

BC/34760

IB/81357

MARIA TERESA MARQUES NOVO

VARIABILIDADE GENÉTICA EM Thiobacillus spp.
E EFEITOS DE METAIS PESADOS
EM Thiobacillus ferrooxidans

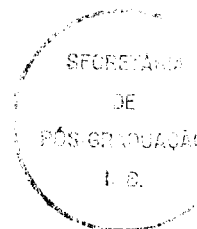
UNICAMP

1998

T/UNICAMP

N859
v

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA-CBMEG



**VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Thiobacillus* spp.
E EFEITOS DE METAIS PESADOS
EM *Thiobacillus ferrooxidans***

MARIA TERESA MARQUES NOVO

Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

este exemplar corresponde à redação final
da tese de doutorado (a) candidato a)
maria teresa
marques novo
para a Comissão Julgadora.

08/05/98
Laura m. m. e Ottoboni

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

**Campinas- SP
1998**

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
	252
	34760
	395198
	x
	R\$ 11,00
	11/08/98
	Nº 41153418

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

N859v

Novo, Maria Teresa Marques

Variabilidade genética em *Thiobacillus* spp. e efeitos de metais pesados em *Thiobacillus ferrooxidans* / Maria Teresa Marques Novo. – Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Thiobacillus ferrooxidans*. 2. *Thiobacillus*
thiooxidans. 3. Metais pesados. 4. Polimorfismo
(Genética). 5. Reação em cadeia de polimerase.
6. Proteínas-Análise. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Defesa Pública: Campinas, 08 de maio de 1998

Banca Examinadora

Titulares:

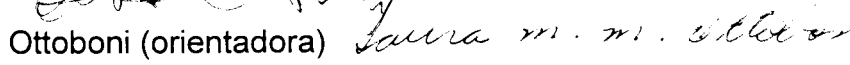
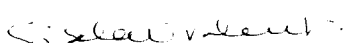
Dr. Gilson Paulo Manfio

Dra. Gisela Umbuzeiro Valent

Profa. Dra. Maria Célia Bertolini

Prof. Dr. Oswaldo Garcia Júnior

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (orientadora)



Suplentes:

Dra. Susi Aparecida Lanza Destéfano

Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato

*“Toda a sabedoria vem do Senhor Deus,
ela sempre esteve com Ele.
Ela existe antes de todos os séculos.
Quem pode contar os grãos de areia do
mar, as gotas de chuva, os dias do tempo?
Quem pode medir a altura do céu,
a extensão da terra, a profundidade do abismo?
Quem pode penetrar a sabedoria divina,
anterior a tudo?...”*
(Livro do Eclesiástico 1, 1-3)

*Dedico esta tese a vocês,
papai e mamãe,
incansáveis colaboradores desde sempre,
que tanto lutaram para guiar meus passos,
e me dar a Vida em plenitude...
As suas mãos, que tanto semearam,
esquecidas de si mesmas,
recebam a alegria desta colheita,
acompanhada do meu amor
a da minha mais profunda gratidão.*

Agradecimentos

À Profa. Laura M. M. Ottoboni, pela orientação e pelo empenho na consolidação desta nova linha de pesquisa.

Ao Gilson Manfio, pela importante contribuição ao trabalho de polimorfismos da região espaçadora do DNAr, pelo dinamismo e disponibilidade com que me assistiu em momentos decisivos e pela correção da tese na pré-banca.

Ao Prof. Oswaldo Garcia Jr., pela participação e cooperação em muitos momentos, pelo incentivo, amizade, e sobretudo pelo respeito e valorização que sempre demonstrou ao meu trabalho, durante os mais de 10 anos de convivência profissional.

À Paula C. P. Cabral, pela amizade e pelo seu empenho nos experimentos do DNAr, imprescindível para que o segundo artigo aqui apresentado pudesse ser realizado.

À Alba C. da Silva, Antonia Costacurta e Profa. Anete P. de Souza, pela importante contribuição aos trabalhos de fosforilação, eletroforese em duas dimensões e RAPD, respectivamente. Meu obrigado também ao Prof. Mário Monteguirfo, cujas sugestões contribuíram para a otimização da eletroforese em duas dimensões.

Às Profas. Yoko Bomura Rosato e Maria Célia Bertolini, pelo apoio, incentivo e correção da tese na pré-banca.

Ao Ronaldo Moreto, pela colaboração aos experimentos de respirometria e na purificação das linhagens de *Thiobacillus* spp.

Ao Márcio J. da Silva, pela solicitude, bom-humor e disponibilidade na realização das fotos dos incontáveis géis de proteínas e de DNA.

Ao Pedro Maurício, pelo trabalho dedicado e exemplar no preparo do material de laboratório, que constituiu grandiosa colaboração diária ao trabalho aqui apresentado.

Ao Celso Benedetti, pela colaboração em vários momentos e ao Felipe R. da Silva, pela ajuda nos momentos de sufoco com os computadores.

Ao pessoal da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, especialmente à Cristina Yoshie Umino, pela importação de algumas das linhagens de *Thiobacillus* spp.

Aos Prof. Paulo Arruda e Adilson Leite, por terem me assistido em meu Mestrado, propiciando os primeiros passos nos estudos de Genética Molecular de *T. ferrooxidans*.

A CAPES e FAEP/ UNICAMP, pelo apoio financeiro.

Ao trabalho incansável das secretárias do CBMEG, Cláudia, Sandra, Tânia e Fabiana e às secretárias do Depto. de Genética e Evolução, Teresa e Célia, pela atenção e auxílio constantes.

Aos funcionários Sr. Manoel, João, Chico e Wilson.

Aos antigos companheiros de laboratório Marília, Lyriam e Gonçalo, pela amizade e pelas saudades que deixaram.

Aos companheiros de hoje: Jorge, Eliana, Rogério, Luciana, Paula, Renata, Edmilson, Sandrinha, Henrique, Cene, Mano, Lisa e Gaelli, pela alegre e partilhada vivência de todos os dias. À Lucy e a Antonia, pela amizade e companhia em vários experimentos. E à querida Claudete, amiga, companheira, que me compreendeu nos momentos de dificuldades, e trouxe alívio e alegria para os dias mais difíceis .

Aos companheiros do Laboratório de Genética de Plantas: Germano, Andrés e Marymar, pela valiosa convivência de tantos anos e pelas experiências partilhadas de fé. À Alba, Sílvia, Dante, Celso, Márcio, Adriana, Edson, Karen, Ivan, Felipe, Suzana, André, Fábio, Rodrigo e Cíntia, que tornaram mais alegres e descontraídos os meus dias de trabalho. À Berenice e Luciana Lanza, que deixaram saudades. .

À minha querida amiga-irmã Maria Elena, pela amizade de valor inestimável, pelas experiências e reflexões partilhadas de todos esses anos, pelo exemplo de fé.

A todos do CBMEG, alunos e professores.

À toda minha família, a meus irmãos, especialmente a Cecília, Júnior e João, companheiros e participantes dos meus dias em Campinas, e à Maria Alice, pela partilha recíproca dos momentos de luta.

À minha prima-madrinha Rita pelo exemplo de coragem e por ter me dado força em tantos momentos.

A Benedito, Alice e Carlos, por terem participado das minhas dificuldades, e pelo convívio especial de tantos anos.

*“... Mas, que poderei retribuir ao Senhor
Por tudo o que Ele me tem dado?...” (Salmos 115, 3)*

*“... E em tudo isso, glorifica o Senhor que te criou,
e que te cumula de todos os seus bens.” (Eccl 32, 17)*

*Querido Paulo Mansur,
não há palavras que possam expressar
o valor da tua presença em toda esta caminhada,
ou o valor do teu abraço e do teu coração acolhedor,
principalmente nos momentos mais difíceis.
Quantas vezes o teu carinho foi abrigo,
como a sombra que protege do sol do meio-dia,
e me refez e deu forças
para chegar até aqui!...*

*“Os que semeiam entre lágrimas,
recolherão com alegria.
Na ida, caminham chorando,
os que levam a semente a espalhar.
Na volta, virão com alegria,
Quando trouxerem os seus feixes.”
(Salmos 125, 5-6)*

ÍNDICE

Resumo	XI
<i>Summary</i>	XIII
Introdução	01
Revisão Bibliográfica	06
1. <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> : considerações iniciais	06
2. Filogenia	07
3. Plasmídios	10
4. Recombinação gênica	10
5. Clonagem e expressão gênica	11
6. Resposta celular ao estresse	12
7. Resistência e adaptação a altas concentrações de metais	12
8. Clonagem e caracterização dos genes de resistência a mercúrio	16
9. Indução de proteína quelante por cádmio em <i>Thiobacillus</i> sp.	17
10. Resistência a metais em outros microrganismos	17
Objetivos Gerais	25
Objetivos Específicos	25
Artigo 1: “ <i>RAPD genomic fingerprinting differentiates Thiobacillus ferrooxidans strains</i> ”	27
Artigo 2: “ <i>Differentiation of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans by 16S-23S rDNA spacer polymorphisms</i> ”	32
Artigo 3: “ <i>Thiobacillus ferrooxidans response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and phosphorylation</i> ”	54
Discussão Geral	83
Conclusões	89
Referências Bibliográficas	91

RESUMO

O trabalho aqui apresentado divide-se em duas partes distintas. Numa primeira parte foi investigada a variabilidade genética em *Thiobacillus* spp., através de RAPD e RFLP da região espaçadora do DNA ribossômico 16S-23S. A segunda parte do trabalho refere-se a estudos relacionados aos mecanismos de resistência a metais pesados em *Thiobacillus ferrooxidans*.

A variabilidade do DNA genômico de 8 linhagens de *T. ferrooxidans* foi investigada através de RAPD, por amplificações do DNA com 30 *primers*. A maioria dos *primers* dividiu as linhagens estudadas em dois grupos distintos- Grupo 1: linhagens S, SSP, V3, AMF e Grupo 2: linhagens CMV, FG-460, I-35, LR. Embora as linhagens do Grupo 2 estejam estreitamente relacionadas entre si (valores de similaridade de 94 a 98%), um alto grau de diversidade genômica foi detectado entre as linhagens do Grupo 1 e do Grupo 2 (valores de similaridade de 0,5% a 2,2%).

A variabilidade da região espaçadora do DNA ribossômico 16S-23S de 22 linhagens de *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans* (incluindo-se também a linhagem tipo de *T. caldus*), foi analisada através de RFLP, após amplificação dessa região por PCR. A análise de restrição com 5 enzimas (*Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Msp* I) possibilitou, além da diferenciação das três espécies, a divisão das linhagens de *T. ferrooxidans* em pelo menos 5 grupos. As linhagens de *T. thiooxidans* apresentaram padrão de restrição mais homogêneo que as linhagens de *T. ferrooxidans*, sendo que apenas a linhagem DAMS apresentou um padrão distinto com as enzimas *Dde* I, *Hae* III e *Hinf* I.

Os estudos relacionados com os efeitos de cobre e outros metais pesados sobre o crescimento, síntese protéica e fosforilação em *T. ferrooxidans* foram realizados utilizando-se a linhagem LR, selecionada dentre oito linhagens testadas, como uma das menos susceptíveis a cobre em experimentos de respirometria.

O cultivo prévio de *T. ferrooxidans* LR em cobre possibilitou uma diminuição significativa do tempo requerido para a oxidação total do Fe^{+2} na presença desse metal, em relação às células não previamente tratadas por cobre. No entanto, quando as células foram previamente crescidas na presença de cobre, a oxidação do Fe^{+2} foi totalmente inibida na presença de outros metais, como cádmio, níquel e zinco.

Proteínas totais de células de *T. ferrooxidans* LR, crescidas na presença de cobre, cádmio, níquel ou zinco foram analisadas através de eletroforese em duas dimensões. O aumento na síntese de proteínas específicas foi detectado para o cobre (pesos moleculares aparentes de 16, 28 e 42 kDa) e cádmio (66 kDa), enquanto a síntese de algumas proteínas (105 e 54 kDa) foi reprimida por todos os metais testados.

A análise em gel de SDS-PAGE demonstrou a indução por cobre de proteínas de membrana (43, 48, 53 e 60 kDa) e do citosol (28 e 39 kDa). Também foi detectada a repressão da síntese de proteínas de 36 e 30 kDa na fração citosólica e de 96, 70, 34 e 28,5 kDa na fração de membrana.

Um aumento no nível da fosforilação *in vitro* de proteínas do citosol e da membrana também foi observado após cultivo das células na presença de cobre, sugerindo o envolvimento desse processo no mecanismo de resistência a cobre em *T. ferrooxidans*.

SUMMARY

This work presents two distinct parts. In the first part, the genetic variability among thiobacilli strains was investigated by RAPD and RFLP of the 16S-23S intergenic spacer region of ribosomal DNA. The second part refers to studies related to mechanisms of heavy metal resistance in *T. ferrooxidans*.

The genomic variability among eight *T. ferrooxidans* strains was investigated by RAPD analysis, through DNA amplifications with 30 primers. Most primers divided *T. ferrooxidans* into two distinct groups, Group 1 encompassing strains S, SSP, V3, AMF and Group 2 with strains CMV, FG-460, I-35, LR. Group 2 strains were closely related (similarity values of 94 to 98%), but a high degree of genomic diversity was detected among strains of Group 1 and Group 2 (similarity values of 0.5% to 2.2%).

RFLP analysis of PCR-amplified 16S-23S rDNA spacer region of 22 *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* strains (including *T. caldus* type strain), using the enzymes *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I and *Msp* I, divided *T. ferrooxidans* strains into at least five RFLP groups. *T. thiooxidans* strains yielded more homogeneous RFLP patterns, except for strain DAMS, which showed a distinct pattern with *Dde* I, *Hae* III e *Hinf* I.

The effects of copper and other heavy metals in the growth, protein synthesis and phosphorylation were evaluated in *T. ferrooxidans* strain LR, selected among eight strains as one of the least susceptible to copper in respirometric experiments.

Cultivation of *T. ferrooxidans* LR in the presence of copper caused a significant decrease in the time required for total iron oxidation in the presence of this metal, in relation to untreated cells. However, when bacterial cells were previously grown in the presence of copper, iron oxidation was totally inhibited in the presence of other metals, such as cadmium, nickel and zinc.

Total proteins of *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of copper, cadmium, nickel or zinc were analysed by two-dimensional electrophoresis. Copper induced the synthesis of specific proteins with apparent molecular weight of 16, 28 and 42 kDa, whereas cadmium induced a 66 kDa protein. Some proteins (54 and 105 kDa) were repressed by all the metals tested.

Copper-induced membrane proteins of apparent molecular weight of 43, 48, 53 and 60 kDa were detected by SDS PAGE, whereas proteins of 28 and 40 kDa were induced in the cytosolic fraction. It was also detected the repression of 30 and 36 kDa proteins in the cytosolic fraction and 28.5, 34, 70 and 96 kDa proteins in the membrane fraction.

An increase of *in vitro* phosphorylation levels of cytosolic and membrane proteins was also observed when cells were grown in the presence of copper, suggesting the involvement of this process in the resistance mechanism to copper in *T. ferrooxidans*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Thiobacillus* (Bacteria, Proteobacteria, subdivisão β) é atualmente constituído por bactérias que se apresentam na forma de bastonetes, as quais obtêm energia para seu crescimento autotrófico a partir da oxidação de substratos contendo enxofre inorgânico (Kelly & Harrison, 1984). Consequentemente, esse gênero compreende espécies que têm diferentes necessidades nutricionais, de temperatura e de pH, abrangendo uma grande variedade de organismos com diferentes características metabólicas e fisiológicas: acidofílicos, neutrofílicos, termofílicos, denitrificantes e heterotróficos facultativos (Kuenen *et al.*, 1992). Os primeiros organismos descritos, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus thiooxidans*, são estritamente quimioautotróficos, apresentando um metabolismo altamente específico.

T. ferrooxidans e *T. thiooxidans* são bactérias Gram-negativas, aeróbias obrigatórias e que fixam o dióxido de carbono atmosférico. *T. thiooxidans* cresce em valores de pH entre 1,0 e 4,0, sendo o pH ótimo 2,5, e utiliza enxofre elementar ou compostos reduzidos de enxofre como substrato oxidável. *Thiobacillus ferrooxidans* é a única espécie do gênero capaz de catalisar a oxidação do íon ferroso, aumentando de 10^5 a 10^6 a velocidade da reação. A espécie também é acidofílica, pois seu pH ótimo de crescimento é aproximadamente 2,0, ocorrendo entretanto, crescimento numa faixa de pH entre 1,2 a 4,0 (Golomzik & Ivanov, 1965; Tuovinen & Kelly, 1972; Pivovarova &

Golovacheva, 1985). Basicamente, *T. ferrooxidans* necessita de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (Beck & Shafia, 1964; Howard & Lundgren, 1970; Tuovinen & Kelly, 1972; Tuovinen *et al.*, 1979) e um substrato inorgânico oxidável como fonte de energia, que pode ser o íon Fe^{2+} , enxofre elementar, tiosulfato ou ainda um sulfeto metálico, como por exemplo a pirita, FeS_2 , principal substrato mineral utilizado pela bactéria.

Nos últimos anos, os estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos de *T. ferrooxidans* têm se intensificado pelo fato do mesmo ser um dos principais microrganismos responsáveis pela lixiviação bacteriana de metais, ou biolixiviação, processo no qual o metabolismo microbiano causa a solubilização de metais de minérios. A ação bacteriana ocorre naturalmente em minérios que apresentam em sua constituição formas reduzidas de enxofre e ferro. Fundamentalmente, a base do processo de lixiviação bacteriana consiste na produção de soluções ácidas de sulfato férrico, eficiente agente lixiviante de metais, como resultado do metabolismo oxidativo de *T. ferrooxidans* em substratos minerais sulfetados (Garcia, 1997). Atualmente, a biolixiviação é aplicada em escala industrial para recuperação de cobre e urânio em vários países. Metais preciosos também podem ser obtidos utilizando-se esse processo, como é o caso do ouro, sendo que unidades de produção já estão em operação no Brasil e em países como África do Sul, Austrália e Gana (Lawrence & Poulin, 1995).

Uma característica fisiológica marcante e altamente interessante de *T. ferrooxidans* é a sua generalizada resistência a altas concentrações de íons

metálicos, inclusive metais pesados. Isto pode ser atribuído à presença constante de metais no próprio habitat da bactéria, fator que provavelmente determinou a seleção de tipos mais resistentes ao longo da evolução. Embora os mecanismos que determinam essa resistência não sejam muito conhecidos, sabe-se que *T. ferrooxidans* apresenta resistência elevada ao alumínio, zinco, cobalto, manganês, cobre, cromo e urânio, segundo revisões de Brierley (1978), Lundgren & Silver (1980), Hutchins *et al.* (1986) e Rawlings & Kusano (1994).

A capacidade de crescimento desse microrganismo em condições ambientais hostis à maioria das bactérias heterotróficas (*i.e.*, alta acidez e concentrações elevadas de metais) o torna interessante para estudos dos determinantes genéticos dessas características. Assim, *T. ferrooxidans* pode ser potencialmente útil para o isolamento de genes que conferem resistência a metais pesados.

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

biotecnológica. Microrganismos mais resistentes a cobre, por exemplo, poderiam ser utilizados como biosorventes para recuperação do metal de soluções industriais e como um recurso para descontaminação de resíduos industriais.

O estudo da diversidade genômica e do *status* taxonômico das linhagens brasileiras de *T. ferrooxidans* é de fundamental importância para a caracterização desse material biológico, utilizado nos estudos de resistência a metais. Assim sendo, a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990) foi utilizada na caracterização inicial de oito linhagens de *T. ferrooxidans*, seis das quais isoladas de ambientes brasileiros. Esta etapa do trabalho possibilitou uma visão geral da variabilidade genômica das linhagens estudadas e os resultados obtidos constam do artigo publicado “*RAPD genomic fingerprinting differentiates Thiobacillus ferrooxidans strains*” (Novo *et al.*, 1996).

