidans* (acesso AAC68692.1).

ResB e ResC são proteínas de membrana que estão envolvidas na maturação do citocromo c. Os citocromos c desempenham papéis importantes em vários processos celulares, como por exemplo, a transferência de elétrons durante a respiração. Em *A. ferrooxidans* o citocromo c está envolvido na via de oxidação do FeII (Cabrejos *et al.*, 1999). Assim sendo, o aumento da expressão dos cDNAs 3F08/4F08 em *A. ferrooxidans* LR na presença de pH 2,5 pode estar relacionado com a oxidação de FeII.

Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs com expressão reprimida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8

Entre os cDNAs com expressão reprimida por alterações no pH foram selecionados 20, que apresentaram os menores CEs (abaixo de 1,0), para clonagem e seqüenciamento (Tabela 7). Estes cDNAs, com expressão mais acentuada em pH 1,8 (controle) foram clonados em pGEM-T *easy* (Promega) e seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 8. Os cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências disponíveis em bancos de dados foram: 1F01, 12F01, 1J04 e 10J14.

Análise dos cDNAs que apresentaram similaridade com seqüências presentes em bancos de dados

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1F01 apresentou similaridade com uma *fructose/tagatose biphosphate aldolase* de *Ralstonia metallidurans* (Figura 20).

```

1F01 : 69  MPLVHMKDLLNHAYAHGYAVGAFDVVNLEFVEGVMAAAERSRAPAILSLAESQLEHYDFE 248
      MPLV+MKD+L+HA+AHGYAVGAFD+V L+F+E ++  AER+RAP  ILSLAES  H+D  E
Fba:   1  MPLVNMKMDLDHAHAHGYAVGAFDLVGLDFLEAIVVGAERARAPVILSLAESHFSHFDLE 60

1F01 : 249  LLM 257
      L M
Fba:   61  LAM 63

```

Figura 20. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1F01 e a seqüência de aminoácidos de uma *fructose/tagatose biphosphate aldolase* (acesso ZP_00022476.1).

Tabela 7. cDNAs com coeficiente de expressão abaixo de um selecionados para clonagem e seqüenciamento.

cDNA	Primer	pH	Tamanho (pb)	Coeficinte de Expressão (CE)
1F01	OPF01	1,8	553	0,88
5F01	OPF01	1,8	503	0,73
7F01	OPF01	1,8	305	0,78
8F01	OPF01	1,8	445	0,84
12F01	OPF01	1,8	347	0,56
13F01	OPF01	1,8	366	0,84
20F01	OPF01	1,8	171	0,87
21F01	OPF01	1,8	167	0,95
19F08	OPF08	1,8	226	0,38
4F03	OPF03	1,8	603	0,37
1J04	OPJ04	1,8	554	0,21
2J04	OPJ04	1,8	579	0,46
9J04	OPJ04	1,8	374	0,46
10J04	OPJ04	1,8	373	0,48
14J04	OPJ04	1,8	297	0,49
15J04	OPJ04	1,8	296	0,52
16J04	OPJ04	1,8	262	0,52
10J14	OPJ14	1,8	392	0,29
23F08	OPF08	1,8	283	0,12
36F04	OPF04	1,8	182	0,24

Tabela 8. Análise da seqüência dos cDNAs com expressão reprimida na presença de pH acima ou abaixo de 1,8.

cDNA	Similaridade	% similaridade	% identidade	Score (bits) E-value
	<i>Fructose/tagatose biphosphate</i>			
1F01	<i>aldolase</i> (ZP_00022476.1)	84%	66%	2e ⁻¹⁸
5F01	nenhuma	-	-	-
7F01	nenhuma	-	-	-
8F01	nenhuma	-	-	-
12F01	Família de Proteínas DedA (NP_790571.1)	81%	63%	1e ⁻⁰⁸
13F01	nenhuma	-	-	-
20F01	nenhuma	-	-	-
21F01	nenhuma	-	-	-
19F08	nenhuma	-	-	-
4F03	nenhuma	-	-	-
1J04	proteína ribossomal S19 – 30S (NP_273204.1)	92%	75%	9e ⁻³⁵
2J04	nenhuma	-	-	-
9J04	nenhuma	-	-	-
10J04	nenhuma	-	-	-
14J04	nenhuma	-	-	-
15J04	nenhuma	-	-	-
16J04	nenhuma	-	-	-
10J14	ATP dependente DNA helicase (NP_617276.1)	83%	72%	2e ⁻¹⁴
23F08	nenhuma	-	-	-
36F04	nenhuma	-	-	-

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 12F01 apresentou similaridade com uma proteína DedA de *Pseudomonas syringae* pv. Tomato (Figura 21).

```
12F01: 5   ILLHFDQYLTIILLQEYGAWVYALLFLILFAETGLVIMP 118
      ++LH D YL +L+  YG WVYA+LFL++F ETGLVIMP
DedA  : 8   LILHLDVYLDLLVTNYGTWVYAILFLVIFCETGLVIMP 45
```

Figura 21. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 12F01 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína DedA (acesso NP_790571.1).

A função das proteínas da família DedA ainda não está bem estabelecida. Supõe-se que estas proteínas estejam envolvidas em transporte na membrana.

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1J04 apresentou similaridade com uma proteína ribossomal S19 da subunidade 30S de *Neisseria meningitidis* (Figura 22).

```
1J04: 258  RSIKKGPFIDEHLDRKVQSAQASNSRRPIKTWSRRSTITPDFIGLTISVHNGRQHIPPVVV 437
      RS+KKGPP++D HL +KV +A+ASN +RPIKTWSRRSTI PDFIGLTI+VHNGR H+PV +
30S:  3    RSLKKGOPYVDLHLLKKVDAARASNDKRPIKTWSRRSTILPDFIGLTI+VHNGRTHVPVFI 62

1J01: 438  NENMVGHKLGEFALTRTFKGHVADKKAQ 521
      ++NMVGHKLGEF+LTRTFKGH+ADKKA+
30S:  63   SDNMVGHKLGEFSLTRTFKGLADKKAK 90
```

Figura 22. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 1J04 e a seqüência de aminoácidos de uma proteína ribossomal S19 – 30S (acesso NP_273204.1).

Como a expressão do cDNA 1J04 é reprimida em *A. ferrooxidans* pode-se sugerir que mudanças no pH afetam a síntese de proteínas.

A seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 10J14 apresentou similaridade com uma DNA helicase ATP-dependente de *Methanosarcina acetivorans* (Figura 23).

```
10J14: 4   PDAWIQCGRFFGTEKLDIFDHIELDQPLPKAVDEVLLFLKKHAMRGAD 147
      PDAWIQCGRF G +K DIFDHIE+ + LP AV+ V+ FLKKHAMRGAD
Sbjct: 211 PDAWIQCGRFIGKDKADIFDHIEIHEYLPVAVERVMEFLKKHAMRGAD 258
```

Figura 23. Comparação entre a seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA 10J14 e a seqüência de aminoácidos de uma DNA helicase ATP-dependente (acesso NP_617276.1).

As helicases estão envolvidas no metabolismo de ácidos nucléicos (Cox *et al.*, 2003). O fato do cDNA 10J14, assim como 1J04 e 1F01, ser reprimido, indica que mudanças no pH ideal de cultivo de *A. ferrooxidans* interferem nos processos celulares essenciais.