A caracterização de 22 linhagens de *Thiobacillus* spp. (incluindo as 8 linhagens analisadas por RAPD) através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) das regiões espaçadoras do DNA ribossômico 16S-23S, foi realizada após amplificação dessa região por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Estes estudos demonstraram a utilidade dessa técnica na rápida caracterização de novos isolados e a maior heterogeneidade entre linhagens de *T. ferrooxidans*, em comparação com as linhagens de *T. thiooxidans* analisadas. Esta etapa do trabalho consta do artigo “*Differentiation of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans by 16S-23S rDNA spacer polymorphisms*” (Novo *et al.*, submetido para publicação na revista *Applied and*

Environmental Microbiology).

No estudo dos efeitos dos metais pesados cobre, cádmio, níquel e zinco no crescimento bacteriano e na síntese protéica, além do efeito do cobre na fosforilação de proteínas em *T. ferrooxidans*, foi dado especial enfoque para o cobre devido a sua importância em biolixiviação e aos problemas decorrentes da contaminação de cobre no meio ambiente. Tais estudos forneceram indícios da importância de processos indutivos e da sua especificidade no mecanismo de resistência ao cobre em *T. ferrooxidans*, bem como o possível envolvimento da fosforilação de proteínas. Esta etapa do trabalho consta do artigo "*Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and phosphorylation" (Novo et al., submetido para publicação na revista *Applied and Environmental Microbiology*).

O desenvolvimento do trabalho aqui apresentado possibilitou a consolidação dessa linha de pesquisa, através da viabilização de projetos elaborados durante este trabalho de tese ⁽¹⁾, e abriu novas perspectivas de estudos em Biologia Molecular de *Thiobacillus* spp., área de pesquisa ainda incipiente no Brasil.

(1) "Estudo dos mecanismos de tolerância ao alumínio e manganês em *Thiobacillus ferrooxidans*" (financiado pelo CNPq e já concluído) e "*Thiobacillus ferrooxidans*: Filogenia e Caracterização da Resistência a Metais" (financiado pela FAPESP e ainda em andamento).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Thiobacillus ferrooxidans*: considerações iniciais

Durante vários anos, poucos trabalhos foram realizados objetivando-se um melhoramento do processo de lixiviação bacteriana pela manipulação genética do microrganismo. Isso se deve ao fato que o sistema de lixiviação bacteriana de minérios em pilhas se processa de uma forma quase rudimentar e está sujeito às modificações próprias de um sistema aberto, onde o ambiente atua como potente agente selecionador de espécies e linhagens mais eficientes para o processo (Tuovinen & Kelly, 1972).

Entretanto, um nível tecnológico mais avançado do processo está sendo requerido para o aproveitamento em bioreatores de concentrados sulfetados ou de materiais contendo metais valiosos, como por exemplo, o ouro. Tais sistemas, rigorosamente controlados, exigem a utilização de linhagens bacterianas eficientes, que apresentem, por exemplo, taxas mais elevadas de oxidação dos substratos e maior resistência a metais tóxicos, entre outras características (Garcia, 1997).

Os estudos genéticos com *T. ferrooxidans* tiveram início no final da década de 70, com trabalhos de genética clássica realizados por Groudeva e colaboradores. Tais trabalhos demonstraram a existência de variabilidade genética natural na espécie através de curvas de sobrevivência a agentes mutagênicos (Groudeva *et al.*, 1978a). Mutagênicos químicos e luz ultravioleta

foram utilizados para indução de mutantes, (Groudeva *et al.*, 1978b, c; Groudeva *et al.*, 1980), obtendo-se uma variabilidade de 20 a 180% em relação à atividade oxidativa da linhagem selvagem. Tais estudos comprovaram o potencial da espécie para o melhoramento genético.

Trabalhos adicionais detectaram ainda variabilidade natural quanto às atividades de lixiviação de ZnS e CuS (Groudev, 1980a, b) e quanto a parâmetros cinéticos e à resistência a urânio, tório, níquel e cobre (Dispirito & Tuovinen 1982; Leduc *et al.*, 1997). Garcia e Silva (1991) também mostraram variabilidade natural entre linhagens isoladas de minas brasileiras, quanto à resistência a cobre, cobalto, mercúrio e prata.

Paralelamente à caracterização dos tiobacilos e divisão dos mesmos em grupos fisiológicos distintos, estudos genéticos baseados no conteúdo genômico de G+C e hibridização DNA-DNA foram realizados (Harrison, 1982; 1983). A diversidade de valores de G+C e de grupos de homologia de DNA entre linhagens de *T. ferrooxidans* revelaram o alto grau de diversidade genômica dentro da espécie (Harrison, 1982).

2. Filogenia

Análises filogenéticas do RNA ribossômico 5S (Lane *et al.*, 1985) e 16S (Lane *et al.*, 1992; Goebel & Stackebrandt, 1994) demonstraram que as espécies de *Thiobacillus* estão distribuídas em três subclasses (α , β e γ) das proteobactérias, embora a maioria das linhagens, incluindo representantes de

três grupos de homologia de Harrison (1982) tenham sido agrupadas em um grupo filogenético único. Uma exceção foi a linhagem de *T. ferrooxidans* m-1, que se diferenciou do agrupamento principal. Diferentemente da linhagem m-1, duas linhagens de *T. thiooxidans*, incluindo a linhagem tipo ATCC 19377, foram incluídas no grupo principal de *T. ferrooxidans* (Lane *et al.*, 1992), na subdivisão β (Woese, 1987) das *Proteobacteria*.

Na classificação filogenética de bactérias baseadas nas sequências de RNAr 16S do RDP (Ribosomal Database Project, Olsen *et al.*, 1992), as espécies de *Thiobacillus* mais próximas de *T. ferrooxidans* são *T. thiooxidans* e *T. caldus*, incluindo *T. tepidarius* na periferia do grupo (Figura 1). A heterogeneidade filogenética de *T. ferrooxidans* é demonstrada pelos dois agrupamentos evidenciados na árvore filogenética (Figura 1) e pela ocorrência de várias linhagens isoladas associadas a outros grupos de bactérias filogeneticamente distintos em outras posições da árvore (Olsen *et al.*, 1992). Assim, sabendo-se que a habilidade para oxidar enxofre é comum a muitos grupos de bactérias Gram-negativas, essa capacidade metabólica, juntamente com a morfologia celular de bastonete, não é parâmetro criterioso para a inclusão de espécies no gênero *Thiobacillus*, o qual necessita de uma revisão taxonômica (Moreira & Amils, 1997).

Segundo revisão de Rawlings e Kusano (1994), há suficiente variabilidade entre linhagens de *T. ferrooxidans* para que as mesmas sejam subdivididas em várias espécies dentro do gênero. O gênero *Thiobacillus* também inclui muitas bactérias neutrofilicas e autotróficas facultativas, cujas sequências de RNAr 16S e características fisiológicas são tão distintas das acidofílicas típicas e autotróficas obrigatórias, *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*, que elas não deveriam integrar o mesmo gênero (Rawlings & Kusano, 1994).

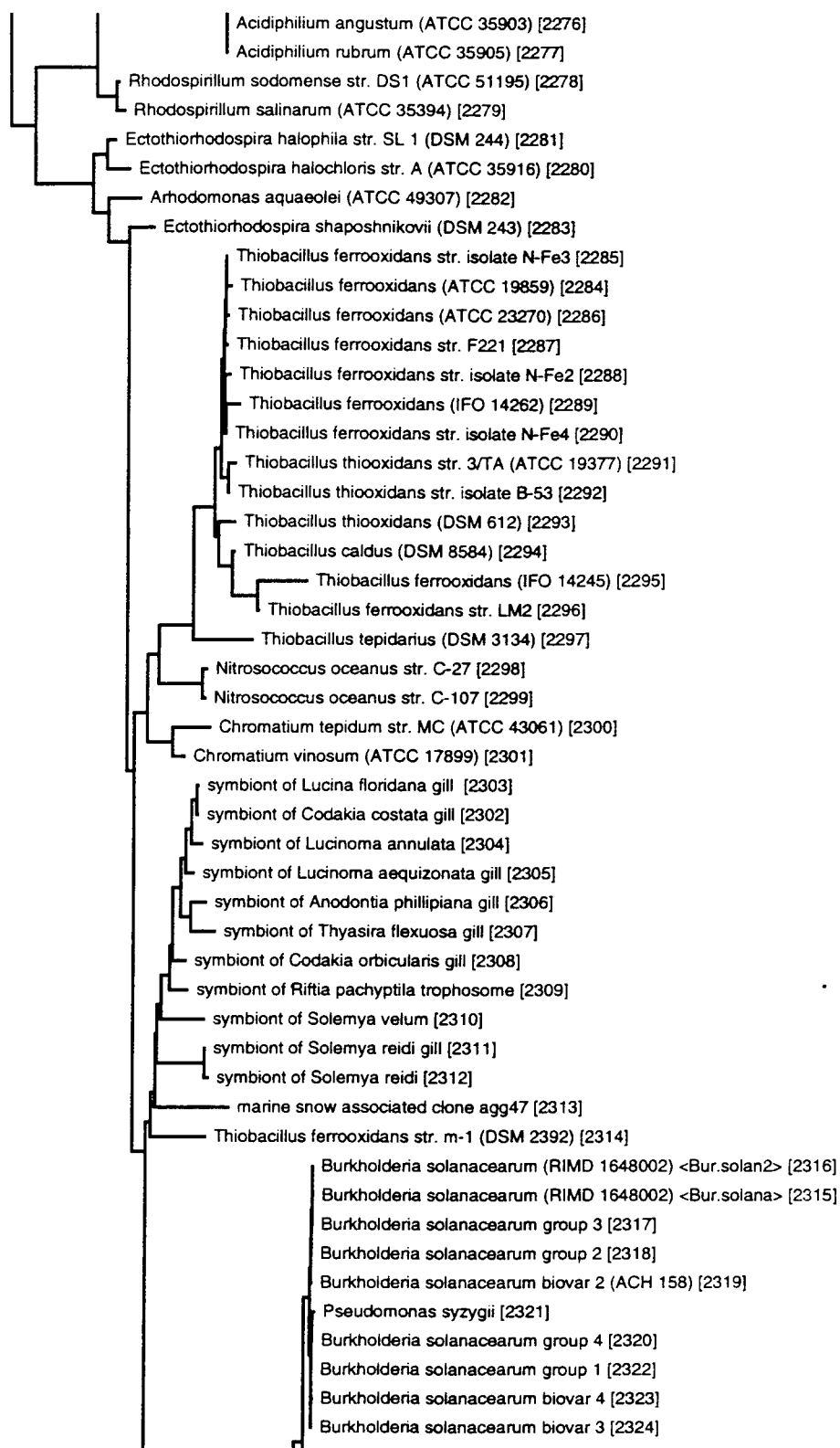


FIGURA 1. Classificação filogenética de linhagens de *T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans* baseada em sequências de RNAr 16S (Ribosomal Database Project, Olsen *et al.*, 1992).

3. Plasmídios

Estudos da ocorrência de plasmídios em *T. ferrooxidans* foram realizados na tentativa de se correlacionar sua presença com a alta resistência a metais. Martin *et al.* (1981) determinaram o padrão plasmidial de 15 linhagens de *T. ferrooxidans*. Enquanto que apenas 4 linhagens não apresentaram plasmídios, uma das linhagens apresentou 5 plasmídios diferentes. Shiratori *et al.* (1991) determinaram que em mais de 100 linhagens de *T. ferrooxidans*, cerca de 73% possuíam mais de um plasmídio (de tamanhos entre 2 e 30 kb), sendo que dois plasmídios, oriundos de diferentes linhagens, apresentaram alta homologia. Apesar da quase totalidade das linhagens selvagens examinadas de *T. ferrooxidans* possuírem plasmídios, os mesmos não foram ainda correlacionados com qualquer característica.

4. Recombinação gênica

Mecanismos de recombinação gênica para o *T. ferrooxidans* também têm sido estudados. Embora não tenham sido isolados plasmídios auto-transferíveis de *T. ferrooxidans*, são conhecidos pelo menos três plasmídios da bactéria que podem ser mobilizados entre linhagens de *E. coli* (Rawlings & Woods, 1985). Uma das poucas descrições da transformação de uma espécie de *Thiobacillus* se refere ao *Thiobacillus thioparus* (Yankofsky *et al.*, 1983). A transformação de *T. thioparus* auxotrófico para prototrófico foi realizada pela exposição de células

em crescimento exponencial ao DNA cromossômico de espécies prototróficas.

Kusano *et al.* (1992) realizaram a transformação de linhagens de *T. ferrooxidans* sensíveis ao mercúrio através de eletroporação com plasmídios recombinantes, construídos pela clonagem do operon que confere resistência ao mercúrio (marcador genético) em um plasmídio críptico de *T. ferrooxidans*. Contudo, somente uma dentre 30 linhagens testadas foi transformada e a expressão dos genes *mer* foi insatisfatória.

Tentativas de transferência de plasmídios de *E. coli* para *T. ferrooxidans* foram bem sucedidas através de conjugação. Genes originários da bactéria heterotrófica, clonados no vetor de largo espectro de hospedeiros pJRD215, foram expressos de maneira estável na bactéria autotrófica (Peng *et al.*, 1994a). Em experimentos posteriores, Peng *et al.* (1994b) expressaram genes heterólogos de resistência a arsênio em *T. ferrooxidans*.

5. Clonagem e expressão gênica

Trabalhos de isolamento e caracterização de genes cromossomais ou plasmidiais de *T. ferrooxidans* evidenciaram que, em geral, as seqüências de nucleotídios de genes estruturais do *T. ferrooxidans* apresentam alta homologia com seqüências de outras bactérias, sendo que o grau de similaridade varia para diferentes espécies (Barros *et al.*, 1985; Ramesar *et al.*, 1988). Pode-se concluir ainda que a regulação da expressão gênica no organismo acidofílico autotrófico é bastante similar a de organismos heterotróficos (Rawlings *et al.*, 1987; Takamiya *et al.*, 1990).

6. Resposta celular ao estresse

As respostas adaptativas a condições de estresse em *T. ferrooxidans* tem sido estudadas principalmente com relação à falta de fosfato (Seeger & Jerez, 1992, 1993), choque térmico (Jerez, 1988), mudanças de pH (Amaro *et al.*, 1991), entre outras (Jerez *et al.*, 1988). Seeger e co-autores (1996) demonstraram mudanças no nível de fosforilação das chaperonas DnaK e GroEL e de outras proteínas quando células de *T. ferrooxidans* foram submetidas à falta de fosfato. Esses autores sugeriram que a fosforilação das chaperonas possivelmente está envolvida na percepção e regulação das respostas a estresse nessa bactéria.

7. Resistência e adaptação a altas concentrações de metais

T. ferrooxidans apresenta resistência generalizada a altas concentrações de metais (Tuovinen *et al.*, 1971), normalmente presentes em seu habitat, tóxicas à maioria das bactérias. De acordo com as revisões de Brierley (1978), Lundgren & Silver (1980) e Hutchins *et al.* (1986), *T. ferrooxidans* apresenta resistência ao alumínio (0,37 M), manganês (0,18 M), zinco (0,15 M), cobalto (0,17 M), cobre (0,16 M), cromo (0,1 M) e urânio (0,01 M). Os níveis de resistência são reduzidos para íons como prata (10^{-5} M), mercúrio (10^{-4} M), molibdênio (10^{-3} M), selênio, telúrio e arsênio (10^{-3} M).

Linhagens de *T. ferrooxidans* que não são afetadas por concentrações de

cobre até 160 mM têm sido descritas (Leduc & Ferroni, 1993), enquanto bactérias heterotróficas toleram apenas 1 a 2 mM do metal (Duxbury & Bicknell, 1983; Tetaz & Luke, 1983). Têm sido relatados também trabalhos que utilizam linhagens de *T. ferrooxidans* adaptadas a concentrações crescentes de cobre (Natarajan *et al.*, 1994; Pramila *et al.*, 1996) ou zinco (Kondratyeva *et al.*, 1995), processo este que acarreta o aumento do nível de resistência. Linhagens de *T. ferrooxidans* adaptadas apresentaram crescimento na presença de 470 mM de cobre (Pramila *et al.* 1996) e 1 M de zinco (Kondratyeva *et al.*, 1995). Natarajan *et al.* (1994) demonstraram que a resistência desenvolvida pela adaptação a cobre é estresse-dependente e não um traço permanente da linhagem adaptada.

Holmes e colaboradores (Holmes *et al.*, 1988; Holmes & Haq, 1989) sugeriram que sequências repetitivas móveis de DNA, as quais têm sido encontradas tanto no DNA cromossomal como plasmidial de várias linhagens de *T. ferrooxidans* (Yates & Holmes, 1987; Yates *et al.*, 1988), estão envolvidas no mecanismo de adaptação, através da promoção de recombinações, tanto intra-cromossomal como plasmídio-cromossomal. Como fundamento para tal hipótese, Holmes e Haq (1989) analisaram as posições genômicas de sequências repetitivas específicas, antes e depois de vários meses de subcultivo na presença de altas concentrações de cobre, detectando alterações na localização de uma dessas sequências.

Em relação à especificidade do processo de adaptação a metais, poucos trabalhos têm sido relatados. Natarajan *et al.* (1994) sugeriram que os crescentes períodos lag observados em altos níveis de cobre poderiam indicar

que o mecanismo celular é especificamente afetado por diferentes níveis de cátions metálicos. Brahmaaprakash *et al.* (1988) também sugeriram metal-especificidade dos mecanismos de proteção celular em *T. ferrooxidans*, apenas com base na observação de que os períodos lag diferiram para cobre e zinco.

Quanto à indução de proteínas por metais, Jerez *et al.* (1988) não detectaram alteração no padrão de síntese protéica da linhagem de *T. ferrooxidans* ATCC 19859, após transferências dos microrganismos para 50 mM de uranilo ou para cádmio e cobre em concentrações acima de 200 mM.

Kondratyeva *et al.* (1995) compararam os perfis de restrição do DNA cromossomal de uma linhagem de *T. ferrooxidans* antes e após adaptação a zinco ou arsênio, através de eletroforese de campo-pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*). Os autores detectaram amplificação de fragmentos de 28 kb e 98 kb nas linhagens adaptadas a arsênio e zinco, respectivamente, o que não ocorreu nas linhagens não adaptadas. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o aumento da resistência em *T. ferrooxidans* após adaptação a metais tóxicos é devido ao aumento do número de cópias dos genes de resistência cromossomais e, conseqüentemente, do aumento na síntese das proteínas envolvidas.

Com o objetivo de determinar se a resistência a altas concentrações de metais tóxicos é codificada por plasmídios, Pramila *et al.* (1996) investigaram os perfis de elementos extra-cromossomais na linhagem-selvagem MAL-4 de *T. ferrooxidans* antes e após adaptação da mesma a 470 mM de cobre. Enquanto a

linhagem-selvagem apresentou múltiplos plasmídios, culturas adaptadas a concentrações de cobre a partir de 300 mM mostraram uma redução acentuada no número de cópias dos mesmos, sendo que a redução para 3 plasmídios foi estimada ser acima de 50 vezes. Tal efeito foi demonstrado ser específico para o cobre, pois a redução no número de cópias não foi observada para linhagens adaptadas a altas concentrações de sulfato de sódio ou zinco; porém, efeito similar ao cobre foi observado para o mercúrio, para o qual a resistência é codificada por genes cromossomais (Shiratori *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1989).

Após retorno das linhagens adaptadas a cobre ou mercúrio ao crescimento na ausência desses metais, os níveis plasmidiais anteriores à adaptação foram restaurados. Pramila *et al.* (1996) sugeriram que a seleção negativa dos íons cobre sobre o número de cópias de plasmídios é um indício da origem cromossomal da resistência a cobre em *T. ferrooxidans*. Determinantes cromossomais induzíveis de resistência a cobre também foram descritos em *Pseudomonas* (Vargas *et al.*, 1995).

Várias tentativas tem sido feitas no sentido de se correlacionar a presença de plasmídios nativos de linhagens de *T. ferrooxidans* com a resistência a metais, mas não se tem obtido sucesso. Parte desse problema se deve ao fato de que, sem um marcador selecionável, a cura de plasmídios se torna muito difícil; além disso, nenhuma tentativa de cura foi bem sucedida, pelo que se tem conhecimento (Rawlings & Kusano, 1994).

8. Clonagem e caracterização dos genes de resistência a mercúrio

Embora *T. ferrooxidans* seja comprovadamente resistente a altas concentrações de metais pesados, praticamente não são conhecidos os mecanismos genéticos que conferem essa resistência. A única exceção se refere ao mercúrio, sendo que os genes que conferem resistência a esse metal em *T. ferrooxidans* foram clonados e expressos em *E. coli* (Shiratori *et al.*, 1989). O operon que conferiu resistência ao mercúrio em *E. coli*, é composto de pelo menos 2 genes, um gene tipo *merC*, que codifica proteína capaz de captar Hg^+ através da membrana, e o gene *merA*, que codifica a mercúrio-redutase, proteína responsável pela volatilização do mercúrio como Hg^0 , cuja sequência nucleotídica foi determinada por Inoue *et al.* (1989).

Foi demonstrado também que a co-transcrição de *merA* e *merC* está sob controle de um possível promotor (sequência de 70 a 100 pb *upstream* do códon de início de *merC*), de sequência altamente homóloga ao promotor de *merT* de outros sistemas *mer* de bactérias Gram-negativas, embora não se tenha observado nenhuma sequência homóloga a *merT*, *merR*, *merP* ou *merD*, constituintes do operon *mer* em R100 (Inoue *et al.*, 1989). Além disso, o transcrito *mer* em *T. ferrooxidans* só foi detectado em células induzidas por Hg^{2+} (operon *mer* indutível). Os genes de *T. ferrooxidans* associados com a resistência a mercúrio diferem de outras bactérias tanto no seu arranjo no operon, como devido ao fato de tais genes serem cromossomais e não plasmidiais.

9. Indução de proteína quelante por cádmio em *Thiobacillus* sp

Metalotioneínas são um grupo de proteínas de baixo peso molecular com alto conteúdo de cisteína, que se ligam a metais pesados e que tem sido isoladas e caracterizadas a partir de vertebrados, invertebrados, plantas e eucariotos unicelulares. Tais proteínas tem sido encontradas também em certos procariotos, tais como *Pseudomonas putida* (Higham & Sadler, 1984) e *Thiobacillus thiooxidans* (Sakamoto *et al.*, 1989). Recentemente, porém, Yoshida *et al.* (1993) apresentaram uma primeira evidência conclusiva para a existência de um novo tipo de proteína ligante de metal pesado em microrganismos: uma proteína de *Thiobacillus* sp. de alto peso molecular, que é induzida por íons cádmio, e que apresenta alto conteúdo de histidina e baixos níveis de cisteína.

10. Resistência a metais em outros microrganismos

A resistência dos microrganismos a metais tóxicos é bem documentada (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994; Ji & Silver, 1995; Silver, 1996; Silver & Phung, 1996; Rouch & Brown, 1997). A transformação e bioacumulação de metais pesados é geralmente mediada por microrganismos. Devido ao potencial de expansão do uso de microrganismos não somente na lixiviação mineral e recuperação de metais, como também na detoxificação de metais pesados (Collins & Stotsky, 1989), os aspectos genéticos básicos ou aplicados da

resistência a metais em microrganismos tem adquirido importância considerável.

Basicamente, os mecanismos bacterianos conhecidos de resistência a metais são quatro (Silver, 1992): (1) através de alterações no sistema de transporte da membrana o íon tóxico é mantido exteriormente à célula; (2) seqüestramento intracelular ou extracelular por componentes que se ligam ao íon metálico (análogo às metalotioneínas dos eucariotos e às fitoquelatinas das plantas, mas geralmente ao nível da parede celular bacteriana); (3) sistemas de efluxo altamente específicos para cátions ou ânions, codificado por genes de resistência (é o mecanismo bacteriano mais comum de resistência a íons metálicos, sendo codificado por plasmídios); (4) detoxificação do cátion ou ânion por conversão enzimática em uma forma menos tóxica (exemplos: oxidação do As^{3+} e redução do Cr^{6+} ; esse processo bacteriano não tem sido associado a plasmídios).

Até agora alguns mecanismos de resistência a metais, tais como arsênio e antimônio (Kaur & Rosen, 1992), cádmio, cobre (Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994), cromo (Cervantes & Silver, 1992), mercúrio (Misra, 1992) e telúrio (Walter & Taylor, 1992), foram caracterizados em vários organismos (Silver & Misra, 1988). Foram já isolados genes codificando resistência ao cádmio, cobalto, zinco (Nies *et al.*, 1987) e cobre (Bender & Cooksey, 1987), sendo que tais genes são freqüentemente encontrados em plasmídios e transposons.

Diferentemente dos metais pesados tóxicos mercúrio e cádmio, por exemplo, que não possuem função biológica benéfica conhecida, os cátions

divalentes cobalto, zinco e níquel são utilizados como nutrientes por bactérias, sendo requeridos como elementos-traço em concentrações nanomolares. Entretanto, em concentrações mais elevadas, da ordem de micromolar ou milimolar, tais elementos-traço se tornam geralmente tóxicos. Segundo revisão de Nies (1992), esses cátions são transportados para o interior da célula por sistemas de captação de cátions divalentes expressos constitutivamente, utilizando sistemas de transporte de magnésio (Mg^{2+}).

Portanto, no caso de estresse a metais pesados, a entrada dos íons não pode ser reduzida por simples diminuição da atividade de transporte, e são então ativados mecanismos de resistência bacterianos geralmente codificados por genes plasmidiais. Dois mecanismos básicos de resistência aos íons Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} e Cd^{2+} foram desenvolvidos ao longo da evolução: complexação intracelular do íon tóxico e bombeamento para fora da célula. No primeiro, que ocorre principalmente em eucariotos, os complexantes de cádmio, por exemplo, são as fitoquelatinas em plantas e células de leveduras e as metalotioneínas em animais, plantas e leveduras. Diferentemente, o efluxo ativo do cátion é o mecanismo primário desenvolvido por procariontes e talvez por *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo revisão de Nies (1992), em *Staphylococcus aureus*, o efluxo de Cd^{2+} (e provavelmente também de Zn^{2+}) é catalizado por uma ATPase ligada à membrana, a proteína CadA. Entretanto, uma segunda proteína é requerida (CadC) para a resistência ser efetivada e uma terceira (CadR) é provavelmente responsável pela regulação. Em *Alcaligenes eutrophus*, o determinante *czc*

codifica proteínas requeridas para o efluxo de Co^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} : CzcA, que funciona como um transportador cátion-próton; CzcB, como uma subunidade que se liga ao cátion; CzcC como uma proteína modificada requerida para a mudança da especificidade de substrato; e a proteína regulatória CzcD (Nies, 1992).

Um dos mecanismos de resistência a metais pesados mais estudados em microrganismos é o que se refere ao cobre. Este metal tem se disseminado no meio ambiente devido principalmente a compostos que são frequentemente aplicados em plantas para o controle de doenças fitopatogênicas, o que favoreceu o aparecimento de microrganismos resistentes, que tem sido isolados (Bender & Cooksey, 1987). Sulfato de cobre também foi largamente utilizado por um longo tempo em alimentação suína, devido a sua capacidade promotora de crescimento (Tetaz & Luke, 1983). Além disso, compostos contendo cobre são utilizados como agentes antibacterianos e aditivos de alimentos e estão presentes em muitos resíduos industriais (Jain, 1990).

Segundo revisão de Brown *et al.* (1992), embora altas concentrações de cobre possam acarretar o desenvolvimento de resistência microbiana devido aos efeitos tóxicos do metal (interações com ácidos nucleicos e alterações de sítios enzimáticos, entre outros), o cobre é requerido para a síntese de metaloenzimas e proteínas envolvidas no transporte de elétrons e outras reações importantes.

Devido ao fato do cobre ser tanto essencial como potencialmente tóxico, concentrações iônicas intracelulares do metal estão sujeitas a uma rigorosa regulação. Com base nos sistemas atualmente conhecidos, sabe-se que genes

relacionados com o metabolismo normal de cobre em bactérias usualmente se localizam no cromossomo, enquanto genes de resistência ao metal se concentram em plasmídios (Brown *et al.*, 1992). Entretanto, a resistência a cobre determinada por genes cromossomais (ou não claramente ligados a DNA plasmidial) tem sido encontrada em bactérias Gram-negativas mutantes. A Tabela 1 resume os mecanismos de resistência cromossomais e plasmidiais ao cobre em bactérias.

O metabolismo normal de cobre inclui a captação do metal, liberação do mesmo para locais de síntese de metaloproteínas e um mecanismo para eliminação do excesso de cobre. É necessário também que haja um estoque na célula, o qual deve estar prontamente disponível para rápida síntese de metaloenzimas induzidas. A expressão dos genes para metabolismo do cobre deve ser regulada de tal forma que, mesmo com variações na concentração externa de cobre, a célula consiga manter limites estreitos de cobre intracelular. Além disso, para a manutenção da homeostase é essencial que os genes para transporte e utilização do cobre interajam diretamente ou indiretamente com aqueles relacionados à resistência (Brown *et al.*, 1992).

Um dos sistemas mais conhecidos de resistência cromossomal a cobre é o de *Escherichia coli*. Lee *et al.* (1990) isolaram mutantes de *E. coli* alterados no transporte de cobre, identificando dois sistemas de captação do metal, designados CutA e CutB ("copper uptake and transport"). Também foram descritas por esses mesmos autores duas proteínas de transporte e estocagem intracelular de cobre, CutE e CutF, provavelmente responsáveis por proteger a célula bacteriana da toxicidade do Cu I (produzido pela redução do Cu II

TABELA 1. Mecanismos de resistência ao cobre em bactérias
(Cervantes & Gutierrez-Corona, 1994)

espécies	mecanismo	localização	referência
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	desconhecido	plasmídio pMOL30	Mergeay, 1991
<i>Cyanobacteria</i>	complexação do cobre por proteína tipo metalotioneína	cromossomo	Olafson, 1986
<i>Desulfovibrio</i> spp.	precipitação de sulfeto de cobre	cromossomo	Temple & LeRoux, 1964
<i>Escherichia coli</i>	-ausência de uma proteína de membrana externa -ligação e efluxo de cobre -diminuição da síntese da proteína OmpF -redução da acumulação de cobre -aumento do efluxo de cobre	cromossomo cromossomo plasmídio R124 plasmídio Rts1 plasmídio pRJ1004	Luktenhaus, 1977 Lee <i>et al.</i> , 1990 Rossow & Rowbury, 198 Ishihara <i>et al.</i> , 1978 Rouch <i>et al.</i> , 1985
<i>Klebsiella aerogenes</i>	ligação ao cobre de polissacarídeos capsulares	cromossomo	Bitton & Freihofer, 1978
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	adaptação fisiológica transiente	cromossomo	Baldry <i>et al.</i> , 1977
<i>Leptospirillum</i>	desconhecido	-	Norris <i>et al.</i> , 1988
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	precipitação de cobre dependente de sulfato	plasmídio pVT1	Erardi <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas syringae</i>	-proteínas quelantes de cobre -ligação ao cobre	plasmídio pPT23 plasmídio pPS11	Bender & Cooksey, 1986 Cooksey, 1990
<i>Sulfolobus</i>	desconhecido	-	Norris & Parrott, 1986
<i>Thiobacillus cuprinus</i>	desconhecido	-	Huber & Stetter, 1990
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	desconhecido	-	Brierley, 1978
<i>Vibrio alginolyticus</i>	secreção de proteínas quelantes de cobre	cromossomo	Harwood-Sears & Gordon, 1990
<i>Xanthomonas campestris</i>	desconhecido	-cromossomo -plasmídio pXV10A -plasmídio pXvCup	Lee <i>et al.</i> , 1992 Bender <i>et al.</i> , 1990 Stall <i>et al.</i> , 1986

citoplasmático) e também pela liberação do cobre para sítios de síntese de metaloenzimas. Os genes estruturais *cutC* e *cutD* tem sido relacionados com o efluxo de cobre, sendo as proteínas CutC e CutD provavelmente ATPases de efluxo do metal. O gene *cutE* foi mapeado, clonado e sequenciado, evidenciando que o mesmo codifica para uma proteína de 512 aminoácidos, com uma região putativa de ligação a cobre (Rogers *et al.*, 1991). Um gene adicional *cutR* é responsável pela regulação do operon *cut* (Brown *et al.*, 1992). Foi proposto por Lee *et al.* (1990) que os produtos do operon *cut* interagem com o sistema de resistência plasmidial a cobre para regular a homeostase do cobre na célula.

A resistência e o transporte bacterianos de cobre tem sido relacionados com ATPases tipo P, sendo que essas enzimas constituem uma família de bombas de translocação de cátions, localizadas na membrana, com significativa conservação de sequência, encontradas tanto em procariotos como em eucariotos (Silver *et al.*, 1993). Odermatt *et al.* (1992, 1993) identificaram dois genes de ATPase tipo P, *copA* e *copB* em *Enterococcus hirae*, tendo sido postulado que CopB consiste numa bomba de cobre (Solioz & Odermatt, 1995). O gene para a doença humana letal de deficiência de cobre, a síndrome de Menkes, também está relacionado a uma ATPase tipo P (Solioz *et al.*, 1994).

Quanto à resistência plasmidial ao cobre, o primeiro sistema melhor estudado foi o plasmídeo pPT23, encontrado em uma linhagem de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bender & Cooksey, 1986), e altamente conservado entre as linhagens da espécie. Os genes estruturais de resistência ao cobre estão organizados no operon *cop*, codificando para as proteínas de membrana externa

e interna, CopB e CopD, respectivamente, as quais participam no transporte de cobre e/ou efluxo do metal; CopA e CopC são proteínas periplasmáticas capazes de se ligar a íons cobre. Genes regulatórios do operon também têm sido descritos, os quais codificam para produtos de trans-ativação e estão localizados tanto no plasmídio como no cromossomo. Contrariamente ao sistema plasmidial de resistência a cobre *pco* em *E. coli*, o qual se baseia no efluxo de cobre, a resistência em *Pseudomonas* e outras bactérias associadas a plantas tem se caracterizado pelo acúmulo intracelular do metal.

A resistência plasmidial a cobre tem sido bem documentada também em *E. coli* (Tetaz & Luke, 1983) e *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Stall *et al.*, 1986). O plasmídio conjugativo pRJ1004, que confere resistência a cobre, foi isolado de uma linhagem de *E. coli* da flora intestinal de suínos alimentados com dieta suplementada com sulfato de cobre (Tetaz & Luke, 1983). Em todos os casos, a resistência a cobre tem demonstrado ser induzível.

OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve por objetivos a caracterização genômica e a diferenciação de linhagens de *Thiobacillus* spp., bem como o estudo dos efeitos de metais pesados, especialmente do cobre, sobre o crescimento e na síntese e fosforilação de proteínas em *T. ferrooxidans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1: “RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains” (Novo *et al.*, 1996)

- 1.1. Otimizar a técnica de RAPD para o estudo de linhagens de *T. ferrooxidans*;
- 1.2. Caracterizar e diferenciar linhagens de *T. ferrooxidans* através de *fingerprinting* genômico;
- 1.3. Examinar as relações genéticas entre as linhagens estudadas através de marcadores do tipo RAPD;
- 1.4. Definir grupos de similaridade e investigar a correlação dos mesmos com a origem das linhagens.

Artigo 2: “*Differentiation of Thiobacillus ferrooxidans and Thiobacillus thiooxidans by 16S-23S rDNA spacer polymorphisms*” (Novo et al., submetido para publicação).

- 2.1. Diferenciar as espécies *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* e *T. caldus*, através de polimorfismos de tamanho e/ou restrição;
- 2.2. Diferenciar linhagens dentro de uma mesma espécie;
- 2.3. Verificar o grau de polimorfismo entre linhagens de uma mesma espécie;
- 2.4. Correlacionar os dados obtidos com os dados de RAPD para *T. ferrooxidans*.

Artigo 3. “*Thiobacillus ferrooxidans response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and phosphorylation*” (Novo et al., submetido para publicação).

- 3.1. Analisar a dinâmica do crescimento de *T. ferrooxidans* na presença de diferentes metais, após crescimento prévio das células na presença de cobre;
- 3.2. Detectar alterações por cobre, cádmio, níquel e zinco na síntese de proteínas totais em *Thiobacillus ferrooxidans*;
- 3.3. Investigar se as alterações na síntese protéica são comuns para os diferentes metais;
- 3.4. Investigar alterações na síntese de proteínas de membrana e do citosol, em células crescidas na presença de cobre;
- 3.5. Investigar alterações nos níveis de fosforilação *in vitro* em frações de proteínas do citosol e da membrana, após crescimento das células na presença de cobre.

RAPD Genomic Fingerprinting Differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* Strains

MARIA TERESA M. NOVO¹, ANETE P. DE SOUZA^{1, 2}, OSWALDO GARCIA JR.³
and LAURA M. M. OTTOBONI¹

¹ Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, C.P. 6109, Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Genética e Evolução, IB, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

³ Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

Received October 9, 1995

Summary

The PCR-based technique, involving the random amplification of polymorphic DNA (RAPD), was optimized and used for assessing genomic variability among eight *Thiobacillus ferrooxidans* strains. RAPD fingerprints presented variation for the thirty primers used, giving a total of 269 polymorphic bands. Similarity coefficients between the strains were calculated, and UPGMA cluster analysis was used to generate a dendrogram showing relationships among them. Most primers divided *T. ferrooxidans* strains in two distinct groups – Group 1: S, SSP, V3, AMF and Group 2: CMV, FG-460, I-35, LR. We observed that the *T. ferrooxidans* strains used in this work have a high degree of genomic diversity and that RAPD is a powerful method to differentiate them.

Key words: *Thiobacillus ferrooxidans*, RAPD – Genomic fingerprinting – Differentiation – Genomic – Polymorphism

Introduction

Thiobacillus ferrooxidans is a gram-negative, acidophilic, and chemolithotrophic bacterium that derives its energy from the oxidation of either ferrous iron or reduced sulfur compounds. *T. ferrooxidans* optimal growth occurs around pH 2.0 at 30 °C (Leduc and Ferroni, 1994). It is ubiquitously isolated from a wide range of sulfur-containing mineral deposits and used industrially to leach metals such as copper, uranium and gold, from low-grade ores (Leduc and Ferroni, 1994; Bruynestein, 1989; Tuovinen and Fry, 1993). An interesting characteristic of *T. ferrooxidans* is its high resistance to heavy metals like cadmium and copper (Leduc and Ferroni, 1994). The level of metal resistance is two to three times more elevated in *T. ferrooxidans* than for most of the heterotrophic bacteria (Sadtler and Trudinger, 1967; Weinberg, 1977). Therefore, this microorganism may be potentially useful to study the metal resistance mechanisms.

Little information is available about the relationships

among *T. ferrooxidans* strains. Studies estimating nucleotide sequence diversity among these strains are important to understand their phylogenetic relations and to establish possible correlations between these data and phenotypic variability, for example, metal tolerance. Methods related with genomic diversity detection, such as rRNA analysis, G+C content, and DNA-DNA hybridization were used to obtain a phylogenetic survey of *T. ferrooxidans* strains and other related species (Lane et al., 1985; Lane et al., 1992; Harrison, 1982). Using the last two methods, Harrison (1982) concluded that not all *T. ferrooxidans* strains are closely related.

Recently, a rapid and sensitive DNA polymorphism assay named RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) has been widely used to detect variability among organisms (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990). This technique is easy, requires only very small amounts of DNA, and no previous knowledge about the genome

Table 1. *T. ferrooxidans* strains and sources

Strains	Source
LR	acid effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil
FG-460	effluent of uranium mine from Figueira, State of Paraná, Brazil
CMV	effluent of gold mine from Morro Velho Company, State of Minas Gerais, Brazil
S	copper ore from Surubim mine (Caraíba), State of Bahia, Brazil
AMF	coal mine of Figueira from Carbonifera Cambui Company, State of Paraná, Brazil
I-35	received from Dr. Olli H. Tuovinen (Ohio State University, USA)
SSP	effluent of coal mine from Sideropolis, State of Santa Catarina, Brazil
V3	received from Dr. S. Groudev (University of Sofia, Bulgaria), and originated from copper mine of Sofia, Bulgaria

under investigation. Therefore, RAPD analysis is a useful method to be used in a preliminary genetic study of *T. ferrooxidans* strains.