CONCLUSÕES

- Alterações no pH ideal de cultivo de *A. ferrooxidans* LR resultam em mudanças no crescimento e respiração da bactéria;
- Aproximadamente 62% dos cDNAs analisados tiveram a expressão diferencial confirmada por *slot blot* de DNA comprovando assim, a eficiência da combinação das técnicas de RAP-PCR e *slot blot* de DNA para identificação de cDNAs expressos diferencialmente;
- A análise das seqüências dos cDNAs isolados mostrou que alterações no pH ideal de cultivo pode reprimir ou induzir a expressão de cDNAs pertencentes a diferentes categorias funcionais em *A. ferrooxidans*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, S.P.; Polazzi, J.O.; Giersem J.K.; Easton, A.M. (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 174: 6938-6947.
- Amaro, A. M.; Chamorro, D.; Seeger, M.; Arredondo, R.; Perano, I.; Jerez, C. A. (1991) Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173: 910-915.
- Arsene, F.; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (2000) The heat shock response of *Escherichia coli*. *Intern. J. Food Microbiol.* 55: 3-9.
- Alvarez, S.; Jerez, C.A. (1989) Molecular aspects of the stress response in *Thiobacillus ferrooxidans* and other biomining microorganisms. In: Salley J. McCready R.G.L. Wichlacz P.L. (eds) *Biohydrometallurgy*. Jackson Hole. Wyoming: Canada Centre for Mineral and Energy Technology, pp 439-449.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 591-604.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brierley, C. L. (1978) Bacterial leaching. *Critical Review of Microbiology* 6: 207-262.
- Butcher, B.G.; Deane, S.M.; Rawlings, D.E. (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiology.* 66: 1826-1833.
- Cabrejos, M.E.; Zahao, H.L.; Guacucano, M.; Bueno, S.; Levican, G.; Garcia, E.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S.(1999) ISTI insertional inactivation of the *resB* gene: Implication for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Letters* 175: 223-229.
- Callard, D.; Lescure, B.; Mazzolini, L. (1994) A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques* 16: 1096-1097.
- Cloutier, J.; Prévost, D.; Naseau, P.; Antoun, H. (1992) Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiology.* 58: 2846-2853.

- Cobley, J.G.; Cox, J.C. (1983) Energy conservation in acidophilic bacteria. *Microbiol. Reviews* 47: 579-595.
- Collin, M.; Olsen, A. (2001) Identification of conditionally expressed genes in *Streptococcus pyogenes* using RNA fingerprinting. *FEMS Microbiol. Letters* 196: 123-127.
- Corton, J.C.; Gustafsson, J.A. (1997) Increased efficiency in screening large numbers of cDNAs fragments generated by differential display. *Biotechniques* 22(5): 802-810.
- Cox, K.; Watson, T.; Soultanas, P.; Hirst, J.D. (2003) Molecular dynamics simulations of a helicase. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 52(2): 254-262.
- Demanou, J.; Sharma, S.; Weber, A.; Wilke, B.M.; Njine, T.; Monkiedje, A.; Munch, J.C.; Schloter, M. (2006) Shifts in microbial community functions and nitrifying communities as a result of combined application of copper and mefenoxam. *FEMS Microbiol. Lett.* 260(1): 55-62.
- Dispirito, A.A.; Tuovinen, O.H. (1982) Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* 133: 33-37.
- Fleming, J.T.; Yao, W.H.; Sayler, G.S. (1998) Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3698-3706.
- Fowden, L. (1968) The occurrence and metabolism of carbon-halogen compounds. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 171(22): 5-18.
- Frattini, C.J.; Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. (2000) Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 57-64.
- Garcia Jr., O.; Silva, L.L. (1991) Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnol. Lett.* 13: 567-570.
- Garcia Jr., O.; Bigham, J.M.; Tuvinem, O.H. (1995) Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 41: 508-514.
- Georgopoulos, C.; Liberek, K.; Zylicz, M.; Ang, D. (1994) Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response. In: Morimoto, R.I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C. (eds), *The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 209-250.

- Gill, R.T.; Valdes, J.J.; Bentley, W.E. (1999) Reverse transcription-PCR differential display analysis of *Escherichia coli* global gene regulation in response to heat shock. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65(12): 5386-5393.
- Gribble, G.W. (1996a) Naturally occurring organohalogen compounds: A comprehensive survey. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 68: 1-423.
- Gribble, G.W. (1996b) The diversity of natural organochlorines in living organisms. *Pure Appl. Chem.* 68: 1699-1712.
- Gribble, G.W. (1998) The diversity of natural organochlorines in living organisms. *Acc. Chem. Res.* 31: 141-152.
- Gribble, G.W. (1999) The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.* 28: 335-346.
- Gribble, G.W. (2000) The natural production of organobromine compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 7: 37-49.
- Gribble, G.W. (2003) The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere* 52: 289-297.
- Gross, C.A. (1996) Function and regulation of the heat shock proteins. In: Neidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press, Washington, pp. 1382-1399.
- Groudeva, V.I.; Markov, K.I.; Gentchev, G.J. (1978) Survival of *Thiobacillus ferrooxidans* after UV irradiation. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 31: 599-602.
- Groudev, S.N. (1980a) Differences between *Thiobacillus ferrooxidans* strains with respect to their ability to oxidize covellite. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 33: 659-662.
- Groudev, S.N. (1980b) Leaching of sphalerite with different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 33: 1119-1122.
- Harrison, A.P. (1982) Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* 131: 68-76.
- Hubert, W.A.; Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. (1995) Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* 31: 10-14.

- Hutchins, S.R.; Davidson, M.S.; Brieley, J.A.; Brieley, C.L. (1986) Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology* 40: 311-336.
- Hulton, C.S.; Higgins, C.F.; Sharp, P.M. (1991) Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834.
- 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.
- Janssen, D.B.; Oppentocht, J.E.; Poelarends, G.J. (2001) Microbiol dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 254-258.
- Jerez, C.A. (1988) The heat shock response in meso and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 289-294.
- Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 511-516.
- Kitagawa, M.; Matsumura, Y.; Tsuchido, T. (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 164-171.
- Kondratyeva, T.F.; Muntyan, L.N.; Karavaiko, G.I. (1995) Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology* 141: 1157-1162.
- Kuenen, J.G.; Robertson, L.A.; Tuovinen, O.H. (1992) The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospora*, and *Thiosphaera*, In: A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (eds.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, pp. 2638-2657.
- Lane, D.J.; Harrison, A.P.; Stahl, D.; Pace, B.; Giovannoni, S.J.; Olsen, G.J.; Pace, N.R. (1992) Evolutionary relationships among sulfur and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174: 269-278.
- Leduc, L.G.; Ferroni, G.D. (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 103-120.

- Leung, G.S.; Zhang, M.; Xie, W.J.; Kwan, H.S. (2000) Identification by RNA fingerprinting of genes differentially expressed during the development of basidiomycete *Lentinula edodes*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 977-990.
- Li, S.; Xiao, X.; Li, J.; Luo, J.; Wang, F. (2006) Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. *Extremophiles* 10(2): 97-104.
- Liang, P.; Averboukh, L.; Pardee, A. B. (1993) Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Liang, P.; Pardee, A.B. (1992) Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science* 257(5072): 967-971.
- Liang, P.; Pardee, A.B. (1995) Recent advances in differential display. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 274-280.
- Lim, E.M.; Ehrlich, S.D.; Maguim, E. (2000) Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *Electrophoresis* 21(12): 2557-2561.
- Lombardi, A.T.; Garcia Jr., O. (1999) An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metal from sewage sludges. *Critical Reviews in Microbiology* 25(4): 275-288.
- Lopez, L.A.; Exposito, E.; Anton, J.; Rodriguez-Valera, F.; Aldaz, A. (1999) Use of *Thiobacillus ferrooxidans* in a coupled microbiological-electrochemical system for wastewater detoxification. *Biotechnol. Bioeng.* 63(1): 79-86.
- Lundgren, D.G.; Silver, M. (1980) Ore leaching by bacteria. *Annual Review of Microbiology* 34: 263-283.
- McClelland, M.; Mathieu-Daude, F.; Welsh, J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.* 11: 242-246.
- Martin, B.; Humbert, O.; Camara, M.; Guenzi, E.; Walker, J.; Mitchell, T.; Andrew, P.; Prudhomme, M.; Alloing, G.; Hakenbeck, R.; *et al.* (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483.