We report here a RAPD analysis of eight *T. ferrooxidans* strains, six of them isolated in different Brazilian mines. The aim of this study was to optimize the RAPD technique to be used in *T. ferrooxidans* and to examine the genomic variability of these bacterial strains using RAPD markers.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture medium

The *T. ferrooxidans* Brazilian strains used in this work were isolated by Garcia (1991). Strains I-35 and V3 were kindly provided by Dr. O. H. Tuovinen (Ohio State University-USA) and by Dr. S. Groudev (University of Sofia-Bulgaria), respectively. All strains used in this study are listed in Table 1. They were grown and maintained in T&K liquid medium (Tuovinen and Kelly, 1973) by periodic transfers.

DNA preparation

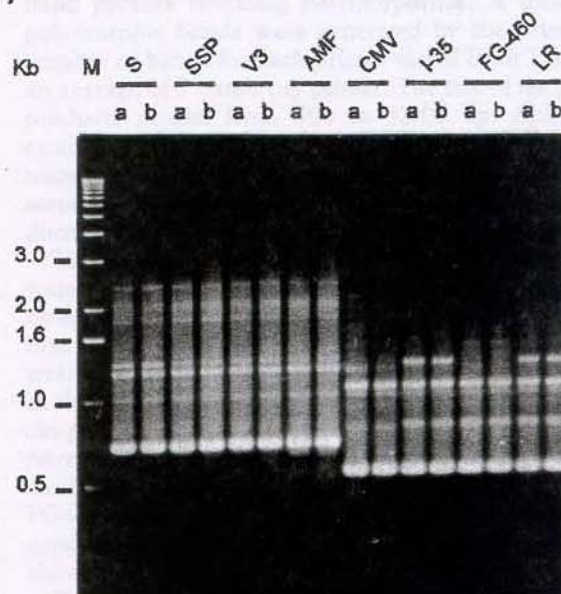
The strains were grown with aeration at 30°C for 2 days in 600 ml of T&K medium. After grown, the cultures were filtered. The cells were centrifuged, and washed four times with 0.01N H₂SO₄ and four times with STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM Na₂EDTA). The cells were suspended in 10 ml of TGE (12.5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM glucose, and 5 mM Na₂EDTA) containing 10 mg/ml of lysozyme, and maintained for 10 min at room temperature. Afterwards, 625 µl of 0.5 M Na₂EDTA were added, and after incubation on ice for 10 min, 1.25 ml of 10% SDS and 125 µl of pronase E (20 mg/ml) were added, followed by digestion at 37°C for 1 hour. The lysates were extracted twice with phenol-chloroform (1:1) and once with chloroform. The DNA was precipitated with 0.1 volumes of 3M sodium acetate, pH 5.2, and 0.6 volumes of isopropanol. The DNA was washed in 70% ethanol, and resuspended in 500 µl of TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM Na₂EDTA). After treatment with RNase (20 µg/ml), DNA concentration was determined by spectrophotometric reading and by comparison with

lambda DNA in 0.8% agarose gel (Sambrook et al., 1989). The DNA was stored at 4°C.

Amplification conditions

Thirty 10-mer primers from kit B (OPB-01 to OPB-20) and kit C (OPC-01 to OPC-10) from Operon Technologies Inc. (Alameda, CA, USA) were used for the polymerase chain reaction (PCR).

(A)



(B)

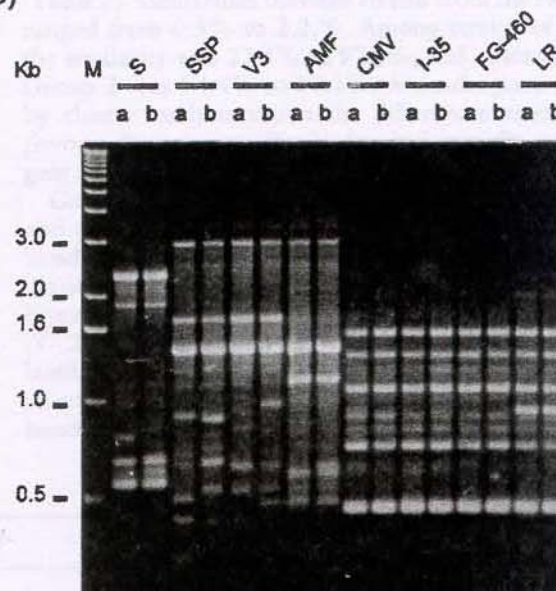


Fig. 1. A–B. RAPD profiles from *T. ferrooxidans* strains (S, SSP, V3, AMF, CMV, I-35, FG-460, and LR) generated with different primers: (A) Primer OPC-05; (B) Primer OPB-17; (a) and (b) represents 5 and 7 ng of DNA, respectively, and (M) DNA molecular weight standard (1 kb DNA Ladder, Gibco-BRL).

All amplification reactions were performed as reported by Williams et al. (1990) with minor modifications, using 5 and 7 ng of DNA. Results were reproducible when DNA from different extractions of the same strain were used (results not shown). Controls were made by replacing DNA with water. Reaction mixtures (25 µl) contained 0.2 µM of the primer, 2 units of Ampli Taq DNA polymerase-Stoffel fragment (Perkin Elmer, Branchburg, NJ, USA), 2.5 µl of 10X supplied buffer, 0.1 mM of each dNTP, and 2.5 mM of MgCl₂. The amplifications were carried out in a Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler. DNA denaturation was done at 94°C for 5 min followed by 45-cycle amplification (94°C, 1 min; 35°C, 1 min; 72°C, 2 min), and by a final extension step at 72°C for 7 min. Amplification products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide, and photographed under UV light.

Data analysis

Analysis of the results was made comparing the RAPD profiles on the basis of the presence or absence (1 or 0, respectively) of each reproducible DNA band. The similarity between strains was calculated using the Jaccard's coefficient and UPGMA cluster analysis was performed using the NTSYS-pc software (Rohlf, 1989).

Results and Discussion

Optimization of Amplification Conditions

Genomic DNA of *T. ferrooxidans* strain S was chosen for amplification conditions optimization, using fifteen different DNA concentrations in the range of 25 pg to 10 ng with primer OPB-01. The RAPD products were separated in a 1.5% agarose gel, and the same profile was obtained for DNA concentrations between 1.5 and 10 ng. The highest intensity of the bands was observed when 5 ng of DNA was used. With 10 ng of DNA, the intensity of the bands decreased, indicating that the DNA excess affected the amount of amplified product in each band but not the band profile. Based on these results, it was established the concentrations of 5 and 7 ng of DNA in each amplification reaction. Only the bands that were reproducible in these two DNA concentrations were selected as useful polymorphic markers.

Reactions with these two DNA concentrations were done using 1.0, 2.0, and 2.5 units of the enzyme. Non-reproducible bands were observed when 1.0 unit was used, but with 2.0 and 2.5 units the band profiles were very similar and reproducible. Magnesium concentrations of 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 mM were also tested, and the best

results were obtained with 2.5 mM. Increased magnesium concentration produced less reproducible bands.

RAPD products

Each genomic DNA of the strains utilized in this work was amplified at two different DNA concentrations (5 and 7 ng) with 30 primers. All primers tested produced specific band profiles revealing polymorphisms. A total of 269 polymorphic bands were generated by the primers. The number of bands for each primer varied from 2 to 17 with an average of 9 bands per primer. The size of the amplified products ranged from 300 to 3,000 bp. Although the established amplification conditions have produced a large number of reproducible bands for most of the primers, some primers (OPB-04, OPB-06, OPC-03, OPC-04) produced many non-reproducible bands.

The RAPD profiles of the eight *T. ferrooxidans* strains were compared, and variation in the band profiles was observed for each primer. This variation in the amplification products indicated a genomic variability among the strains. Variability was also observed for metal tolerance in the Brazilian strains (Garcia and Silva, 1991). Most of the primers used in the amplifications grouped the eight *T. ferrooxidans* strains into two groups – Group 1 comprised strains S, SSP, V3, AMF, and Group 2 strains CMV, I-35, FG460, LR (Fig. 1A). Some primers also differentiated the genomes within each group, and strains of the first group showed a higher divergence among them (Fig. 1B).

Relationships between the strains was estimated using Jaccard's coefficient of similarity which excludes common negative data (i.e. where two strains lack the same band) (Table 2). Similarities between strains from the two groups ranged from 0.5% to 2.2%. Among strains of Group 1 the similarity was 27.4% to 97.6%, and among strains of Group 2 was 94.4% to 98.1%. A dendrogram produced by cluster analysis shows the differences among the *T. ferrooxidans* strains (Fig. 2). Strain S was the most divergent in the first group (Fig. 2).

Group 2 includes strains with high degree of similarity, and the primers that were able to generate polymorphic bands among them may be useful as preliminary genomic markers in further studies. As indicated in Table 2 and Figure 2 the strains LR and FG-460 are closely related (97.2% of similarity). Although these two strains are related, they present significant difference in metal resistance (Garcia and Silva, 1991). Therefore, the two polymorphic bands detected in the LR strain with primers OPC-05 and

Table 2. Jaccard's coefficients of similarity (%) of eight *T. ferrooxidans* strains. The coefficients were calculated from the RAPD data of 269 polymorphic bands

	S	SSP	V3	AMF	CMV	I-35	FG460	LR
S	100.0							
SSP	27.4	100.0						
V3	27.4	97.6	100.0					
AMF	31.7	47.2	47.2	100.0				
CMV	1.1	2.2	1.6	2.0	100.0			
I-35	0.5	1.6	1.1	1.5	98.1	100.0		
FG460	1.0	2.2	1.6	2.0	98.1	96.2	100.0	
LR	0.5	1.6	1.1	1.5	94.4	96.2	97.2	100.0

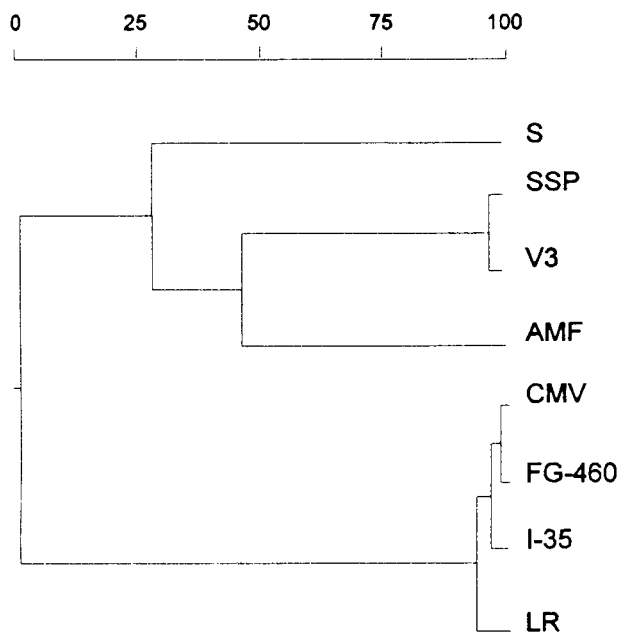


Fig. 2. Dendrogram represents the relationships between eight *T. ferrooxidans* strains based on UPGMA cluster analysis of the RAPD profiles derived from 30 primers using the Jaccard's similarity coefficient (%) (cophenetic correlation was $r = 0.99972$).

OPB-17, that were absent in the FG-460 profile (Fig. 1A–B), may represent a genomic region involved with metal resistance.

Strains belonging to the same similarity group are present in distinct geographic areas, for example, SSP and V3 (Group 1). Harrison (1982) also reported no correlation between homology groups and geography, except in the case of the BU strains, all isolated in Bulgaria, and belonging to the same homology group. This fact suggests that a similar genotype prevailed in distinct geographic areas due to the presence of similar leaching micro-environments responsible for selective pressure in the strains. In agreement to this hypothesis, we have observed that strains originated from uranium mines (LR and FG-460) are included in Group 2, whereas that originated from copper mines (S and V3) and coal mines (AMF and SSP) are included in Group 1 (Fig. 2).

The results obtained by RAPD analysis showed that the *T. ferrooxidans* strains used in this work have a wide genomic diversity, presenting from 0.5% similarity (S and LR) to 98.1% (CMV and FG-460) (Table 2). This high variability was also observed by Harrison (1982) for other *T. ferrooxidans* strains. The RAPD results showed a low degree of similarity between strains from Group 1 and 2. However, more data should be gathered in order to determine if the observed genomic differences imply different species status.

As far as we know, this is the first report using the RAPD method to assess genomic variability in *T. ferrooxidans*. RAPD markers may be used as a quick and reliable alternative for differentiating *T. ferrooxidans* strains. This

technique presents the advantage to provide a fingerprinting of any particular strain. Furthermore, some RAPD markers may be useful in the isolation of DNA fragments related to important characteristics, like metal resistance.

Acknowledgements. We are greatly indebted to Dr. Paulo Aruda, Dr. Yoko Bomura Rosato and Dr. Gilson Manfio for suggestions and discussion on the manuscript. We thank Dr. Olli H. Tuovinen for providing the *T. ferrooxidans* strain I-35 and Dr. Stoyan Groudev for V3 strain. We also thank Márcio José da Silva for the artwork and Cláudia Teixeira Guimarães for technical advice on data analysis. This work was supported in part by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/ 400092/94–8 (NV). A.P.S. received research fellowship from CNPq. M.T.M.N. received postgraduate fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Bruynestein, A.: Mineral biotechnology. *J. Biotechnol.* 11, 1–10 (1989)
- Garcia, O. Jr.: Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Rev. Microbiol.* 22, 1–6 (1991)
- Garcia, O. Jr., Silva, L. L.: Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnol. Lett.* 13, 567–570 (1991)
- Harrison, A. P. Jr.: Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* 131, 68–76 (1982)
- Jaccard, P.: Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44, 223–270 (1908)
- Lane, D. J., Harrison, A. P., Jr., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S. J., Olsen, G. J., Pace, N. R.: Evolutionary relationships among sulfur- and iron- oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174, 269–278 (1992)
- Lane, D. J., Stahl, D. A., Olsen, G. J., Heller, D. J., Pace, N. R.: Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* 163, 75–81 (1985)
- Leathen, W. W., Kinsel, N. A., Braley, S. A.: *Ferrobacillus ferrooxidans*: a chemosynthetic autotrophic bacterium. *J. Bacteriol.* 72, 700–704 (1956)
- Leduc, L. G., Ferroni, G. D.: The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14, 103–120 (1994)
- Rohlf, F. J.: NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50– New York Exeter Publ, N.Y. (1989)
- Sadler, W. R., Trudinger, P. A.: The inhibition of microorganisms by heavy metals. *Miner. Deposita* 2, 158–168 (1967)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. E.: *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)
- Tuovinen, O. H., Fry, I. J.: Bioleaching and mineral biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 4, 344–355 (1993)
- Tuovinen, O. H., Kelly, D. P.: Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* 88, 285–298 (1973)

- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535 (1990)
- Weinberg, E. D. (Ed.): *Microorganisms and minerals*. Marcel Dekker, New York (1977)
- Welsh, J., McClelland, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218 (1990)

Laura M. M. Ottoboni, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, C.P. 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, e-mail: OTTOBONI@TURING.UNICAMP.BR, FAX: (55-192) 39 4717, PHONE: (55-192) 39 8351 or (55-192) 39 7030

**Differentiation of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* by
16S-23S rDNA spacer polymorphisms**

Maria Teresa M. Novo¹, Paula C. P. Cabral¹, Oswaldo Garcia Jr.², Gilson P.
Manfio³ and Laura M. M. Ottoboni^{1,*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de
Campinas, 13083-970, C.P. 6109, Campinas, S.P., Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Estadual
Paulista, 14800-900, Araraquara, S.P., Brazil

³Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 13087-010,
Campinas, S.P., Brazil.

Running title: 16S-23S rDNA spacer polymorphisms in *Thiobacillus* spp.

*To whom correspondence should be addressed.

Fax: (55-19) 788 1089

Phone: (55-19) 788 1090 or 788 1091

e-mail: ottoboni@turing.unicamp.br

ABSTRACT

Thiobacillus ferrooxidans and *Thiobacillus thiooxidans* could be distinguished from *Thiobacillus caldus* on the basis of size of PCR-amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer regions (approximately 1000 bp for *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* and 900 bp for *T. caldus*). Restriction digestion analysis of amplified spacers with five enzymes (*Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I and *Msp* I) divided *T. ferrooxidans* strains into at least five RFLP groups, the majority of strains clustering with the type strain (ATCC 23270). *T. thiooxidans* strains yielded homogeneous RFLP patterns, except for one strain (DAMS), which was differentiated with *Dde* I, *Hae* III and *Hinf* I. It could be shown that *T. ferrooxidans* is a more heterogeneous group of organisms compared with *T. thiooxidans*, and that the approach utilized is useful in the rapid characterization of thiobacillus strains.

INTRODUCTION

Thiobacilli are aerobic, Gram-negative, nonsporulating, rod-shaped bacteria that derive energy from the oxidation of reduced sulfur compounds (7,19). Two ubiquitous species, *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans*, represented by acidophilic, obligately chemolithotrophic organisms, are involved in bioleaching of metals in the environment. *T. ferrooxidans* are able to oxidize ferrous iron and has been reported to have high resistance to heavy metals, such

as copper and zinc (15).

The analysis of 16S rRNA sequence data has highlighted that not all named isolates of *T. ferrooxidans* are phylogenetically related (Ribosomal Database Project, 13). *T. ferrooxidans* strains are recovered in several clades, demonstrating the need for additional taxonomic studies of these organisms. The type strain of *T. ferrooxidans* was found to be phylogenetically related to *T. thiooxidans* and *T. caldus*, forming a coherent group. These findings were supported by the 5S and 16S rRNA analyses done by Lane and co-workers (8, 9). High genomic variability among *T. ferrooxidans* strains was also observed in studies involving DNA-DNA hybridization (5) and RAPD (12).

Due to its slow growth rate and chemoautotrophic metabolism, thiobacilli are relatively difficult to grow in solid medium. Thus, rapid and sensitive methods for the taxonomic characterization of *T. ferrooxidans* and other thiobacilli are critical in the identification and typing of new isolates. Polymorphisms of the 16S-23S rDNA intergenic spacer have been successfully used in the differentiation of several bacterial species (3). This approach was recently applied in the investigation of bacterial populations in a bioleaching system by comparison of the size of spacer regions (14). In the present study, we describe the use of rDNA intergenic spacer polymorphisms for the differentiation of *T. caldus*, *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans*, including several Brazilian isolates of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture medium and growth conditions. Strains used in this study are listed in Table 1. They were grown and maintained in modified T&K liquid medium (18) ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L; pH 1.8 adjusted with sulfuric acid) supplemented with either $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (33.4 g/L) for *T. ferrooxidans* or sterile powder sulfur (10 g/L) for *T. caldus* and *T. thiooxidans*. All strains were grown at 30° C with shaking (300 rpm) for 2 to 6 days, except for *T. caldus* which was grown at 45° C. Biomass was harvested by two-step filtration using paper filter, followed by filtration in 0.22 μm cellulose ester membranes (Millipore). Biomass in filters was washed four times with H_2SO_4 0.01 N, transferred to Eppendorf tubes and stored at -70° C.

Preparation of genomic DNA. Prior to DNA extraction, cell biomass (from approx. 600 mL flask cultures) was washed six times with TE (Tris-HCl, 10 mM, Na_2EDTA 1 mM, pH 8.0). Pellets were resuspended in 1 mL of DNAzol reagent (Gibco-BRL) and centrifuged for 10 minutes. DNA was precipitated by addition of 500 μL ethanol, washed three times with ethanol 95%, and resuspended in 40 μL TE buffer. DNA concentration was determined by spectrophotometry and by comparison with Lambda DNA standards in 0.8% agarose gel (16).

PCR amplification of 16S-23S rDNA intergenic spacers. Primers used in the PCR amplifications of rDNA spacers were pHr (5'-TGCGG CTGGA TCACC TCCTT-3') (10), corresponding to the 3'-end of the 16S rDNA, and p322-anti (5'-GGTTC TTTTC ACCTT TCCCTC-3') (6), which binds to a site 322 bases at the 5'-end of the 23S rDNA. Amplifications were performed using 200 ng of genomic DNA in a final reaction volume of 50 μ L, containing 0.4 μ M of each primer, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgCl₂ and 1 U *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL) in the enzyme buffer supplied by the manufacturer. The following thermal profile was used for PCR: initial denaturation at 94° C for 5 min, followed by 30 cycles of 94° C for 1 min, 55° C for 7 min, 72° C for 3 min., and final extension at 72° C for 5 min.

Restriction endonuclease digestion of PCR products and electrophoresis. Restriction endonuclease analyses were performed directly on PCR-amplified DNA. Digestions with *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sau* 3AI and *Taq* I were carried out as recommended by the enzyme manufacturers, using 3 μ L of PCR reactions and approximately 4 U of enzyme in 15 μ L digestions, which were incubated for 2 h at 37° C. Digestion products were electrophoresed in 7% acrylamide/bis-acrylamide gels (29:1, w/w) in a Tris-borate-EDTA buffer system (16). DNA fingerprints were visualized by silver staining. Undigested PCR-amplified DNA was analyzed in 4% acrylamide/bis-acrylamide gels.

RESULTS

In the present study, 22 strains of *Thiobacillus* spp., corresponding to 14 strains of *T. ferrooxidans*, 7 strains of *T. thiooxidans* (including the respective type-strains), and the type strain of *T. caldus*, were characterized by determining the polymorphism of the PCR-amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer region. Seven strains, representing new isolates from Brazil, were not previously studied using molecular typing methods (Table 1). Some Brazilian *T. ferrooxidans* strains (LR, FG-460, CMV, S, SSP and V3) were previously analyzed by RAPD (12).

PCR amplification of the 16S-23S spacer region produced DNA fragments with approximately 1000 bp for *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans*, and 900 bp for *T. caldus*. No significant length polymorphism could be detected among different strains of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* (results not shown). When higher stringency PCR conditions were used, *T. thiooxidans* rDNA spacer regions were not amplified with annealing at 60° C for 1 minute (results not shown).

Amplified rDNA spacer fragments of *T. ferrooxidans* strains LR and ATCC 23270 were initially analysed by digestion with *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Pst* I, *Rsa* I, *Sau*3A I and *Taq* I (results not shown). Restriction patterns generated with *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I and *Msp* I yielded the most discriminatory profiles, consisting of three to nine distinct bands, depending on the bacterial strain. These enzymes were selected for digestion of amplified rDNA spacers from all strains (Figs. 1, 2, 3, 4 and 5).

Among the 14 *T. ferrooxidans* strains analyzed, at least 5 different RFLP

profiles were observed with each enzyme used (Figs. 1A, 2A, 3A, 4A and 5A). *T. ferrooxidans* strains were grouped into 5 to 6 clusters according to the similarity of the RFLP profiles, taking into account the presence and size of major bands (Table 2). Identical RFLP patterns were obtained for strains ATCC 23270, CF3, CMV, FG 460, I-35, LR, PCEL, PM, SJ22 and V3 with *Alu* I (Fig. 1A, profile A1), whereas strains PCE, S, SSP and T22 showed different patterns (Fig. 1A; profiles A4, A2, A3 and A5, respectively). Similar groupings were obtained by using *Dde* I, *Hae* III and *Hinf* I (Figs. 2A, 3A and 4A, respectively), except for strain V3, which had RFLP patterns similar to that of strain PCE with *Dde* I and *Hae* III (Figs. 2A and 3A; profiles D4 and H4, respectively) and to strain SSP with *Hinf* I (Fig. 4A; profile I3). Digestion with *Msp* I differentiated strain V3 from all other strains (Fig. 5A, profile M6).

All *T. thiooxidans* strains yielded homogeneous RFLP patterns after digestion of the spacer fragments with *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I or *Msp* I (Fig. 1B, profile A6; Fig. 2B, profile D6; Fig. 3B, profile H6; Fig. 4B, profile I6 and Fig. 5B, profile M7, respectively), except for strain DAMS, which could be differentiated from the remaining strains with *Dde* I, *Hae* III and *Hinf* I (Fig. 2B, profile D7; Fig. 3B, profile H7 and Fig. 4B, profile I7, respectively). These findings are summarized in Table 2.

The RFLP patterns of *T. caldus* (type strain) were distinct from all patterns of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* strains, with the five enzymes used (Fig. 1C, 2C, 3C, 4C and 5C).

DISCUSSION

Sulfur- and iron-oxidizing bacteria have been subjected to taxonomic surveys based on the analysis of G+C content, DNA-DNA hybridization and 5S and 16S rRNA sequence analysis (1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, 17), which showed the polyphyletic nature and taxonomic heterogeneity of these functional groups of microorganisms. However, less laborious and sensitive methods are necessary for the rapid characterization and identification of thiobacillus strains isolated from bioleaching environments. In the present study, RFLP analysis of PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacers of the phylogenetically related species *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* and *T. caldus* was performed.

The results showed that *T. ferrooxidans* strains CF3, CMV, FG-460, I-35, LR, PCEL, PM, SJ-22 presented similar RFLP patterns with the five restriction enzymes selected (*Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hinf* I and *Msp* I). This homogeneous group also included the type strain, *T. ferrooxidans* ATCC 23270. A few strains, including *T. ferrooxidans* strain S, SSP, PCE, T22 and V3 presented distinct RFLP patterns. These findings are in agreement with previous RAPD data for some strains used in this study (12). Strains S, SSP and V3 were recovered in RAPD group 1, with overall similarity between 27.4 to 97.6%, and only poorly related (0.5 to 2.2% similarity) to strains LR, FG-460, I-35 and CMV, recovered in RAPD group 2 (overall similarity between 94.4 to 98.1%). The present study confirms that strains LR, FG-460, I-35 and CMV are closely related, although they were originated from distinct places (Table 1). It was also clear that the

taxon *T. ferrooxidans* includes strains which are not genomically related to the type strain (ATCC 23270), and that molecular data should be taken in account in the classification and identification of these organisms.

It could be observed that *T. ferrooxidans* strains with similar RFLP profiles (CF3, CMV, FG-460, I-35, LR, PCEL, PM, SJ-22) were originated from very distinct places and bioleaching environments (Table 1). Therefore, there is no correlation between the groups defined by the present RFLP analysis and the geographic origin of the strains. Similarly, it was found no correlation between geography and homology groups defined by DNA-DNA hybridization (5) or similarity groups defined by RAPD analysis (12). Additionally, the same conclusion is valid for *T. thiooxidans* strains: BC-S1, the only strain not isolated from Brazilian soils, presented the same RFLP patterns of the main group of Brazilian strains (Tables 1 and 2).

It was found that *T. thiooxidans* strains were more homogeneous than *T. ferrooxidans* strains based on the RFLP patterns obtained. As discussed by Espejo and Romero (1), these results are in agreement with previous findings, which showed that *T. ferrooxidans* have larger genotypic differences compared to *T. thiooxidans*, which formed a fairly homogeneous group. The only strain that showed a differentiated behavior was *T. thiooxidans* strains DAMS, with three of the enzymes used.

The results obtained demonstrated that RFLP analysis of PCR-amplified 16S-23S rDNA intergenic spacers is a rapid and sensitive method for the characterization of *T. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* strains. The RFLP pattern

obtained also allowed the differentiation of *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* and *T. caldus*. Furthermore, these results showed general agreement with available RAPD data for several *T. ferrooxidans* strains, confirming the heterogeneity of this taxon. These data suggest that additional studies should be performed in order to elucidate the taxonomic status of *T. ferrooxidans*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ronaldo Moreto for technical help in the purification of thiobacillus strains. We also thank Dr. S. Groudev, Dr. B. Johnson, R. Liberato, and Dr. O. H. Tuovinen for providing some of the *T. ferrooxidans* strains. This work was supported by a research grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). O. G. Jr. was sponsored by research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M. T. M. N. was sponsored by Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa) / UNICAMP. P. C. P. C. was sponsored by a graduate fellowship from FAPESP.

REFERENCES

1. **Espejo, R. T., and J. Romero.** 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**: 1344-1348.
2. **Goebel, B. M. and E. Stackebrandt.** 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environm. Microbiol.* **60**:1614-1621.
3. **Gürtler, V., and V. A. Stanisich.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* **142**: 3-16.
4. **Hallberg, K. B. and Lindström, E. B.** 1996. Multiple serotypes of the moderate thermophile *Thiobacillus caldus*, a limitation of immunological assays for biomining microorganisms. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**:4243-4246.
5. **Harrison, A. P. Jr.** 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* **131**: 68-76.
6. **Honeycut, R. J., B. W. S. Sobral, and M. McClelland.** 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. *Microbiology* **141**: 3229-3239.
7. **Kuenen, J. G., and O. H. Tuovinen.** 1981. The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*, p. 1023-1036. *In* M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes- a handbook on habitats, isolation, and*

identification of bacteria, vol. I. Springer-Verlag, New York.

8. **Lane, D. J., A. P. Harrison, Jr., D. Stahl, B. Pace, S. J. Giovannoni, G. J. Olsen, and N. R. Pace.** 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278.
9. **Lane, D. J., D. A. Stahl, G. J. Olsen, D. J. Heller, and N. R. Pace.** 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **163**:75-81.
10. **Massol-Deya, A. A., D. A. Odelson, R. F. Hickey, and J. M. Tiedje.** 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16 and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA), chap. 3.3.2. p. 1-8. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas and F. J. de Bruijn (eds.). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
11. **Moreira, D. and R. Amils.** 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 522-528.
12. **Novo, M. T. M., A. P. Souza, O. Garcia, Jr., and L. M. M. Ottoboni.** 1996. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System. Appl. Microbiol.* **19**: 91-95.
13. **Olsen, G. J., R. Overbeek, N. Larsen, T. L. Marsh, M. J. Mccaughey, M. A. Maciukenas, W.-M. Kuan, T. J. Macke, Y. Xing, and C. R. Woese.** 1992. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* **11**, 20 Suppl.: 2199-2200.
14. **Pizarro, J., E. Jedlicki, O. Orellana, J. Romero, and R. T. Espejo.** 1996.

Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**: 1323-1328.

15. **Rawlings, D. E., and T. Kusano.** 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**: 39-55.

16. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. E. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

17. **Shooner, F., J. Bousquet, and R. D. Tyagi.** 1996. Isolation, phenotypic characterization, and phylogenetic position of a novel, facultatively autotrophic, moderately thermophilic bacterium, *Thiobacillus thermosulfatus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:409-415.

18. **Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly.** 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* **88**: 285-298.

19. **Vishniac, W. V.** 1974. *Thiobacillus* Beijerinck 1904, 597, p. 456-461. In R. E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed.), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. RFLP patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of *Thiobacillus ferrooxidans* (A), *Thiobacillus thiooxidans* (B) and *Thiobacillus caldus* (C), obtained with *Alu* I. Pattern types are designed A1 to A7 and are mentioned in Table 2. The numbers on the left side refer to 1 kb ladder (Gibco-BRL).

Figure 2. RFLP patterns of amplified 16S-23S rDNA spacers of *Thiobacillus ferrooxidans* (A), *Thiobacillus thiooxidans* (B) and *Thiobacillus caldus* (C), obtained with *Dde* I. Pattern types are designed D1 to D8 and are mentioned in Table 2. The numbers on the left side refer to 1 kb ladder (Gibco-BRL).

Figure 3. RFLP patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of *Thiobacillus ferrooxidans* (A), *Thiobacillus thiooxidans* (B) and *Thiobacillus caldus* (C), obtained with *Hae* III. Pattern types are designed H1 to H8 and are mentioned in Table 2. The numbers on the left side refer to 1 kb ladder (Gibco-BRL).

Figure 4. RFLP patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of *Thiobacillus ferrooxidans* (A), *Thiobacillus thiooxidans* (B) and *Thiobacillus caldus* (C), obtained with *Hinf* I. Pattern types are designed I1 to I8 and are mentioned in Table 2. The numbers on the left side refer to 1 kb ladder (Gibco-BRL).

Figure 5. RFLP patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of *Thiobacillus ferrooxidans* (A), *Thiobacillus thiooxidans* (B) and *Thiobacillus caldus* (C), obtained with *Msp* I. Pattern types are designed M1 to M8 and are mentioned in Table 2. The numbers on the left side refer to 1 kb ladder (Gibco-BRL).

Table 1. *Thiobacillus* spp. strains and sources.

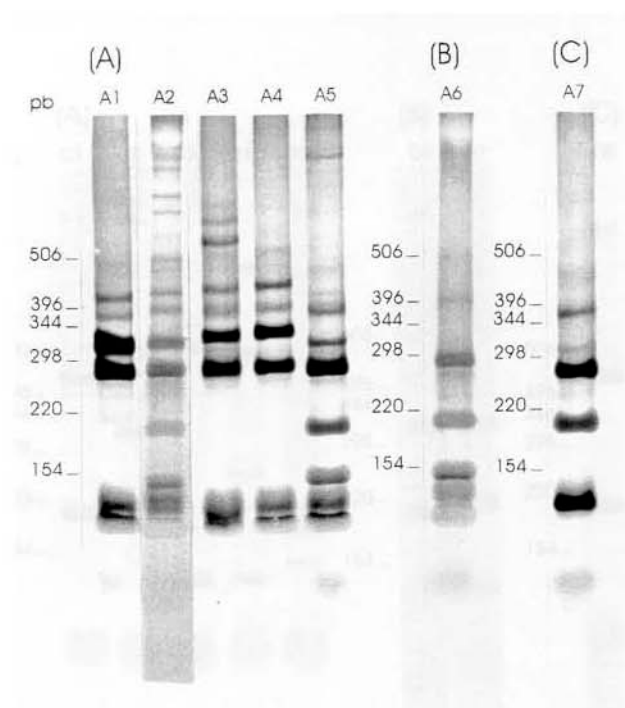
Strains	Source
<i>T. ferrooxidans</i>	
ATCC 23270	effluent of acid, bituminous coal mine; type strain from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)
CF3	Noranda Blackbird cobalt mine, Idaho, USA; received from Dr. B. Johnson (University of Wales, UK)
CMV	effluent of gold mine, State of Minas Gerais, Brazil; received from R. Liberato (Morro Velho Company)
FG-460*	effluent of uranium mine from Figueira, State of Paraná, Brazil
I-35	received from Dr. O. H. Tuovinen (Ohio State University, USA)
LR*	effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil
PCE*	effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil
PCEL*	effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil
PM	Parys copper mine, Anglesey, Wales, UK; received from Dr. B. Johnson
S*	effluent of column leaching of copper ore from Surubim mine (Caraíba), State of Bahia, Brazil.
SJ-22	Cae Coch pyrite mine, Trefriw, Wales, UK; received from Dr. B. Johnson
SSP*	effluent of coal mine from Siderópolis, State of Santa Catarina, Brazil.
T22	Cae Coch pyrite mine, Trefriw, Wales, UK; received from Dr. B. Johnson
V3	copper mine, Bulgaria; received from Dr. S. Groudev (University of Sofia, Bulgaria)
<i>T. thiooxidans</i>	
ATCC 19377	Kimmeridge clay; type strain from ATCC
BC-S1	acid drainage of Birch Coppice coal spoil mine from Warwickshire, UK
DAMS*	effluent of uranium mine from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil.
ELC*	effluent of coal mine from Figueira, State of Paraná, Brazil.
FG-01*	effluent of heap leaching of uranium ore from Figueira, State of Paraná, Brazil.
MF*	effluent of coal mine from Figueira, State of Paraná, Brazil.
MMCE*	effluent of heap leaching of uranium ore from Poços de Caldas, State of Minas Gerais, Brazil.
<i>T. caldus</i>	
DSMZ 8584	coal spoils, UK; type-strain from DSMZ (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i> , Braunschweig, Germany).

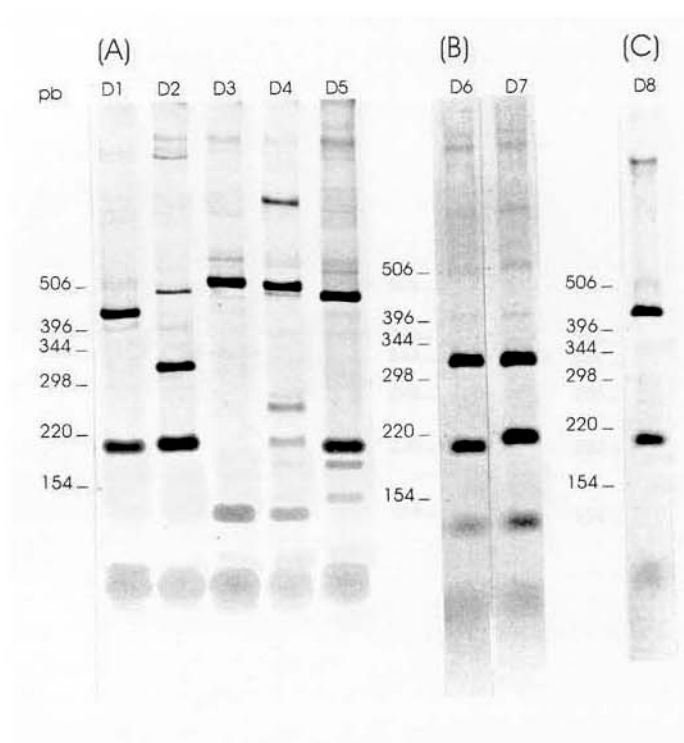
* all these strains were isolated by Dr. O. Garcia Jr. (Universidade Estadual Paulista, Brazil)

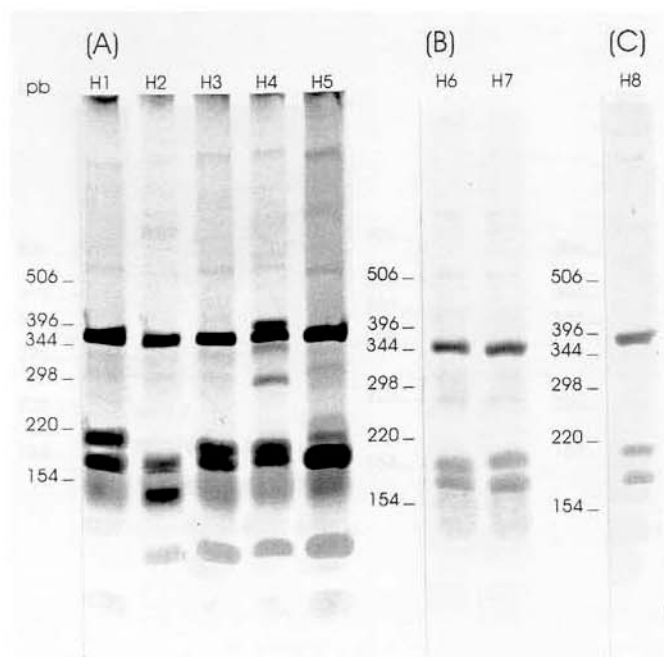
Table 2. RFLP patterns of the 16S-23S rDNA spacer regions of *Thiobacillus* spp. strains.

Strains	Group assignments based on RFLP profiles with different restriction enzymes ^a				
	<i>Alu</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I
<i>T. ferrooxidans</i>					
ATCC 23270	A1	D1	H1	I1	M1
LR	A1	D1	H1	I1	M1
FG-460	A1	D1	H1	I1	M1
CMV	A1	D1	H1	I1	M1
I-35	A1	D1	H1	I1	M1
PM	A1	D1	H1	I1	M1
SJ-22	A1	D1	H1	I1	M1
CF3	A1	D1	H1	I1	M1
PCEL	A1	D1	H1	I1	M1
V3	A1	D4	H4	I3	M6
S	A2	D2	H2	I2	M2
SSP	A3	D3	H3	I3	M3
PCE	A4	D4	H4	I4	M4
T22	A5	D5	H5	I5	M5
<i>T. thiooxidans</i>					
ATCC 19377	A6	D6	H6	I6	M7
FG01	A6	D6	H6	I6	M7
ELC	A6	D6	H6	I6	M7
BC-S1	A6	D6	H6	I6	M7
MF	A6	D6	H6	I6	M7
MMCE	A6	D6	H6	I6	M7
DAMS	A6	D7	H7	I7	M7
<i>T. caldus</i>					
DSM 8584	A7	D8	H8	I8	M8

^a RFLP patterns representative of profiles A1 to M8 are shown in the Figures 1 to 5.