- Modak, J.M.; Natarajan, K.A.; Mukhopadhyay, S. (1996) Development of temperature-tolerant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* to improve bioleaching kinetics. *Hydrometallurgy* 42: 51-61.
- Mou, L.; Miller, H.; Li, J.; Wang, E.; Chalifour, L. (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 564-569.
- Nagel, A.C.; Fleming, J.T.; Sayler, G.S.; Beattie, K. L. (2001) Screening for ribosomal-based false positives following prokaryotic mRNA differential display. *Biotechniques* 30(5): 988-990.
- Natarajan, K.A.; Sudeesha, K.; Rao, R. (1994) Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 303-306.
- Novo, M.T.M.; Souza, A.P.; Garcia Jr., O.; Ottoboni, L.M.M. (1996) RAPD genomic fingerprints differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System. Appl. Microbiol.* 19: 91-95.
- Paulino, L.C.; de Mello, M.P.; Ottoboni, L.M.M. (2002) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analysed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 23(4): 520-527.
- Rawlings, D.E.; Kusano, T. (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58: 39-55.
- Rince, A.; Flahaut, S.; Auffray, Y. (2000) Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Inter. J. of Food Microbiol.* 55: 87-91.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.E. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Selenska-Pobell, S.; Otto, A.; Kutschke, S. (1998) Identification and discrimination of thiobacillus using Ardea, RAPD and rep-APD. *Appl. Microbiol.* 84: 1085-1091.
- Sharma, S.; Aneja, M.K.; Mayer, J.; Schloter, M.; Munch, J.C. (2004) RNA fingerprinting of microbial community in the rhizosphere soil of grain legumes. *FEMS Microbiol. Lett.* 240(2):181-186.
- Shepard, B.D.; Gilmore, M. S. (1999) Identification of aerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1470-1476.

- Shiratori, T.; Inoue, C.; Sugawara, K.; Kusano, T.; Kitagawa, Y. (1989) Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171: 3458-3464.
- Shiratori, T.; Sonta, H. (1993) Application of iron-oxidizing bacteria to hydrometallurgical flue dust treatment and H₂S desulfurization. FEMS Microbiol. Rev. 11: 165-174.
- Silver, M.; Torma, A.E. (1974) Oxidation of metal sulfides by *T. ferrooxidans* grown on different substrates. Can. J. Microbiol. 20: 141-147.
- Slonczewski, J.J.; McGee, D.J.; Phillips, J.; Kirkpatrick, C.; Mobley, H.L.T. (2000) pH-dependent protein profiles of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gels. Helicobacter 5(4): 240-247.
- Taglicht, D.; Padan, E.; Oppenheim, A.B.; Schuldiner, S. (1987) An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 169: 885-887.
- Thies, F.L.; Hartung, H.P.; Giegerich, G. (1998) Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* lon gene detected by RNA arbitrarily primed PCR. FEMS Microbiol. Lett. 165: 329-334.
- Tuovinen, O.H.; Niemela, S.I.; Gyllenberg, H.G. (1971) Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. Antonie van Leeuwenhoek 37: 489- 496.
- 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.
- Varela, P.; Jerez, C.A. (1992) Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Letters. 98: 149-154.
- Xu, N.; Johns, B.; Pullman, G.; Cairney, J. (1997) Rapid and reliable differential display from minute amounts of tissue: mass cloning and characterization of differentially expressed genes from Loblolly pine embryos. Plant Molecular Biology Reporter 15: 377-391
- Welsh, J.; Chada, K.; Dalal, S.S.; Cheng, R.; Ralph, D.; McClelland, M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res. 20: 4965-4970.
- Williams, D.H. (1996) The glycopeptide story-how to kill the deadly "superbugs". Nat. Prod. Rep. 13: 469-477.
- Williams, D.H.; Bardsley, B. (1999) The vancomycin group of antibiotics and the fight against resistant bacteria. A. Chem. Int. 38: 1172-1193.

- Winderickx, J.; Castro, J. M. (1994) *Practical course in molecular biology of microorganisms*. Universidade Federal de Ouro Preto - MG, January 23 - February 11, pp. 59.
- Winterton, N. (2000) The only green element towards a wider acceptance of its role in natural cycles. *Green. Chem.* 2: 173-225.
- Wong, K.K.; McClelland, M. (1994) Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. *PNAS* 91: 639-643

ARTIGO PUBLICADO



Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S–23S rDNA spacer polymorphism analysis

Rogério F. Bergamo^a, Maria Teresa M. Novo^d, Ricardo V. Veríssimo^a, Luciana C. Paulino^a, Nancy C. Stoppe^e, Maria Inês Z. Sato^e, Gilson P. Manfio^b, Paulo Inácio Prado^c, Oswaldo Garcia Jr.^d, Laura M.M. Ottoboni^{a,*}

^a Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, CP 6010, Universidade Estadual de Campinas, 13083-875 Campinas, SP, Brazil

^b Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CP 6171, Universidade Estadual de Campinas, 13083-875 Campinas, SP, Brazil

^c Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais, CP 6166, Universidade Estadual de Campinas, 13083-875 Campinas, SP, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil

^e Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Av. Prof. Frederico Hermann Jr. 345, 05489-900 São Paulo, SP, Brazil

Received 20 August 2003; accepted 26 March 2004

Available online 22 April 2004

Abstract

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence analyses of the PCR-amplified 16S–23S rDNA intergenic spacer (ITS) were used for differentiating *Acidithiobacillus thiooxidans* strains from other related acidithiobacilli, including *A. ferrooxidans* and *A. caldus*. RFLP fingerprints obtained with *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI* enabled the differentiation of all *Acidithiobacillus* reference strains into species groups. The *A. thiooxidans* strains investigated (metal mine isolates) yielded identical RFLP patterns to the *A. thiooxidans* type strain (ATCC 19377^T), except for strain DAMS, which had a distinct pattern for all enzymes tested. Fourteen *A. ferrooxidans* mine strains were assigned to 3 RFLP groups, the majority of which were grouped with *A. ferrooxidans* ATCC 23270^T. The spacer region of one representative strain from each of the RFLP groups obtained was subjected to sequence analysis, in addition to eleven additional *A. thiooxidans* strains isolated from sediment and water samples, and *A. caldus* DSM 8584^T. The *tRNA^{Ile}* and *tRNA^{Ala}* genes, present in all strains analyzed, showed high sequence similarity. Phylogenetic analysis of the ITS sequences differentiated all three *Acidithiobacillus* species. Inter- and intraspecific genetic variations detected were mainly due to the size and sequence polymorphism of the ITS3 region. Mantel tests showed no significant correlation between ITS sequence similarity and the geographical origin of strains. The results showed that the 16S–23S rDNA spacer region is a useful target for the development of molecular-based methods aimed at the detection, rapid differentiation and identification of acidithiobacilli.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *Acidithiobacillus thiooxidans*; 16S–23S rDNA spacer

1. Introduction

The recently revised genus *Acidithiobacillus* currently accommodates four validly-described species: *Acidithiobacillus albertensis*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* [14]. These are aerobic, Gram-negative, non-sporulating, rod-shaped bacteria that derive energy from the oxidation of reduced sulfur compounds [16,33]. These bacteria are commonly found in a wide range of environments, especially in sites

where sulfur compounds are abundant, such as mining areas, sewage treatments and marine habitats. Ecological studies of *Acidithiobacillus* are hampered by difficulties in enumerating, selectively isolating and identifying strains from the different species using culture-based methods.