**Figure 1**

**Figure 2**

**Figure 3**

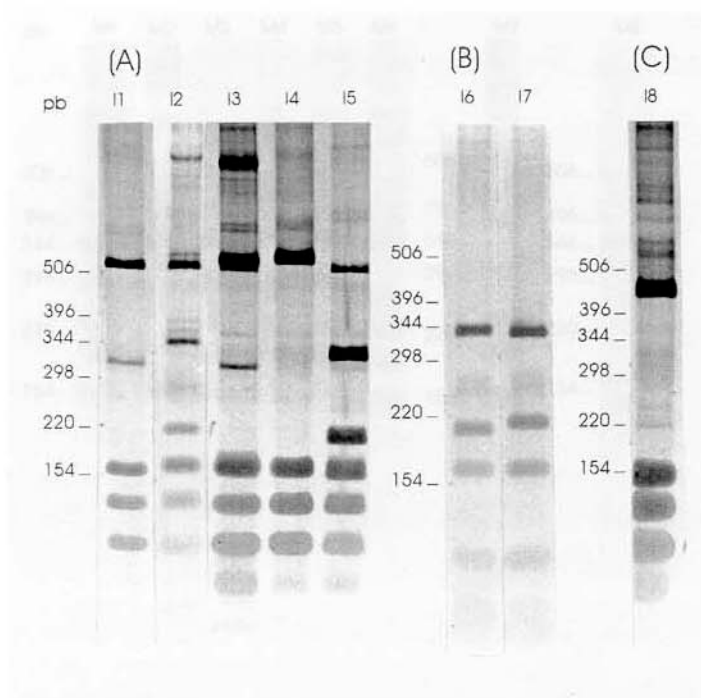
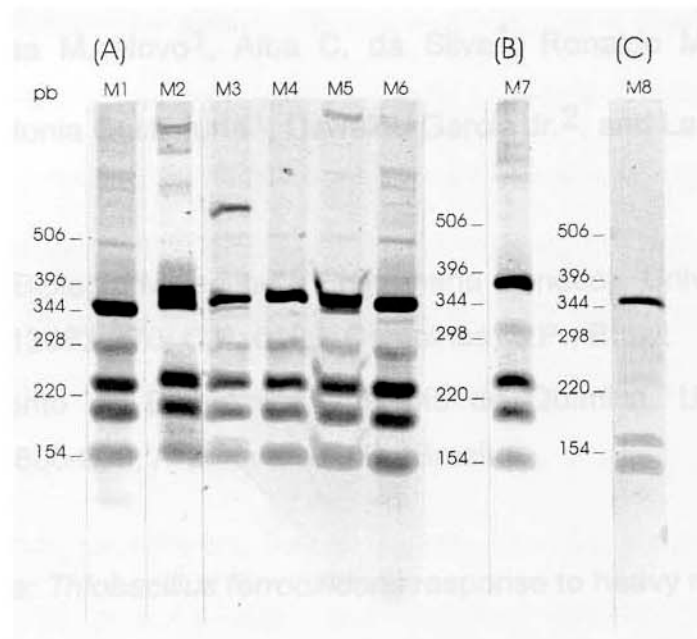


Figure 4

**Figure 5**

***Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals:
growth, protein synthesis and phosphorylation**

Maria Teresa M. Novo¹, Alba C. da Silva¹, Ronaldo Moreto², Paula C. P. Cabral¹, Antonia Costacurta¹, Oswaldo Garcia Jr.², and Laura M. M. Ottoboni^{1,*}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, C.P. 6109, Campinas, S.P., Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-900, Araraquara, S.P., Brazil

Running title: *Thiobacillus ferrooxidans* response to heavy metals

*To whom correspondence should be addressed.

Fax: (55-19) 788 1089

Phone: (55-19) 788 1090 or 788 1091

e-mail: ottoboni@turing.unicamp.br

ABSTRACT

Respirometric experiments demonstrated that the oxygen uptake by *Thiobacillus ferrooxidans* strain LR was not inhibited in the presence of 200 mM copper. Copper-treated and untreated cells from this *T. ferrooxidans* strain were used in growth experiments in the presence of cadmium, copper, nickel and zinc. Growth in the presence of copper was improved by the copper-treated cells. However, no growth was observed for these cells, within 190 h of culture, when cadmium, nickel and zinc were added to the media. Changes in the total protein synthesis pattern were detected by 2-D PAGE for *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of different heavy metals. Specific proteins were induced by copper (16, 28 and 42 kDa) and cadmium (66 kDa), whereas synthesis repression of some proteins was observed for all the heavy metals tested. Protein induction and repression were also observed in the cytosolic and membrane fractions from *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of copper. The level of protein phosphorylation was increased in the presence of this metal, mostly in the membrane fraction.

INTRODUCTION

Thiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative, acidophilic and chemoautotrophic bacterium that utilizes ferrous ion, sulfur and reduced sulfur compounds as energy sources. *T. ferrooxidans* optimal growth occurs around pH 2.0 at 30°C (20). It is ubiquitously isolated from a wide range of sulfur-containing mineral deposits and is industrially used in the recovery of gold, copper and uranium (5, 22, 23). This biomining microorganism has the ability to tolerate relatively high concentrations of several toxic metal ions, such as cadmium and copper (20, 30), unlike most heterotrophic bacteria (20).

According to Modak & Natarajan (27), it is necessary to develop *T. ferrooxidans* strains more tolerant to high metal concentrations and temperature fluctuations to improve bioleaching. Little information about copper resistance is available for *T. ferrooxidans*, though copper tolerant strains have been obtained by growth adaptation to increasingly higher concentrations of this metal (27, 28). The developed tolerance was found to be stress-dependent and not a permanent trait acquired by the bacteria (27, 28). Pramila et al. (29) reported a reduction in plasmid copy number in *T. ferrooxidans* cells adapted to copper, suggesting that the genetic determinants involved in copper resistance are located in the chromosome. In fact, until now, no correlation between metal resistance and native plasmids was found in *T. ferrooxidans*.

At the molecular level, copper resistance has been studied in different species of bacteria and the genes involved in resistance have been associated to

the chromosome and plasmids (8, 11, 33). Among the studied microorganisms are *Enterococcus hirae* (34), *Escherichia coli* (6, 7), *Pseudomonas syringae* (11) and *Xanthomonas campestris* (21). An example of plasmid associated resistance to copper, involving four structural resistance genes (*cop A*, *B*, *C* and *D*) and two regulatory genes (*cop R* and *cop S*), was identified in *P. syringae* (11, 24, 25, 26). The product of the four structural genes are two periplasmic proteins (CopA and CopC), an outer membrane protein (CopB) and an inner membrane protein (CopD) (10, 11). Copper resistance operons bearing a similar structure to the *P. syringae* operon have been found in *E. coli* and *X. campestris* (11, 37). Until now, genes related to copper resistance have not been identified in *T. ferrooxidans*.

In this paper, the effect of copper and other heavy metals in the growth of copper-treated and untreated cells of *T. ferrooxidans* strain LR was investigated. The response of *T. ferrooxidans* LR to cadmium, copper, nickel and zinc was also investigated by 2-D PAGE of total proteins. Changes in the cytosolic and membrane protein profiles, as well as differences in protein phosphorylation, were investigated in cells grown in the presence and absence of copper.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The *T. ferrooxidans* strains used in this work are listed in Table 1. The strains were grown with shaking at 30°C in modified T&K liquid medium (36), containing $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, 0.4 g/L;

MgSO₄ · 7 H₂O, 0.4 g/L; (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/L; FeSO₄ · 7 H₂O (33.4 g/L) ; pH 1.8 was adjusted with sulfuric acid. After growth, the cells were collected by filtration on Millipore membrane (0.45 µm), washed four times with 0.01 N H₂SO₄ and suspended in this diluted acid.

Respirometric experiments. Bacterial suspensions from the eight *T. ferrooxidans* strains listed in Table 1 were standardized before the respirometric experiments by total protein determination (3). The experiments were conducted in a Warburg respirometer in 25 mL Warburg flasks. The main compartment of each flask contained 0.3 mL of cell suspensions (~6.5 µg of protein) and 2.2 mL of a copper sulfate solution, pH 1.8. The copper concentrations used in the experiments were 100, 200, 300 and 400 mM. Half mL of the oxidizable substrate (120 mM Fe²⁺) was placed in the side arm of the Warburg flask and 0.1 mL of 20% (w/v) KOH in a Whatman n° 1 filter paper was placed in the center well.

The respirometric experiments were carried out in a water bath at 30°C and 150 strokes/min. The cells and the metal solution were kept in contact for 10 min before the oxidizable substrate was added to the main compartment. Oxygen uptake was measured in 15 min intervals for 150 min. The rate of oxygen consumption was calculated for each experiment from the linear part of the curve and the results were expressed as relative values (%) in comparison with values obtained for controls (*T. ferrooxidans* strains without copper).

***T. ferrooxidans* growth experiments.** Cells from *T. ferrooxidans* strain LR were successively inoculated in T&K medium containing 100 and 200 mM of copper sulfate. These copper-treated cells, as well as cells grown in the absence of copper, were washed in 0.01 N H₂SO₄ and used to inoculate T&K medium containing cadmium (600 mM), copper (200 mM), nickel (600 mM) or zinc (600 mM), as sulfates. Controls consisted of copper-treated and untreated cells inoculated in T&K media without metal.

The experiments were performed in duplicate in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of T&K medium, pH 1.8, inoculated with 0.75×10^9 cells, at 30°C on a rotatory shaker at 300 rpm. Bacterial growth was monitored every 24 h by ferrous iron titration with potassium dichromate (15).

Total protein extraction and 2-D PAGE analyses. Total protein was extracted from *T. ferrooxidans* LR cells grown in the absence (control) or in the presence of 600 mM cadmium, 200 mM copper, 600 mM nickel or 600 mM zinc, essentially as described by De Mot & Vanderleyden (12). After isolation, the total protein was suspended in 75 µL of lysis buffer [9.8 M urea, 2% (v/v) Nonidet P-40, 100 mM dithiothreitol and 2% (v/v) ampholytes (BioRad), pH 5-8 (5 parts) and pH 3-10 (1 part)] and the concentration was determined using a protein assay kit (BioRad). Samples were stored at -70°C.

Approximately 120 µg of total protein were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) according to De Mot & Vanderleyden (12). Ampholytes pH 5-8 and pH 3-10 (BioRad) in a 5:1 ratio were

used in the first dimension. The upper reservoir was loaded with 20 mM NaOH and the lower reservoir with 10 mM H₃PO₄. Pre running conditions were 15 min at 200V, 30 min at 300 V and 60 min at 400 V. The first dimension gel was run at 400 V for 18 h. Second dimension analysis was performed according to Laemmli (19) on 12% polyacrylamide gels. Protein molecular weight standards (Gibco BRL) were electrophoresed with samples in the second dimension gels. After electrophoresis, the second dimension gels were stained with silver.

Cytosolic and membrane proteins isolation, analysis by SDS-PAGE and *in vitro* phosphorylation. The protocols described by Amaro et al. (1) and Booth & Curtis (2) were used for protein isolation, after modifications. Cells from the *T. ferrooxidans* LR were grown in the absence and in the presence of 200 mM copper. They were harvested at the end of the log phase, washed four times in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA and incubated for 1 h at room temperature with lysozyme (60 µg/mL) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.67 mM EDTA. After incubation, dithiotreitol was added to a final concentration of 1 mM and the cells were disrupted by sonication. Unbroken cells were removed by centrifugation at 9,000 rpm for 4 min at 10°C, in a microfuge. Cell membranes were separated by centrifugation at 100,000 x g for 2 h at 10°C. The pellet (membrane) was washed with 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.67 mM EDTA and solubilized with 0.2% Nonidet P-40 in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.67 mM EDTA before phosphorylation.

The cytosolic and membrane proteins were incubated at 30°C for 30 min

with 10 μCi of $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol) per 100 μL sample, supplemented with 10 mM MgCl_2 . The unincorporated label was removed by precipitation of proteins on ice for 2 h with 10 volumes of acetone. The proteins were solubilized with Laemmli's sample buffer and approximately 15 μg were separated by SDS-PAGE (19). The Tris-glycine running buffer was supplemented with 0.05% Nonidet P-40 to improve the resolution of membrane proteins (13). Gels were stained with Coomassie brilliant blue R followed by autoradiography.

RESULTS

The effect of copper in oxygen uptake by *T. ferrooxidans*.

Respirometric experiments were performed to evaluate the effect of different concentrations of copper (100, 200, 300 and 400 mM) on the oxygen consumption by eight *T. ferrooxidans* strains (Table 1). In the presence of 100 mM copper there was practically no inhibition and oxygen uptake was higher than 90% for all strains (Fig. 1). None of the copper concentrations used in the experiments fully inhibited oxygen uptake by the strains (Fig. 1). However, the level of resistance to copper presented a variation among the strains. That is, at 200 mM copper, the *T. ferrooxidans* strain LR did not show any inhibition, whereas all the other strains were inhibited. The most affected strains were *T. ferrooxidans* SSP (34% of inhibition) and *T. ferrooxidans* V3 (27% of inhibition). As the copper concentrations raised to 300 and 400 mM a progressive inhibition in the oxygen uptake was observed (Fig. 1). Apparently, there was no correlation

between the origin of the strains (Table 1) and inhibition of oxygen uptake due to the presence of copper (Fig. 1); *T. ferrooxidans* V3, originally isolated from a copper mine, was one of the most affected strains (Fig. 1). Since at 200 mM copper a better differentiation was observed among the strains, we selected this concentration and *T. ferrooxidans* strain LR for further experiments.

Growth of copper-treated cells in the presence of other heavy metals.

The effect of cadmium (600 mM), copper (200 mM), nickel (600 mM) and zinc (600 mM) on the growth of *T. ferrooxidans* LR is shown in Figure 2A. In the absence of metal, *T. ferrooxidans* LR was able to oxidize the available ferrous iron in 48 h, whereas growth was differentially inhibited in the presence of each metal (Fig. 2A). Copper presented the highest growth inhibitory effect, even though the concentration of cadmium, nickel and zinc used in the experiment was three times higher (Fig. 2A).

To evaluate the effect of heavy metals on *T. ferrooxidans* LR previously grown in the presence of copper, copper-treated and untreated cells were inoculated in medium without metal and in media containing cadmium (600 mM), copper (200 mM), nickel (600 mM) or zinc (600 mM). Improved growth, in the presence of copper, was achieved by the copper-treated cells (Fig. 2B). Approximately 190 h of incubation were necessary for complete oxidation of ferrous iron by untreated cells in the presence of copper (Fig. 2A) whereas the copper-treated cells took 139 h to oxidize all the ferrous iron (Fig. 2B). In contrary, when the copper-treated cells were inoculated in medium containing

cadmium, nickel or zinc, growth was completely inhibited (Fig. 2B), suggesting the involvement of specific mechanisms in *T. ferrooxidans* resistance to metals.

2-D analyses of total protein from *T. ferrooxidans* grown in the presence of different heavy metals. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) was used to detect alterations in protein synthesis in *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of cadmium (600 mM), copper (200 mM), nickel (600 mM) or zinc (600 mM) (Fig. 3). Altered proteins detected in the gels, are listed in Table 2. It is important to mention that only the protein changes that were reproducible in at least two different gels were taken into consideration.

The synthesis of two proteins, spot 1 (105 kDa) and spot 4 (54 kDa) (Fig. 3A), was diminished or suppressed in the presence of the four heavy metals used in the experiment (Fig. 3B, 3C, 3D and 3E). Three proteins with apparent molecular weight of 42 (spot 6), 28 (spot 7) and 16 kDa (spot 8) had their synthesis increased in the presence of copper (Fig. 3B). In the presence of cadmium, the synthesis of the 16 kDa (spot 8) protein was suppressed (Fig. 3E). A 58 kDa (spot 3) and a 42 kDa (spot 5) protein had their synthesis diminished in the presence of zinc (Fig. 3C) and nickel (Fig. 3D), respectively. Both proteins diminished in the presence of cadmium (Fig. 3E), whereas the synthesis of a 66 kDa (spot 2) protein was enhanced (Fig. 3E). As Fig. 3 shows, the presence of different heavy metals resulted in different responses, at the level of protein synthesis, by the *T. ferrooxidans* cells.

SDS-PAGE analysis of cytosolic and membrane proteins from *T. ferrooxidans* LR grown in the presence of copper. Cytosolic and membrane proteins were isolated from cells grown in the absence or in the presence of 200 mM copper. A total of 4 cytosolic proteins had their synthesis altered in the presence of copper (Fig. 4B, lane 1). Two of them, with apparent molecular weight of 40 and 28 kDa, had their synthesis enhanced in the presence of copper (Fig. 4B, lane 1). The 28 kDa protein is probably the same one observed in the 2-D PAGE analysis, whose synthesis was increased in the presence of copper (Fig. 3B) but not in the presence of the other heavy metals (Fig. 3C, D and E). The two other proteins, with apparent molecular weight of 36 and 30 kDa (Fig. 4B, lane 1), presented a decrease in synthesis in relation to the control (Fig. 4A, lane 1).

The number of membrane proteins altered in the presence of copper was larger than the one found for cytosolic proteins. The apparent molecular weight of the membrane proteins that had their synthesis enhanced in the presence of copper ranged from 60 to 43 kDa and the ones that had their synthesis decreased presented apparent molecular weight of 96, 70, 34 and 28.5 kDa (Fig. 4B, lane 2).

***In vitro* phosphorylation of proteins from *T. ferrooxidans* LR grown in the presence of copper.** The cytosolic and crude membrane fractions were incubated in the presence of [γ -³²P]ATP and as shown in Figure 5, several protein bands were radiolabelled. When cells were grown in the presence of 200

mM copper (Fig. 5B), a few bands presented a stronger labelling when compared to the control (Fig. 5A). In the cytosol, one high molecular weight band (more than 200 kDa) and two smaller proteins (38 and 33 kDa) presented a slight, but noticeable increase in phosphorylation (Fig. 5B, lane 1). The major differences in phosphate incorporation in cells grown in the presence of copper were observed in the membrane fraction (Fig. 5B, lane 2). In this fraction, a band of apparent molecular weight over 200 kDa and a 26 kDa protein clearly presented an increase in phosphorylation when compared to the control (Fig. 5A, lane 2).

DISCUSSION

Respirometric experiments showed that among eight strains, *Thiobacillus ferrooxidans* LR, isolated from a Brazilian uranium mine, was not susceptible to 200 mM copper, though this copper concentration presented an inhibitory effect on cell replication as indicated by the growth curve of Fig. 2A. Similar results were found for *T. ferrooxidans* by Roy & Mishra (31) and Garcia & Silva (14).

Brahmaprakash et al. (4) observed different lag phases for *T. ferrooxidans* grown in the presence of copper and zinc. As the results in Figure 2A shows, different lag phases were observed for cadmium, copper, nickel and zinc. According to Brahmaprakash et al. (4), these different lag phases can be an indication of the involvement of metal specific mechanisms, in cell protection. The longer lag phase was observed for 200 mM copper although the concentration of cadmium, nickel and zinc used was three times higher (600 mM). When growth

experiments were conducted with 200 mM of cadmium, nickel and zinc (results not shown) the lag period decreased, in comparison to 600 mM, indicating that copper has a stronger effect in the *T. ferrooxidans* LR cells than the other tested metals. The results presented here indicate that the *T. ferrooxidans* growth is affected by the level and the type of metal cation present in the medium, which is in agreement with the findings of Natarajan et al. (28) and Brahmaaprakash et al. (4).