A. ferrooxidans and *A. thiooxidans* are involved in the bioleaching of metals, a process in which metal sulfides are converted to water-soluble metal sulfates [3]. *A. ferrooxidans* is able to oxidize ferrous iron and is highly resistant to heavy metals like cadmium, copper and zinc [20,26]. *A. ferrooxidans* is also involved in the desulfurization of coal, decontamination of industrial wastes, deterioration of water quality and corrosion of cement and concrete structures.

* Corresponding author.

E-mail address: ottoboni@unicamp.br (L.M.M. Ottoboni).

Table 1
Bacterial strains and sources

Strains*	Source and references
<i>A. caldus</i> DSM 8584 ^T	Coal spoils, UK.
<i>A. ferrooxidans</i> AMF ATCC 23270 ^T CF3 CMV FG460 I35 LR PCE and PCEL PM S SJ22 and T22 SSP V3	Coal mine. Carbonifera Cambuí Company, Figueira (PR), Brazil. Isolated from acid, bituminous effluent of coal mine, USA. Noranda Blackbird cobalt mine, Idaho, USA (received from Dr. Barrie Johnson). Effluent of gold mine. Morro Velho Company (MG), Brazil (received from R. Liberato). Acid drainage from wastes of uranium mine. Figueira (PR), Brazil [7]. Received from Dr. Olli H. Tuovinen (Ohio State University, USA). Acid effluent of column leaching of uranium ore. Lagoa Real (BA), Brazil [7]. Effluent from uranium mine. Poços de Caldas (MG), Brazil [7]. Copper ore from Parys mine. Anglesey, Wales, UK (received from Dr. Barrie Johnson). Effluent of column leaching from copper ore. Surubim mine, Caraíba (BA), Brazil. Pyrite. Cae Coch mine, Trefriw, Wales, UK (received from Dr. Barrie Johnson). Acid drainage from coal mine wastes. Siderópolis (SC), Brazil [7]. Copper mine. Sofia, Bulgaria (received from Dr. Groudev, University of Sofia, Bulgaria).
<i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377 ^T FG01 ELC DAMS MF MMCE S3.3 PIAC10 S6.3 QUEI69 and QUEI70 QUEI65 BRAN50 CASQ23 COSI13.1 SACA46 STAM61	Kimmeridge clay. Dorset, England, UK. Effluent of column leaching from uranium mine. Figueira (PR), Brazil [7]. Acid drainage from coal mine. Figueira (PR), Brazil [7]. Effluent from uranium mine. Poços de Caldas (MG), Brazil [7]. Effluent from coal mine. Carbonifera Cambuí Company, Figueira (PR), Brazil [7]. Effluent of column leaching of uranium mine. Poços de Caldas (MG), Brazil. Sediment. Piaçaguera river, Cubatão (SP), Brazil (site 3). Water. Piaçaguera river, Cubatão (SP), Brazil (site 3). Sediment. Billings dam, São Paulo (SP), Brazil (site 11). Sediment. Queiroz river, Cubatão (SP), Brazil (site 7). Water. Queiroz river, Cubatão (SP), Brazil (site 7). Sediment. Branco river, São Vicente (SP), Brazil (site 8). Water. Casqueiro river, Cubatão (SP), Brazil (site 10). Water. Santos estuary, Santos (SP), Brazil (site 4). Sediment. Santos estuary, Santos (SP), Brazil (site 5). Water. Santo Amaro river, Guarujá (SP), Brazil (site 6).

* ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA; DMS, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

Due to their slow growth rate, chemoautotrophic metabolism and sulfuric acid production during growth, acidithiobacilli are relatively difficult to culture using solid media. Thus, rapid and sensitive methods are critical for taxonomic characterization, identification and typing of new isolates.

Polymorphism analysis of 16S–23S rDNA intergenic spacer fragments has been successfully used in the differentiation of several bacterial species [10]. This approach was applied to the investigation of bacterial populations in a bioleaching system, by comparison of the size of the 16S–23S rDNA fragments from different organisms [25]. According to Salazar et al. [29], *A. ferrooxidans* has two rRNA operons and the spacer between the 16S and 23S rDNA from a strain analyzed by Venegas et al. [32] had two tRNA genes, tRNA^{Ile} and tRNA^{Ala}.

In the present study, we describe the analysis of the 16S–23S spacer region from *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*, including strains isolated from metal mines and from a collection of *Acidithiobacillus* strains isolated by CETESB (the organization responsible for the control of environmental

pollution, sewage and water quality in the State of São Paulo, Brazil) from sediment and water samples, in order to investigate the degree of inter- and infraspecific variability of these organisms in pristine and polluted environments.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this work and their sources are listed in Table 1. These included type strains and isolates received from diverse sources. Several *A. thiooxidans* strains were isolated from water and sediment samples collected at different sites in the State of São Paulo, Brazil, that were under different degrees of anthropic influence. Water samples were collected using sterilized polypropylene flasks, according to standard methods [2]. Sediment samples were collected using a stainless steel van Veen drag, transferred into a plastic tray and put inside sterilized polypropylene

flasks. Both water and sediment samples were transported under refrigeration and processed within 24 h after collection [2]. Enrichment cultures were obtained using Postgate medium, modified for *A. thiooxidans* [6]. Volumes of 10, 100 and 1000 ml of water were membrane-filtered (0.45 µm) and the membranes were transferred to flasks containing modified Postgate medium. Aliquots of 10, 1 and 0.1 g of sediment were seeded directly into flasks with modified media. All flasks were incubated under shaking (250 rpm) at 28 °C, for 7–10 days. Isolation of colonies was performed by plating of enrichment cultures onto thiosulfate agar. Typical colonies were transferred to Postgate liquid media and positive growth was evaluated by phase contrast microscopy to verify the purity of the isolates [6,15]. Identification of isolates was performed by phylogenetic analysis of PCR-amplified 16S rDNA sequences.

Strains isolated from water and sediment were cultivated in modified Postgate medium [6]. Reference and mine strains were cultured in T&K liquid medium [30]: K₂HPO₄·3H₂O, 0.4 g/l; MgSO₄·7H₂O, 0.4 g/l; (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/l; pH 1.8, adjusted with sulfuric acid. The medium was supplemented with either FeSO₄·7H₂O (33.4 g/l), for *A. ferrooxidans*, or sterile sulfur powder (10 g/l), for *A. caldus* and *A. thiooxidans*. All strains were incubated under shaking at 250 rpm, 30 °C, except for *A. caldus*, which was incubated at 45 °C. Biomass was harvested by filtration on 0.45 µm membranes (Millipore) and cells were washed four times with 0.01 N H₂SO₄, prior to transferring to Eppendorf tubes and storage at –70 °C.

2.2. Genomic DNA isolation

DNA was isolated according to Goss et al. [9], with modifications. Cells were washed once with TE (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) and once with 1 ml of TAS buffer (Tris–HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) prior to the addition of 500 µl of TAS containing 50 µl SDS 10% and 150 µl proteinase K (20 mg/ml, Gibco BRL). Samples were incubated at 50 °C for 1 h, extracted with chloroform: isoamyl alcohol (24:1, v/v) and treated with 4 µl of RNase (10 mg/ml) for 2 h at room temperature. Samples were extracted once with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) and once with chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v). DNA was precipitated by addition of 1/10 vol of 5 M NaCl and 2 vol ethanol. Purified DNA was dissolved in TE and the concentration was determined on agarose gel by comparison with a λ DNA concentration standard (Gibco BRL).

2.3. PCR amplifications of 16S and 16S–23S rDNA spacers

The 16S rRNA genes were amplified using primers 27f (5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' [18]) and 1525r (5'-AAGGAGGTGWTGCARCC-3' [18]). For RFLP analyses, the 16S–23S rDNA spacers of mine and type strains

were amplified using the primers pHr (5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' [22]), corresponding to the 3'-end of the 16S rRNA gene, and p322-anti (5'-GGTCTTTTCACCTTCCCCTC-3' [13]), which binds to a site located 322 bases at the 5'-end of the 23S rDNA. For sequencing, 16S–23S rDNA spacer fragments were amplified using the primers pHr and L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3' [11]). Primer L1 binds to a site located 20 bases at the 5'-end of the 23S rRNA gene (Fig. 2).

PCR reactions (50 µl) contained 100 ng of DNA, 0.4 µM of each primer, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgCl₂ and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL), in the buffer supplied by the manufacturer. Amplifications were performed using a 2400 Perkin–Elmer DNA thermal cycler and included an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C/1 min, 55 °C/7 min, 72 °C/3 min and final extension at 72 °C for 20 min. The amplification products (3 µl) were visualized by electrophoresis on 1% agarose gels, after staining with ethidium bromide. The gels were photographed under UV light.

2.4. RFLP analysis

One µl of PCR products was digested for 2 h with either *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI* (Amersham Biosciences and Gibco BRL), according to the manufacturer's instructions. The restriction fragments were separated by electrophoresis in 4% acrylamide gels using 1 X Tris-borate-EDTA buffer [27]. Electrophoresis was carried out at 120 V for 2 h in a vertical slab gel unit (V16, Gibco BRL) and the band patterns were visualized by silver staining.

2.5. Sequencing and sequence analysis

The 16S rDNA PCR products were subjected to direct sequencing using the internal primers 530r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' [19]), 782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3' [5]), 765f (5'-ATTAGATACCCTGGTAG-3') and 1100r (5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3' [18]). The amplified 16S–23S rDNA spacer fragments of selected strains were cloned into pGEM-T (Promega) and sequenced using the M13 reverse and forward primers. Sequencing reactions were performed using the Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) and run on an ALF Express Sequencer (Amersham Biosciences). Contigs were assembled using the BioEdit software package [12]. All sequences were deposited at GenBank and accession numbers are listed in Table 4 and Fig. 1.

The sequences were aligned using the Clustal W program [31]. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA v. 1.01 [17] or the PAUP v. 4.0b10 (<http://paup.csit.fsu.edu>) packages using p-distances and the neighbor-joining method [28]. Bootstrap values were calculated from 1000 replications using the MEGA program.

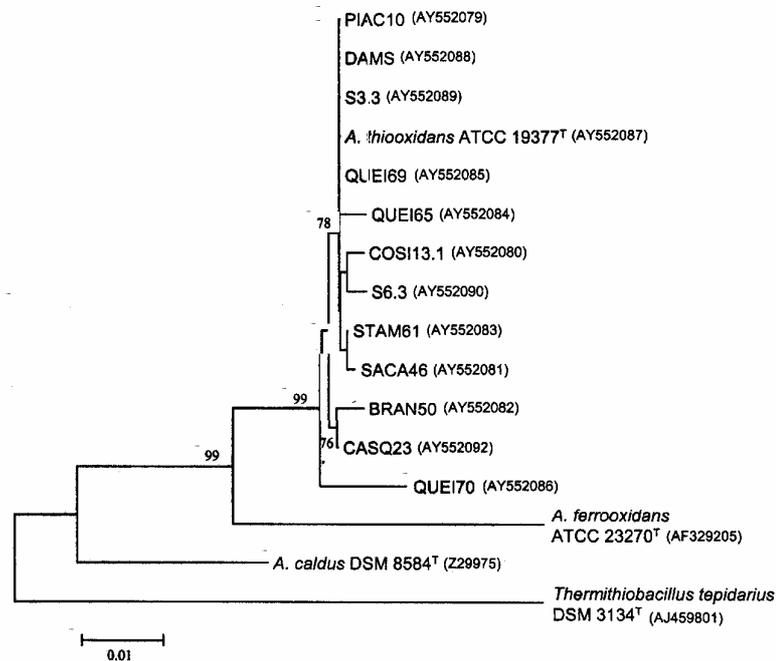


Fig. 1. Neighbor-joining tree derived from the analysis of 16S rDNA sequences (p-distance method) of environmental isolates recovered from sediment and water samples and reference strains (bootstrap values calculated from 1000 replicates are indicated). The numbers in parentheses correspond to the GenBank accession numbers.

2.6. Statistical analyses

The correlation between source and environmental variables was investigated for all the *A. thiooxidans* environmental isolates. For these, data matrices of 16S–23S rDNA spacer sequence dissimilarity, pollution level, salinity of sampling site and substrate type (sediment or water) were expressed as Euclidian distances. Also, geographical distances between sampling sites were calculated from UTM coordinates (30 m precision), and time lag between samples was expressed in months. The correlation of each of these distances with ITS strain relatedness was tested using Mantel's test by matrix randomizations (10 000 permutations were performed for each test) [21].

3. Results and discussion

3.1. RFLP analysis of the 16S–23S rDNA spacer

Nineteen strains of *Acidithiobacillus* sp. isolated from mines in Brazil and elsewhere and the type strains of *A. caldus*, *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* were characterized by RFLP analysis of the PCR-amplified 16S–23S rDNA spacer fragments using the restriction enzymes *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI*. Fingerprint patterns resulting from electrophoretic separation of restriction fragments were used to assign strains to RFLP groups (Table 2).

The restriction enzymes *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI* divided the *A. ferrooxidans* strains into three groups (Table 2), named group I, the largest, included the *A. ferrooxidans* type strain ATCC 23270^T, single-member group II, with strain PCEL, and group III comprised by *A. ferrooxidans* strains SSP, V3 and PCE.

The majority of the *A. thiooxidans* mine strains were grouped into RFLP group IV (Table 2), that included the type strain *A. thiooxidans* ATCC 19377^T. Only *A. thiooxidans* DAMS presented a distinct RFLP profile and was classified as group V. The RFLP profiles obtained for the type strain of *A. caldus* (DSM 8584^T) were different from the profiles observed for the *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains, for all enzymes tested (Table 2).

The RFLP analysis of the 16S–23S rDNA spacer proved to be a useful technique for differentiating the *Acidithiobacillus* strains at the species level. No correlation was observed between the RFLP groups and geographical origin of the strains, despite the fact that some strains were isolated from different types of mining operations in Europe and in the USA (Table 1). Similar results were reported by Novo et al. [23] and Paulino et al. [24], using RAPD and rep-PCR, respectively. These authors found no correlation between the genetic relatedness of the *Acidithiobacillus* strains analyzed (in a data set that included many of the strains currently studied) and either geographic origin or type of environment from which the strains were isolated.