To further investigate if *T. ferrooxidans* response to metals involved specific mechanisms, copper-treated and untreated cells were inoculated in media without metal and containing 600 mM cadmium, 200 mM copper, 600 mM nickel and 600 mM zinc. The copper-treated cells, in medium without copper, achieved maximum growth in 72 h of culture, that is, 24 h more than the time required for untreated cells to grow in medium without metal. These results are an indication of the occurrence of modifications in the cellular metabolism of the copper-treated cells. In comparison to untreated cells, the subsequent subculture of *T. ferrooxidans* LR in 100 and 200 mM copper resulted in a growth improvement of these cells in the presence of this metal. Similar results were reported by Natarajan et al. (28), where *T. ferrooxidans* growth limitations in the presence of copper were overcome by copper-adapted cells. Our copper-treated cells were unable to grow in the presence of cadmium, nickel and zinc within 190 h of culture. This can be one more indication of the specificity of the metal resistance mechanism(s) of *T. ferrooxidans*.

Jerez (16) and Jerez et al. (17) showed that under stress, *T. ferrooxidans*

cells alters the synthesis of specific proteins. Amaro et al. (1) used SDS-PAGE and 2-D PAGE to detect changes in protein synthesis of *T. ferrooxidans* cells subjected to pH changes. At the protein level, our 2-D PAGE analysis showed that in general, the changes in protein synthesis were different for *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of different heavy metals. Only two proteins, spot 1 and 4, had their synthesis affected by the four heavy metals. Three proteins, spot 6, 7 and 8, had their synthesis enhanced only in the presence of copper which, once again, demonstrates that specific responses are activated by *T. ferrooxidans* in the presence of this metal. Several changes were also observed by SDS-PAGE analysis of cytosolic and membrane proteins isolated from *T. ferrooxidans* LR cells grown in the presence of 200 mM copper. Apparently, more membrane proteins were affected by the presence of the metal than cytosolic proteins.

Seeger et al. (32), working with *T. ferrooxidans*, found that several polypeptides were phosphorylated *in vivo*, including the chaperones GroEL and DnaK. They also found that the phosphorylation of these two chaperones and many other proteins increased when cells were submitted to phosphate starvation or were grown with sulphur as the oxidizable substrate. These results could be an indication of a possible role of protein phosphorylation in sensing and regulation stress responses in *T. ferrooxidans* (32). In this work, we found that when *T. ferrooxidans* LR cells were grown in the presence of copper, there was an increase in the phosphorylation state of mainly two proteins found in the crude membrane preparations. The cytosolic fraction also showed an increase in the phosphorylation state of three proteins. However, the extent of phosphorylation of

the cytosolic proteins was less accentuated than phosphorylation of membrane proteins. The increased phosphorylation observed in the membrane proteins is in agreement with the hypothesis that membrane proteins could sense environmental changes and transmit this information to cytoplasmic proteins through phosphorylation events (9, 18, 35). In some phosphorylation experiments conducted by us, the cytosolic fraction was incubated with the membrane fraction. It was observed that a high molecular weight protein from the membrane fraction lost its label whereas another protein appeared phosphorylated in the mixture (results not shown). This could be an indication of the presence of kinases and phosphatases involved in signal transduction pathways which are activated by stressful conditions such as the presence of heavy metals.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. S. Groudev, R. Liberato, and Dr. O. H. Tuovinen for providing *T. ferrooxidans* strains V3, CMV and I-35, respectively. We are greatly indebted to Dr. Gilson Paulo Manfio, Dr. Yoko Bomura Rosato and Dr. Maria Célia Bertolini for suggestions and discussion on the manuscript.

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 1997/1069-0). O. G. Jr. received research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M. T. M. N. received research fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A. C. S., A. C. and P. C. P. C. received research fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. **Amaro, A. M., D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano, and C. A. Jerez.** 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. **173**:910-915.
2. **Booth, B. R., and N. A. C. Curtis.** 1977. Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.1. Biochem. Biophys. Res. Commun. **74**:1168-1176.
3. **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.
4. **Brahmaprakash, G. P., P. Devasia, K. S. Jagadish, K. A. Natarajan, and G. Ramananda Rao.** 1988. Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strain tolerant to copper and zinc. Bull. Mat. Sci. **10**:461-465.
5. **Brierley, C. L.** 1978. Bacterial leaching. Crit. Rev. Microbiol. **6**:207-262.
6. **Brown, N. L., B. T. O. Lee, and S. Silver.** 1994. Bacterial transport of and resistance to copper, p. 405-434. In H. Sigel and A. Sigel (ed.), Metal ions in biological systems, vol. 30. Marcel Dekker, New York.
7. **Brown, N. L., S. R. Barrett, J. Camakaris, B. T. O. Lee, and D. A. Rouch.** 1995. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. Mol. Microbiol. **17**:1153-1166.

8. **Cervantes, C., and F. Gutierrez-Corona.** 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:121-138.
9. **Chater, K., A. Downie, B. Drøbak, and C. Martin.** 1995. Alarms and diversions: the biochemistry of development. *Trends in Genetics* **11**:79-82.
10. **Cooksey, D. A.** 1993. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **7**:1-5.
11. **Cooksey, D. A.** 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:381-386.
12. **De Mot, R., and J. Vanderleyden.** 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* **35**:960-967.
13. **Dubreuil, R. R., T. K. Rosiere, M. C. Rosner, and G. B. Bouck.** 1988. Properties and topography of the major integral plasma membrane protein of a unicellular organism. *J. Cell. Biol.* **107**:191-200.
14. **Garcia Jr., O., and L. L. Silva.** 1991. Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals. *Biotechnol. Lett.* **13**:567-570.
15. **Garcia Jr., O., J. M. Bigham, and O. H. Tuovinen.** 1995. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **41**:508-514.
16. **Jerez, C. A.** 1988. The heat shock response in meso and thermophilic chemolithotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**:289-294.
17. **Jerez, C. A., D. Chamorro, I. Peirano, H. Toledo, and R. Arredondo.** 1988.

- Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Biochem. Int.* **17**:989-999.
18. **Kennelly, P. J., and M. Potts.** 1996. Fancy meeting you here! a fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* **178**:4759-4764.
19. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
20. **Leduc, L. G., and G. D. Ferroni.** 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**:103-120.
21. **Lee, Y. A., M. Hendson, N. J. Panopoulos, and M. N. Schroth.** 1994. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with blue copper proteins and multicopper oxidase. *J. Bacteriol.* **176**:173-188.
22. **Livesey-Goldblatt, E., P. Norman, and D. R. Livesey-Goldblatt.** 1983. Gold recovery from arsenopyrite/pyrite ore by bacterial leaching and cyanidation, p. 627-641. *In* G. Rossi, and A. E. Torma (ed.), Recent progress in biohydrometallurgy. Associazione Mineraria Sarda, Iglesias.
23. **McCready, R. G. L., and W. D. Gould.** 1990. Bioleaching of uranium, p. 107-126. *In* H. L. Ehrlich, and C. L. Brierley (ed.), Microbial mineral recovery. McGraw Hill Book Co., New York.
24. **Mellano, M. A., and D. A. Cooksey.** 1988a. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *J. Bacteriol.* **170**:2879-2883.
25. **Mellano, M. A., and D. A. Cooksey.** 1988b. Induction of the copper

- resistance operon from *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. **170**:4399-4401.
26. **Mills, S. D., C. A. Jasalavich, and D. A. Cooksey.** 1993. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. **175**:1656-1664.
27. **Modak, J. M., and K. A. Natarajan.** 1995. Development of special strains of *Thiobacillus ferrooxidans* for enhanced bioleaching of sulphide minerals, p. 33-46. In T. Vargas, C. A. Jerez, J. V. Wiertz, and H. Toledo (ed.), Biohydrometallurgical processing. University of Chile, Santiago.
28. **Natarajan, K. A., K. Sudeesha, and G. R. Rao.** 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie van Leeuwenhoek **66**:303-306.
29. **Pramila, T., G. R. Rao, K. A. Natarajan, and C. D. Rao.** 1996. Differential influence of ions on the copy number of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans*. Curr. Microbiol. **32**:57-63.
30. **Rawlings, D. E., and T. Kusano.** 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbiol. Rev. **58**:39-55.
31. **Roy, P., and A. K. Mishra.** 1981. Iron oxidation not coupled to growth in *Thiobacillus ferrooxidans* in presence of toxic metals. J. Appl. Bacteriol. **51**: 387-392.
32. **Seeger, M., G. Osorio, and C. A. Jerez.** 1996. Phosphorylation of GroEL, DnaK and others proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. FEMS Microbiol. Lett. **138**:129-134.
33. **Silver, S.** 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. Gene **179**:9-19.

34. **Solioz, M., A. Odermatt, and R. Krapf.** 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* **346**:44-47.
35. **Swanson, R. V., L. A. Alex, and M. I. Simon.** 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *TIBS* **19**:485-490.
36. **Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly.** 1973. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* **88**:285-298.
37. **Voloudakis, A. E., C. L. Bender, and D. A. Cooksey.** 1993. Similarity between copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**:1627-1634.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. *T. ferrooxidans* strains response to 100, 200, 300 and 400 mM copper in respirometric experiments. Results are expressed as relative oxygen uptake (%) in comparison with the respective controls (respirometric experiments without copper).

FIG. 2. Growth curves of *T. ferrooxidans* strain LR in the presence of heavy metals. Untreated (A) and copper-treated cells (B) were grown in the presence of 200 mM copper (○), 600 mM nickel (△), 600 mM zinc (▽) and 600 mM cadmium (+). Copper-treated (B) and untreated (A) cells grown in the absence of metal were used as controls (□).

FIG. 3. Two-dimensional PAGE analysis of total proteins from *T. ferrooxidans* LR cells grown in the absence of heavy metals (A) and in the presence of 200 mM copper (B), 600 mM zinc (C), 600 mM nickel (D) or 600 mM cadmium (E). All the proteins that had their synthesis affected by the presence of metal were progressively numbered according to their molecular mass and are indicated by arrows in (A). Circles and squares represent proteins that are present in larger and smaller amounts, respectively, relative to the control (A). The pH 5 and pH 8 side of the isoelectric focusing gel is on the left and the right side of the second dimensional gel, respectively. The molecular mass (kDa) of standard proteins are indicated in the left side of the gels.

FIG. 4. The effect of 200 mM copper on cytosolic and membrane protein synthesis by *T. ferrooxidans*-LR. SDS-PAGE analysis of cytosolic (lane 1) and membrane (lane 2) proteins from cells grown in the absence (A) or in the presence (B) of copper. Arrows and arrowheads indicate proteins induced or repressed by copper, respectively. The molecular mass (kDa) of standard proteins are indicated on the left side of the gels.

FIG. 5. The effect of copper on *in vitro* phosphorylation of proteins from the cytosolic and crude membrane fractions. Cytosolic (lane 1) and membrane (lane 2) proteins from *T. ferrooxidans* cells grown in the absence (control, A) or in the presence (B) of 200 mM copper were incubated with [γ - 32 P] and separated by SDS-PAGE. Panels A and B are autoradiograms of the gels presented on Fig. 4. Asterisks indicate the proteins that presented an increase in phosphorylation in the presence of copper, in comparison with the control. The molecular mass (kDa) of standard proteins are indicated on the left side of the gels.

Table 1. *Thiobacillus ferrooxidans* strains and sources.

Strains	Source
AMF*	coal mine from Figueira , State of Paraná, Brazil
CMV	effluent of gold mine, State of Minas Gerais, Brazil; received from R. Liberato (Morro Velho Company)
FG-460*	effluent of uranium mine from Figueira, State of Paraná, Brazil
I-35	received from Dr. O. H. Tuovinen (Ohio State University, USA)
LR*	effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil
S*	effluent of column leaching of copper ore from Surubim mine (Caraiba), State of Bahia, Brazil.
SSP*	effluent of coal mine from Sideropolis, State of Santa Catarina, Brazil.
V3	copper mine, Bulgaria; received from Dr. S. Groudev (University of Sofia, Bulgaria)

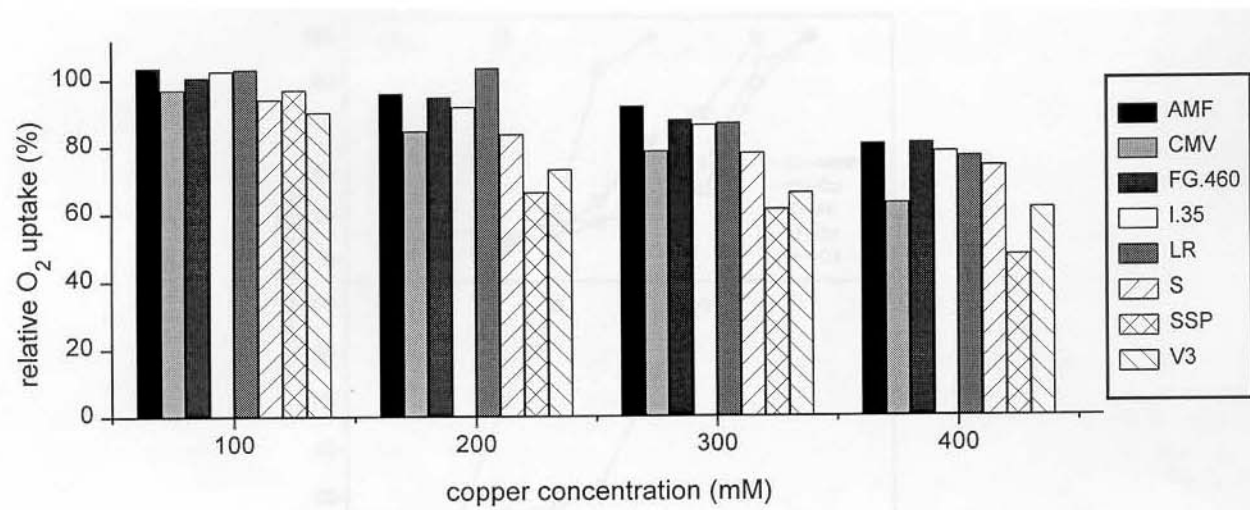
* all these strains were isolated by Dr. O. Garcia Jr. (Universidade Estadual Paulista, Brazil)

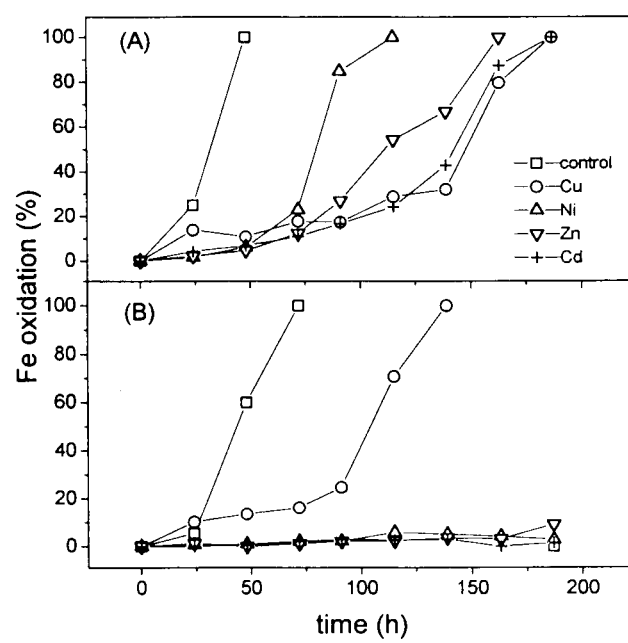
Table 2. Protein synthesis by *T. ferrooxidans* strain LR in response to heavy metals

protein ^a	aparent molecular mass(kDa)	profiles in presence of ^b :			
		Cu	Zn	Ni	Cd
1	105	-	-	-	-
2	66	nc	nc	nc	+
3	58	nc	-	nc	-
4	54	-	-	-	-
5	42	nc	nc	-	-
6	42	+	nc	nc	nc
7	28	+	nc	nc	nc
8	16	+	nc	nc	-

^a numbers refer to proteins labelled in Figure 3.

^b changes on the proteins levels in relation to control (without heavy metal): +, proteins in increased amount or newly synthesized; -, proteins in diminished amount or absent; nc, no significant change.