3.2. Isolation of *Acidithiobacillus* spp. from environmental samples

Due to their chemoautotrophic metabolism and physiological plasticity, acidithiobacilli are often found in diverse environments. To determine the degree of inter- and infraspecific variability of these organisms in pristine and polluted environments, a collection of *Acidithiobacillus* strains were isolated by CETESB from different sediments and water samples in the state. A description of the sampling sites

Table 2
Acidithiobacillus strains groups based upon RFLP analyses of 16S–23S rDNA spacer fragments

Strains	RFLP group	RFLP profiles obtained with restriction enzymes				
		<i>AluI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>
<i>A. ferrooxidans</i>						
ATCC 23270 ^T	I*	A1	D1	H1	I1	M1
FG460	I	A1	D1	H1	I1	M1
SJ22	I	A1	D1	H1	I1	M1
CF3	I	A1	D1	H1	I1	M1
CMV	I	A1	D1	H1	I1	M1
LR	I	A1	D1	H1	I1	M1
I35	I	A1	D1	H1	I1	M1
AMF	I	A1	D1	H1	I1	M1
S	I	A1	D1	H1	I1	M1
PM	I	A1	D1	H1	I1	M1
T22	I	A1	D1	H1	I1	M1
PCEL	II*	A1	D2	H2	I2	M1
SSP	III*	A2	D3	H3	I3	M2
V3	III	A2	D3	H3	I3	M2
PCE	III	A2	D3	H3	I3	M2
<i>A. thiooxidans</i>						
ATCC 19377 ^T	IV*	A3	D4	H4	I4	M3
MF	IV	A3	D4	H4	I4	M3
MMCE	IV	A3	D4	H4	I4	M3
ELC	IV	A3	D4	H4	I4	M3
FG-01	IV	A3	D4	H4	I4	M3
DAMS	V*	A4	D5	H5	I5	M4
<i>A. caldus</i>						
DSM 8584 ^T	VI*	A5	D6	H6	I6	M5

* Strains selected for full sequencing of the 16S–23S rDNA spacer.

Table 3
A. thiooxidans sampling sites in São Paulo State, Brazil

Sampling site	Sampling date	Pollution ¹	Salinity ²	Type of sample
3 Piaçaguera river, has influence of tides. High level of pollution, mainly industrial (fertilizers).		+++	++	
4 Estuary of Santos, near a coke plant. High level of pollution, mainly industrial (coke plant and metallurgy industry).		+++	+++	
5 Estuary of Santos, Caneus plaza. High level of pollution, several sources.	May/00	+++	+++	Sediment
6 Santo Amaro river, has influence of tides. Medium level of pollution, several sources.	May/00	++	+++	Water
7 Queiroz river, has influence of tides. Preserved natural environment, no significant sources of pollution.	Apr/00	+	++	Water
8 Branco river, has influence of tides. Preserved natural environment, receives domestic sewage from local area.	Apr/00	++	++	Sediment
10 Casqueiro river. High level of pollution, domestic solid residues and sewage.	Mar/99	++	++	Water
11 Billings reservoir dam at Pedreira pumping station. High level of pollution, several sources.	Apr/98	+++	+	Sediment

^{1,2} The levels of pollution and salinity are indicated by +++ (high levels), ++ (intermediary levels) and + (low levels). Data were obtained from CETESB.

as well as the strain isolation dates, levels of pollution, salinity and type of sample (water or sediment) are given in Table 3. The identity of all isolates was confirmed by phylogenetic analysis of nearly complete 16S rDNA sequences (Fig. 1). All isolates analyzed were recovered in a tight clade with *A. thiooxidans* ATCC 19377^T, showing between 98.57–100% sequence identity among them (data not shown). In addition to the phylogenetic assignment data, all the putative *A. thiooxidans* strains were able to grow in Postgate medium, modified for *A. thiooxidans* [6], using elemental sulfur as energy source, corroborating their taxonomic assignment. The 16S–23S rDNA spacer region of these strains was amplified by PCR and subjected to sequencing.

3.3. 16S–23S rDNA spacer sequence analysis

The 16S–23S rDNA spacer of a representative strain from each of the RFLP groups was sequenced (Table 2). Nucleotide sequences obtained from these and from the eleven additional *A. thiooxidans* strains isolated from sediment and water samples were aligned and the tRNA genes and different ITS regions identified and annotated in Fig. 2.

From the alignment, we could verify the existence of polymorphism in the intergenic spacers (ITS), particularly in the ITS3 (Fig. 2). The end portions of the sequenced fragments corresponded to the exact sequence of the primers pHr and L1 used for the PCR amplifications and, thus, identity in these regions shown in the figure represent an artifact of the sequencing strategy and should not be considered (Fig. 2). However, a small portion of the 23S rDNA just before the L1 primer was identical for all strains analyzed, even among the different *Acidithiobacillus* species (Fig. 2).

Two tRNA genes, tRNA^{Ala} and tRNA^{Ile}, were found in the spacer region of all strains analyzed (Fig. 2). As reported by Gürtler and Stanisich [10] most of the 16S–23S rDNA spacers in Gram-negative bacteria contain these two genes, whereas the majority of the Gram-positive bacteria do not. The presence of the two tRNA genes in the rDNA spacer region of the *Acidithiobacillus* strains tested is also

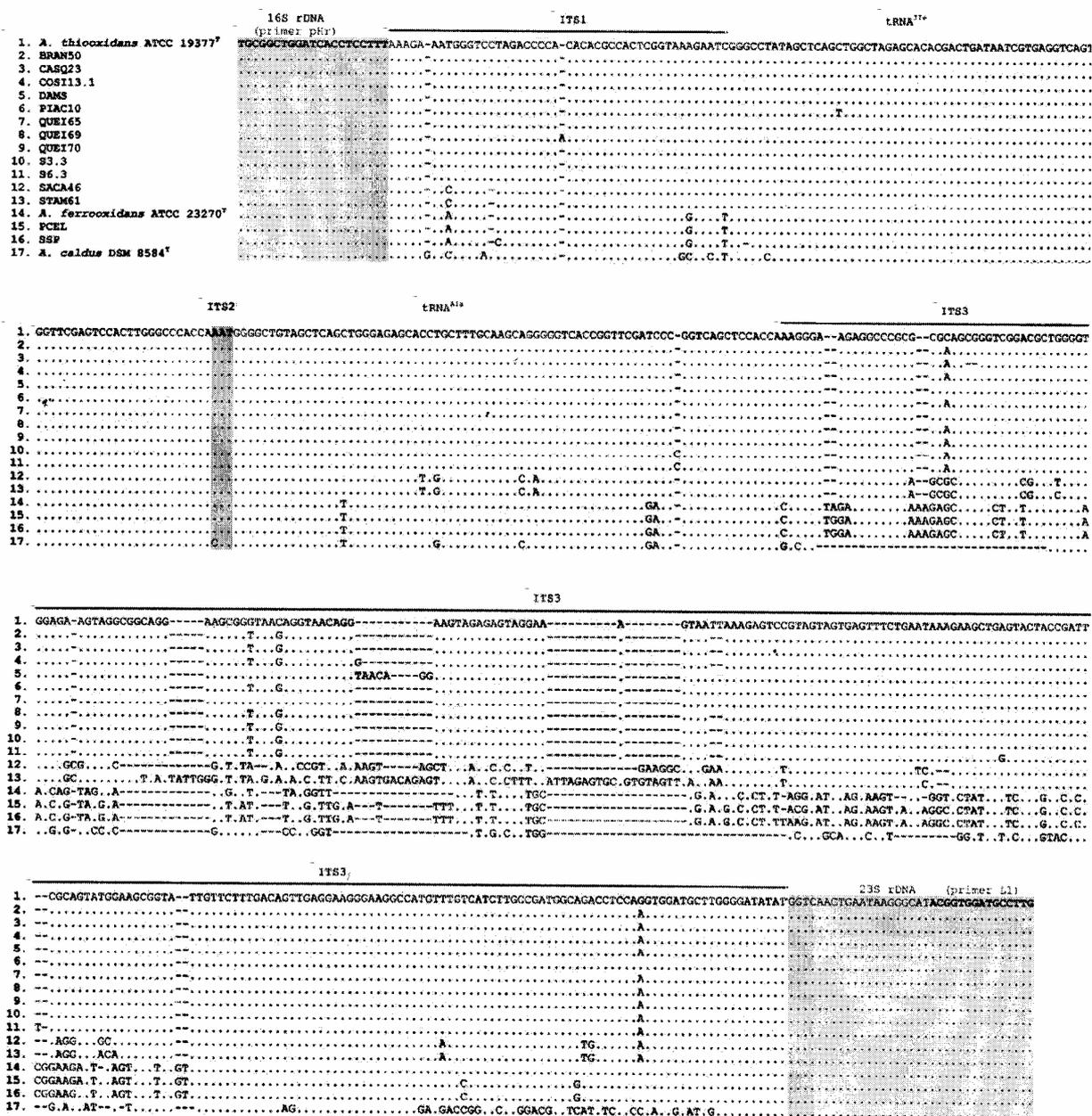


Fig. 2. Alignment of the 16S–23S rDNA spacer sequences from *A. caldus*, *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* type strains, and isolates from mines, sediment and water samples. Identical bases are indicated by dots and sequence gaps by dashes.

in agreement with the results obtained by Venegas et al. [32], who reported these genes in *A. ferrooxidans* strain A4. The order of the tRNA genes in the operon of the *Acidithiobacillus* strains tested was the same. The same arrangement was also observed in *Escherichia* spp. and *Pseudomonas* spp. [10], but differed in *Xanthomonas* spp. and *Xylella fastidiosa* [4,8].

The two tRNA genes, and especially tRNA^{Leu}, were highly conserved in all *Acidithiobacillus* strains analyzed,

with only a few nucleotide changes and minor size differences (Fig. 2, Table 4).

The tRNA genes of all *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains were separated by an AAT intergenic spacer (ITS2) (Fig. 2), the first base of which was C in *A. caldus* (Fig. 2). Venegas et al. [32] found a two-base spacer (AT) separating the tRNA genes in the *A. ferrooxidans* strain A4.

The total length of the 16S–23S rDNA spacer sequences of the *A. thiooxidans* and *A. ferrooxidans* strains ranged

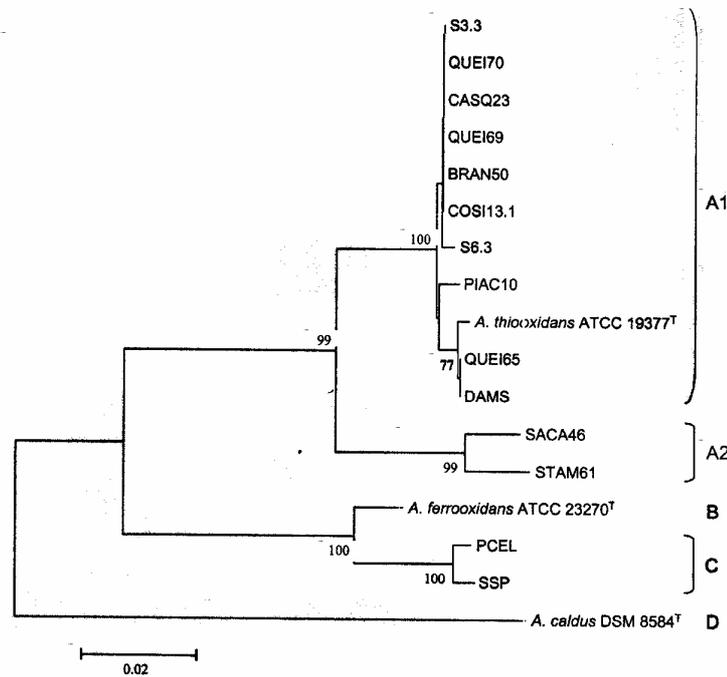


Fig. 3. Neighbor-joining tree derived from the analysis of 16S–23S rDNA spacer sequences of *Acidithiobacillus* strains. Bootstrap values calculated from 1000 replicates are indicated. Accession numbers are listed in Table 4.

Table 4
ITS and tRNA gene size (bp) based on the 16S–23S rDNA spacer sequence

Strains	Size (bp)						GenBank accession
	Total	ITS1	ITS2	ITS3	tRNA ^{Ile}	tRNA ^{Ala}	
<i>A. caldus</i>							
DSM 8584 ^T	382	47	3	179	77	76	AF512808
<i>A. ferrooxidans</i>							
ATCC 23270 ^T	441	45	3	240	77	76	AF512809
PCEL	452	45	3	251	77	76	AF512810
SSP	452	45	3	252	76	76	AF512811
<i>A. thiooxidans</i>							
ATCC 19377 ^T	458	46	3	256	77	76	AF512812
BRAN50	456	46	3	254	77	76	AF512818
CASQ23	454	46	3	252	77	76	AF512815
COSI13.1	457	46	3	255	77	76	AF512814
DAMS	465	46	3	263	77	76	AF512825
PIAC10	458	46	3	256	77	76	AF512813
QUEI65	458	46	3	256	77	76	AF512820
QUEI69	457	47	3	254	77	76	AF512821
QUEI70	456	46	3	254	77	76	AF512822
S3.3	457	46	3	254	77	77	AF512823
S6.3	458	46	3	255	77	77	AF512824
SACA46	457	45	3	256	77	76	AF512817
STAM61	490	45	3	289	77	76	AF512819

from 454 to 490 bp, and from 441 to 452 bp, respectively (Table 4). *A. caldus* presented the smallest spacer, with 382 bp (Table 4). The observed size heterogeneity was mainly due to length variations in the ITS3 region. Most of the nucleotide changes also occurred in the ITS3 (Fig. 2).

Apparently, some of the polymorphisms observed in ITS3 are species-specific. Thus, ITS3 may be a potential target for the development of molecular approaches for differentiating acidithiobacilli.

A phylogenetic tree was constructed based on the analysis of the 16S–23S rDNA spacer sequence of the tested strains (Fig. 3). The *A. caldus*, *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains were separated into different clusters (A1, A2, B, C and D), supported by high bootstrap values. Among the *A. ferrooxidans* strains, SSP (cluster C) was the most divergent from the type strain (cluster B). This result is in agreement with Paulino et al. [24] showing that strain SSP was very different from all other *A. ferrooxidans* strains based on 16S rDNA sequence data and DNA–DNA pairing data.

As shown in Fig. 3, most of the *A. thiooxidans* strains, including the type strain and mine strain DAMS, were recovered in a tight cluster (A1). Strains SACA46 and STAM61 were recovered in a separate group (A2). Strains assigned to clusters A1 and A2 included *A. thiooxidans* strains isolated from water and sediment samples, from sites with very different levels of pollution and salinity (Table 3). In general, sequences from the 16S–23S rDNA spacer of the *A. thiooxidans* strains analyzed ranged from 88.54 to 100% similarity (data not shown).

Statistical analyses of environmental parameters (Mantel tests) showed that there were no significant correlations between these factors and strain relatedness ($R = -0.13$, $P = 0.17$ for degree of pollution; $R = 0.44$, $P = 0.08$ for

salinity; $R = -0.04$, $P = 0.52$ for substrate type). Also, no significant correlation was observed between geographical location and strain relatedness ($R = -0.15$, $P = 0.34$) and between time lag between samplings and genetic relatedness ($R = -0.07$, $P = 0.59$). The main cluster (Fig. 3) included *A. thiooxidans* strains that are highly related but that were isolated from water and sediment samples from sites with different levels of pollution and salinity, and from samples with a high variation of geographic and temporal distances (Table 3). It should be noted that correlations among environmental variables and genetic similarity may be detected in larger samples and/or with a wider range of genetic variation; however, the data indicate that this pattern can be blurred because genetically similar strains can be found in very distinct environments.

Aakra et al. [1] found no correlation between the 16S–23S rDNA spacer from ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and some ecological features analyzed. These authors suggested that purification of AOB is rather difficult and cultures obtained may be a result of selective isolation favoring particular phenotypes. It is commonly thought that culture-independent studies may provide a better view of the diversity of bacteria in the environment compared to studies based on selective isolation. This may be particularly important for bacteria with restrictive metabolic requirements, such as *A. thiooxidans*. Up to now, we have no data to confirm these hypotheses, but species-specific primer sets targeting the rDNA spacer may help to overcome the limitations pointed out earlier.

In conclusion, we have demonstrated that RFLP fingerprints of PCR-amplified 16S–23S rDNA spacer fragments obtained using *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI* and *MspI* are useful for the differentiation of *A. caldus*, *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*, with some degree of infraspecific discrimination for *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*. Sequence analysis revealed a high degree of heterogeneity in the ITS3 region of the 16S–23S rDNA spacer that may serve as a potential target for the design of group-specific primers. Given the difficulties in selective isolation and identification of acidithiobacilli, culture-independent approaches and rapid strain characterization based on PCR may be very useful for diversity studies in environmental samples.

Acknowledgements

This work was supported by grants 97/01069-0 and 98/05068-0 from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). R.F.B. (98/04426-0), R.V.V. (00/06826-8 & 01/02057-2) and M.T.M.N. had fellowships from FAPESP. L.M.M.O., G.P.M. and O.G. had research fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to Dr. O.H. Tuovinen, for providing *A. ferrooxidans* strain I35, to Dr. B. Johnson for *A. ferrooxidans* strains PM, SJ22, T22,

and CF3, to Dr. S. Groudev for *A. ferrooxidans* V3, and to R. Liberato for *A. ferrooxidans* strain CMV.

References

- [1] A. Aakra, J.B. Utaker, I.F. Nes, RFLP of rRNA genes and sequencing of the 16S–23S rDNA intergenic spacer region of ammonia-oxidizing bacteria: A phylogenetic approach, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 123–130.
- [2] APHA (American Public Health Association), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., APHA, AWWA, WPCF, Washington, 1998.
- [3] K. Bosecker, Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms, *FEMS Microbiol. Rev.* 20 (1997) 591–604.
- [4] J. Chen, D. Banks, R.L. Jarret, J.B. Jones, Evidence for conserved rRNA genes in the 16S–23S rDNA spacer sequence and two *rrn* operons of *Xylella fastidiosa*, *Can. J. Microbiol.* 46 (2000) 1171–1175.
- [5] J. Chun, Computer assisted classification and identification of Actinomycetes, Ph. D. thesis, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne, England, 1995.
- [6] B.J. Dutka, *Methods for Microbiological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*, Centre for Inland Waters, Ontario, 1976.
- [7] O. Garcia Jr., Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil, *Rev. Microbiol.* 22 (1991) 1–6.
- [8] E.R. Gonçalves, Y.B. Rosato, Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 355–361.
- [9] T.J. Goss, G.W. O'hara, M.J. Dilworth, A.R. Glenn, Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419, *J. Bacteriol.* 172 (1990) 5173–5179.
- [10] V. Gürtler, V.A. Stanisich, New approaches to typing and identification of bacteria using the 16–23S rDNA spacer region, *Microbiology* 142 (1996) 3–16.
- [11] R.R. Gutell, G.E. Fox, A compilation of large subunit RNA sequences present in a structural format, *Nucleic Acids Res.* 16 (Suppl.) (1988) r175–r201.
- [12] T.A. Hall, BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [13] R.J. Honeycutt, B.W.S. Sobral, M. McClelland, tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic for *Xanthomonas albilineans*, *Microbiology* 141 (1995) 3229–3239.
- [14] D.P. Kelly, A.P. Wood, Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2000) 511–516.
- [15] D.P. Kelly, A.P. Harrison, Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms: Genus *Thiobacillus*, Beijerinck 1904b, in: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, Williams & Wilkins, Baltimore, 1989, pp. 1842–1858.
- [16] J.G. Kuenen, O.H. Tuovinen, The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*, in: M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*, vol. 1, Springer-Verlag, New York, 1981, pp. 1023–1036.
- [17] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA: Molecular Evolutionary genetics analysis. V. 1.01, The Pennsylvania State University, University Park, PA, 1993.
- [18] D.J. Lane, 16S/23S rRNA sequencing, in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Wiley, New York, 1991, pp. 115–175.

- [19] D.J. Lane, B. Pace, G.J. Olsen, D.A. Stahl, M.L. Sogin, N.R. Pace, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 6955–6959.
- [20] L.G. Leduc, G.D. Ferroni, The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *FEMS Microbiol. Rev.* 14 (1994) 103–120.
- [21] B.F.J. Manly, *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*, second ed., Chapman & Hall, London, 1998.
- [22] A.A. Massol-Deya, D.A. Odelson, R.F. Hickey, J.M. Tiedje, Bacterial community fingerprinting of amplified 16 and 16–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA), in: A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic, Dordrecht, 1995, pp. 1–8.
- [23] M.T.M. Novo, A.P. Souza, O. Garcia Jr., L.M.M. Ottoboni, RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains, *Syst. Appl. Microbiol.* 19 (1996) 91–95.
- [24] L.C. Paulino, R.F. Bergamo, M.P. Mello, O. Garcia Jr., G.P. Manfó, L.M.M. Ottoboni, Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil, *Antonie van Leeuwenhoek* 80 (2001) 65–75.
- [25] J. Pizarro, E. Jedlicki, O. Orellana, J. Romero, R.T. Espejo, Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1323–1328.
- [26] D.E. Rawlings, T. Kusano, Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Microbiol. Rev.* 58 (1994) 39–55.
- [27] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [28] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [29] O. Salazar, M. Takamiya, O. Orellana, Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*, *FEBS Lett.* 242 (1989) 436–443.
- [30] O.H. Tuovinen, D.P. Kelly, Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ore, *Z. Allg. Mikrobiologie* 12 (1972) 311–346.
- [31] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673–4680.
- [32] A. Venegas, E. Hevia, H. Sanchez, Sequence of two tRNA genes from a *Thiobacillus ferrooxidans* ribosomal operon, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 8179.
- [33] W.V. Vishniac, *Thiobacillus*, Beijerinck 1904, in: R.E. Buchanan, N.E. Gibbons (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1974, pp. 456–461.

Dear Dr. Ottoboni,

Thank you for your e-mail.

With reference to your request (copy herewith) to re-use material on which Springer controls the copyright, our permission is granted free of charge, on the following condition:

* full credit (journal title, volume, year of publication, page, chapter/article title, name(s) of author(s), figure number(s), original copyright notice) is given to the publication in which the material was originally published by adding: With kind permission of Springer Science and Business Media.

With best regards,

-

Alice Essenpreis
Springer
Rights and Permissions

-

Tiergartenstrasse 17 | 69121 Heidelberg GERMANY
FAX: +49 6221 487 6223
permissions.Heidelberg@springer.com
www.springer.com/rights

-

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada:
"Expressão diferencial de genes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* submetida a alterações no pH ideal de cultivo"

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo no. 03/2003), intitulado: "Expressão diferencial de genes em *Acidithiobacillus ferrooxidans* submetida ao estresse induzido por pH, temperatura e privação de fósforo".

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo no. _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo no. _____).


Rogério Faria Bergamo
 Aluno


Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni
 - Orientadora -

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido



Nome: **Marcelo Massari**
 Função: **Residente da CIBio/ CBMEG**