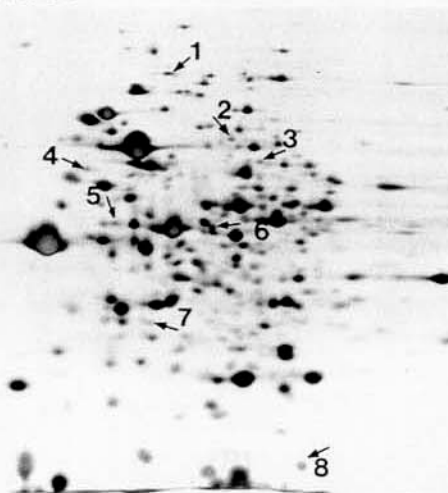
**Figure 1**

**Figure 2**

(A) control

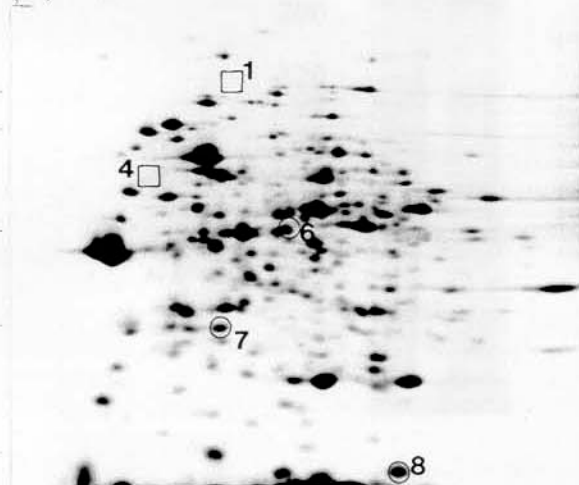
80

97.4
68.0
43.0
29.0
18.4

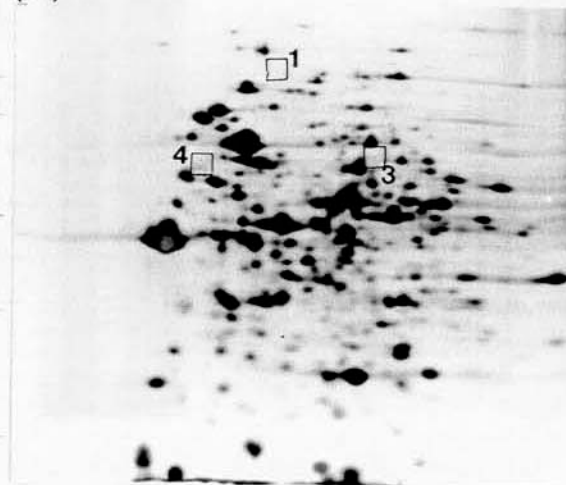


(B) Cu

97.4
68.0
43.0
29.0
18.4

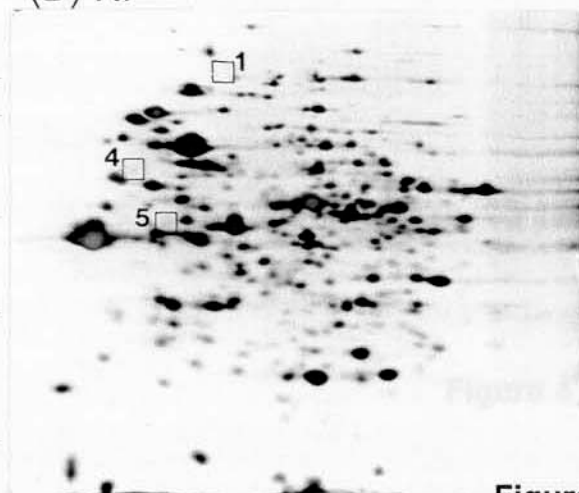


(C) Zn



(D) Ni

97.4
68.0
43.0
29.0
18.4



(E) Cd

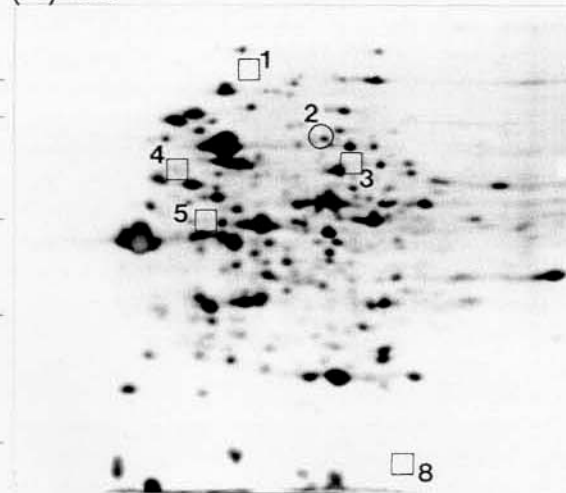


Figure 3

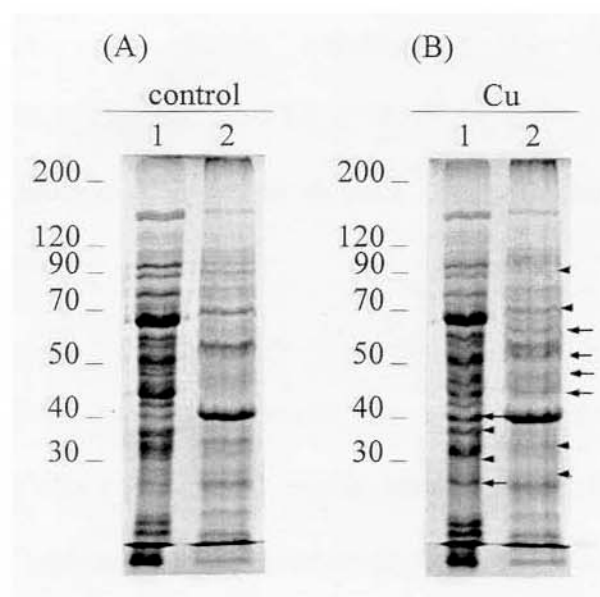
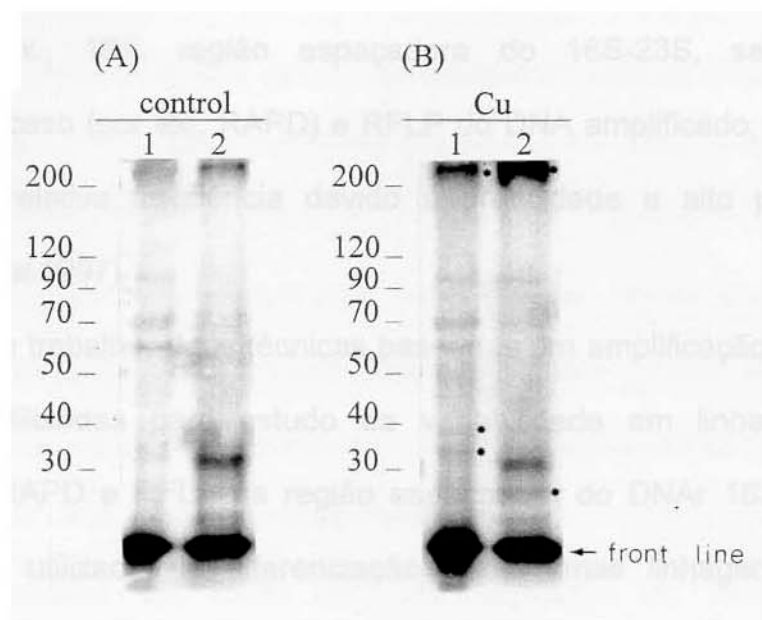


Figure 4

**Figure 5**

DISCUSSÃO GERAL

Diversos métodos de tipagem de DNA estão sendo cada vez mais utilizados na diferenciação e caracterização de isolados bacterianos (Aubel *et al.*, 1997; Yoon *et al.* 1997; Lu *et al.*, 1997), complementando métodos de tipagem clássicos. Métodos baseados na amplificação de fragmentos de DNA específicos (por ex., 16S, região espaçadora do 16S-23S, sequências repetitivas) ou ao acaso (por ex., RAPD) e RFLP do DNA amplificado, têm sido empregados com relativa frequência devido à praticidade e alto poder de resolução (Yoon *et al.* 1997).

No presente trabalho, duas técnicas baseadas em amplificação de DNA por PCR foram utilizadas para estudo da variabilidade em linhagens de *Thiobacillus* spp.: RAPD e RFLP da região espaçadora do DNAr 16S-23S. A técnica de RAPD, utilizada na diferenciação de algumas linhagens de *T. ferrooxidans*, apresentou resultados concordantes com os obtidos pela técnica de RFLP, utilizada para acessar variabilidade tanto intra- como interespecífica (*T. ferrooxidans* e *T. thiooxidans*). Utilizando-se ambas metodologias, a linhagem *T. ferrooxidans*-LR (linhagem utilizada na segunda parte do trabalho para estudos da resposta a metais), foi agrupada com a linhagem tipo ATCC 23270 e a maioria das linhagens de *T. ferrooxidans*.

Algumas linhagens de *Thiobacillus ferrooxidans* (LR, I-35, CMV, FG-460), estreitamente relacionadas entre si e não diferenciadas por RFLP, puderam ser diferenciadas por alguns dos 30 marcadores de RAPD utilizados, enquanto que

as linhagens V3 e SSP, que apresentaram similaridade de 97,6% por RAPD, puderam ser diferenciadas com 4 das 5 enzimas utilizadas na análise por RFLP. Portanto, as duas técnicas se mostraram complementares para a diferenciação das linhagens estudadas.

Ambas as técnicas confirmaram que as linhagens de *T. ferrooxidans* S, SSP e V3 são linhagens geneticamente muito distintas da linhagem-tipo ATCC 23270 e da maioria das linhagens de *T. ferrooxidans* testadas. Portanto, o presente estudo, que incluiu várias linhagens originárias do Brasil e ainda não caracterizadas por métodos de tipagem de DNA, confirmou a alta heterogeneidade de linhagens atualmente classificadas como *Thiobacillus ferrooxidans*. Tal resultado também foi observado para outras linhagens originárias de diversas partes do mundo, através de estudos do conteúdo de G+C e de hibridização DNA-DNA (Harrison, 1982).

Técnicas baseadas em PCR tem sido utilizadas na detecção e identificação dos microrganismos envolvidos na biolixiviação natural e comercial de minérios (Wulf-Durand *et al.*, 1997; Espejo & Romero, 1997; Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996). As metodologias utilizadas foram principalmente a amplificação de sequências do DNAr 16S e da região intergênica 16S-23S, além do sequenciamento de algumas dessas regiões, a fim de acessar a diferenciação intraespecífica (Goebel & Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996). A análise por RFLP realizada neste trabalho, embora apresente menor sensibilidade, possibilitou a rápida diferenciação intra- e interespecífica das linhagens de *Thiobacillus* spp, podendo ser uma alternativa

relativamente rápida para a análise da diversidade encontrada num sistema de biolixiviação.

Os estudos referentes às respostas induzidas por metais pesados em *T. ferrooxidans* foram realizados utilizando-se a linhagem LR, selecionada através de experimentos de respirometria. A metodologia de respirometria foi utilizada em detrimento de curvas de crescimento, devido à rapidez dos ensaios respirométricos e maior sensibilidade para a diferenciação das linhagens. A linhagem LR foi a linhagem que apresentou menor susceptibilidade ao cobre nestes experimentos.

Em geral, os resultados apresentados demonstraram que os mecanismos de resistência a metais em *T. ferrooxidans* são provavelmente específicos, pois respostas diferenciais a metais puderam ser observadas tanto através de curvas de crescimento, como em relação à síntese protéica. De acordo com Silver (1996), sistemas altamente específicos de resistência a metais pesados são conhecidos em várias bactérias, não havendo um mecanismo geral de resistência.

Concentrações bastante elevadas de metais (200 mM Cu, 600 mM Ni, 600 mM Cd, 600 mM Zn) foram utilizadas no estudo de proteínas induzidas. Tais concentrações se justificam pelo fato de, em concentrações mais baixas (por exemplo, 200 mM de Ni ou Zn), o período da fase *lag* ter sido pouco diferente do observado para o controle (resultados não mostrados). Assim, considerando que proteínas induzidas por condições de estresse são provavelmente sintetizadas nessa fase da curva de crescimento, foram adotadas concentrações de metais

que garantissem fase *lag* mais extensa.

De acordo com Natarajan e co-autores (1994), os longos períodos *lag* observados em curvas de crescimento de *T. ferrooxidans* na presença de cobre, são necessários para que ocorram rearranjos estruturais associados com a membrana citoplasmática, os quais capacitam as células para a oxidação do Fe^{+2} . Os experimentos aqui apresentados mostraram que vários aspectos estão envolvidos na resposta de *T. ferrooxidans* ao cobre: alterações a nível de síntese e de fosforilação de proteínas, tanto de membrana como do citosol. Não é possível saber ainda se as alterações detectadas estão de algum modo relacionadas à oxidação do Fe^{+2} em *T. ferrooxidans*.

O envolvimento de ATPases de membrana na regulação do cobre celular foi comprovado em *Enterococcus hirae*, sendo que as mesmas podem ser induzidas pelo metal (Solioz *et al.*, 1994). No momento, não é possível determinar se as proteínas de membrana induzidas por cobre em *T. ferrooxidans* podem estar envolvidas em um mecanismo semelhante ao observado em *E. hirae*.

Segundo Seeger *et al.* (1996), diferentes respostas a estresse podem ser reguladas de diferentes maneiras, como por exemplo, através da indução da síntese de proteínas, mecanismo que se caracteriza por um alto requerimento de energia, sendo que uma alternativa mais econômica em termos energéticos pode ser a modificação pós-traducional. Uma outra alternativa é uma combinação dos dois eventos (Seeger *et al.*, 1996).

Seeger *et al.* (1996) demonstraram que em condições de estresse por

falta de fosfato em *T. ferrooxidans*, o nível de fosforilação *in vivo* das chaperonas DnaK (68 kDa) e GroEL (62 kDa), dentre outras proteínas, apresentou um aumento significativo. Esses autores sugeriram que esse evento pode constituir parte de uma resposta geral a condições de estresse em *T. ferrooxidans*. Porém, em nossos experimentos de fosforilação *in vitro*, após crescimento das células na presença de 200 mM de cobre (Fig. 5), não foi detectado aumento na fosforilação de proteínas com peso molecular correspondentes ao das chaperonas citadas.

Seeger *et al.* (1996) também constataram que não houve um aumento na síntese das proteínas que apresentaram um maior nível de fosforilação *in vivo*, em condições de estresse por falta de fosfato. Com base nesse resultado, os autores consideraram que as variações nos níveis de fosforilação podem ser realmente atribuídas a mudanças no nível de fosforilação e não a um aumento na síntese de proteínas que normalmente apresentam fosforilação pós-traducional. Em nossos experimentos, aparentemente não houve também um aumento na síntese das proteínas que apresentaram um maior nível de fosforilação *in vitro*, após crescimento das células na presença de cobre (Figs 4B e 5B).

Segundo revisão de Silver (1996), um dos genes regulatórios do sistema plasmidial de resistência a cobre em *E. coli* (gene *pcoS*) codifica para a proteína sensora PcoS, encontrada na membrana, a qual provavelmente possui atividade de autoquinase, sendo que uma outra proteína regulatória PcoR é provavelmente transfosforilada. Embora tenha sido detectado em nossos

experimentos um aumento nos níveis de fosforilação de proteínas de membrana de *T. ferrooxidans* crescidas na presença de cobre, ainda não é possível saber se mecanismos semelhantes aos já descritos em outras espécies ocorrem em *T. ferrooxidans*.

Embora nossos resultados tenham indicado aumento dos níveis de fosforilação de proteínas *in vitro* após crescimento das células na presença de cobre, experimentos adicionais serão ainda necessários tanto para a caracterização dessas proteínas, como também para determinar se a fosforilação está envolvida na resposta *in vivo* de *T. ferrooxidans* a esse metal.

O prosseguimento deste trabalho através do isolamento das proteínas induzidas e sequenciamento da região amino-terminal das mesmas possibilitará a síntese de oligonucleotídeos degenerados, que poderão ser utilizados no isolamento dos genes correspondentes. O isolamento desses genes será uma etapa importante na elucidação dos mecanismos relacionados à resistência a metais pesados em *Thiobacillus ferrooxidans*.

CONCLUSÕES

1. A espécie *T. ferrooxidans* inclui linhagens que apresentam alto grau de diversidade genética, detectada tanto através de RAPD, como através de polimorfismos da região espaçadora do DNAr 16S-23S;
2. A espécie *T. thiooxidans* apresentou uma menor variabilidade genética que a espécie *T. ferrooxidans*, através da análise da região intergênica 16S-23S do DNAr;
3. Linhagens de thiobacilli originárias de áreas geográficas distintas apresentaram alta similaridade, não havendo correlação entre o grau de similaridade entre as linhagens e o local de onde foram isoladas;
4. As técnicas de RAPD e RFLP da região espaçadora do DNAr 16S-23S possibilitaram a diferenciação de linhagens de *Thiobacillus* spp. através de *fingerprintings*, os quais podem ser obtidos para a caracterização de novos isolados;
5. As linhagens de *T. ferrooxidans* apresentaram variabilidade na susceptibilidade ao cobre durante o processo de respiração celular, sendo que a linhagem menos susceptível foi a LR, originária de mina de urânio;

6. O crescimento prévio de células de *T. ferrooxidans* na presença de cobre confere um maior desempenho para o crescimento nesse metal, o que demonstra a importância de processos indutivos para o(s) mecanismo(s) de resistência a cobre em *T. ferrooxidans*;

7. O crescimento prévio de células de *T. ferrooxidans* na presença de cobre influenciou negativamente o crescimento em outros metais como cádmio, níquel e zinco, sugerindo a especificidade do(s) mecanismo(s) indutivo(s) de resistência ao cobre em *T. ferrooxidans*, em relação a esses outros metais testados;

8. A resposta celular ao cádmio e ao cobre em *T. ferrooxidans* envolve o aumento da síntese de proteínas específicas, não induzidas na presença de outros metais;

9. O mecanismo de resistência ao cobre em *T. ferrooxidans* envolve alterações na síntese de proteínas do citosol e, principalmente, na síntese de proteínas de membrana;

10. Alterações nos níveis de fosforilação de proteínas também podem estar envolvidos na resposta celular de *T. ferrooxidans* ao cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, A. M.; CHAMORRO, D.; SEEGER, M.; ARREDONDO, R.; PEIRANO, I. ; JEREZ, C. A. 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **173**: 910-915.
- AUBEL, D.; RENAUD, F. N. R.; FRENEY, J. 1997. Genomic diversity of several *Corynebacterium* species identified by amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer regions. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **47**: 767-772.
- BALDRY, M.G.C.; HOGARTH, D.S.; DEAN, A.C.R. 1977. Chromium and copper sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. **Microbios Lett.**, **4**: 7-16.
- BARROS, M. E. C.; RAWLINGS, D. E.; WOODS, D. R. 1985. Cloning and expression of the *Thiobacillus ferrooxidans* glutamine synthetase gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **164**: 1386-1389.
- BECK, J. V.; SHAFIA, F. M. 1964. Effect of phosphate ion and 2,4-dinitrophenol on the activity of intact cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **88**: 850-857.
- BENDER, C.L.; COOKSEY, D.A. 1986. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: conjugative transfer and role in copper resistance. **J. Bacteriol.**, **165**: 534-541.
- BENDER, C. L.; COOKSEY, D. A. 1987. Molecular cloning of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **J. Bacteriol.**, **169**: 470-474.

BENDER, C.L.; MALVICK, D.K.; CONWAY, K.E.; GEORGE, S; PRATT, P. 1990.

Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Appl. Environm. Microbiol.**, **56**: 170-175.

BITTON, G; FREIHOFFER, V. 1978. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. **Microb. Ecol.**, **4**:119-125.

BRAHMAPRAKASH, G.P.; DEVASIA, P.; JAGADISH, K.S.; NATARAJAN, K.A.; RAO, G.R. 1988. Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strain tolerant to copper and zinc. **Bull. Mat. Sci.**, **10**: 461-465.

BRIERLEY, C. L. 1978. Bacterial leaching. **Crit. Rev. Microbiol.**, **6**: 207-262.

BROWN, N. L.; ROUCH, D. A.; LEE, B. T. O. 1992. Copper resistance determinants in bacteria. **Plasmid**, **27**: 41-51.

CERVANTES, C.; GUTIERREZ- CORONA, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, **14**: 121-137.

CERVANTES, C; SILVER, S. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. **Plasmid**, **27**: 65-71.

COLLINS, Y.E.; STOTZKY, G. 1989. Factors effecting the toxicity of heavy metals to microbes. pp. 31-90. *In*: T.J. Bevrige & R.J. Doyle (ed.), *Metal Ions and Bacteria* , New York: John Wiley.

COOKSEY, D.A. 1990. Plasmid-determined copper resistance in *Pseudomonas syringae* from impatiens. **Appl. Environm. Microbiol.** **56**: 13-16.

DISPIRITO, A. A.; TUOVINEN, O. H. 1982. Kinetics of uranous ion and ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Arch. Microbiol.**, **133**: 33-37

- DUXBURY, T.; BICKNELL, B. 1983. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal- polluted soils. **Soil Biol. Biochem.**, **15** : 243-250.
- ERARDI, F.X.; FAILLA, M.L.; FALKINHAM III, J.D.1987. Plasmid -encoded copper resistance and precipitation by *Mycobacterium scrofulaceum*. **Appl. Environm. Microbiol.**, **53**: 1951-1954.
- ESPEJO, R. T.; ROMERO, J. 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. **Appl. Environm. Microbiol.**, **63**: 1344-1348.
- GARCIA Jr., O. 1997. Microrganismos e metais, pp. 11-41. *In*: I. S. de Melo e J. L. Azevedo (ed.), Microbiologia Ambiental, Embrapa- CNPMA, Jaguariúna.
- 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.
- GOEBEL, B. M.; STACKEBRANDT, E. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. **Appl. Environm. Microbiol.**, **60**: 1614- 1621.
- GOLOMZIK, A. I.; IVANOV, V. I. 1965. Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* increased hydrogen iron and ion concentrations. **Mikrobiologiya**, **34**: 465-468.
- GROUDEV, S. N. 1980a. Differences between *Thiobacillus ferrooxidans* strains with respect to their ability to oxidize covellite. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 659-662.
- GROUDEV, S. N. 1980b. Leaching of sphalerite with different strains of

Thiobacillus ferrooxidans. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 1119-1122.

GROUDEVA, V. I., GROUDEV, S. N.; MARKOV, K. I. 1980. Nitrosoguanidine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the levels of its oxidizing activity. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **33**: 1401-1404.

GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I.; GENTCHEV, G. J. 1978a. Survival of *Thiobacillus ferrooxidans* after UV Irradiation. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 599-602.

GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I.; GENTCHEV, G. J. 1978b. UV induced mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* possessing high oxidizing activity. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 1197-1200.

GROUDEVA, V. I.; MARKOV, K. I.; GENTCHEV, G. J. 1978c. Ethylenimine mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, **31**: 1477-1479.

HARRISON, Jr., A. P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. **Arch. Microbiol.**, **131**: 68-76.

HARRISON, Jr., A. P. 1983. Genomic and physiological comparisons between heterotrophic thiobacilli and *Acidiphilium cryptum*, *Thiobacillus versutus* sp. nov., and *Thiobacillus acidophilus* nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **33**: 211-217.

HARWOOD-SEARS, V.; GORDON, A.S. 1990. Copper-induced production of

- copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. **Appl. Environm. Microbiol.**, **56**: 1327-1332
- HIGHAM D.P.; SADLER, P.J. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. **Science**, **225**: 1043-1046.
- HOLMES, D. S.; UI HAQ, R. 1989. Adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for industrial applications, pp. 115- 127. *In*: J. Salley, R. G. L. McCready & P.L. Wichlacz (ed.), Biohydrometalurgy. CANMET, Ottawa, Canada.
- HOLMES, D.S.; YATES, J.R.; SCHRADER, J. 1988. Mobile, repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans* and their significance for biomining, pp. 153-160. *In*: P.R. Norris & D.P. Kelly (ed.), Biohydrometallurgy, Chippenham: Research and Development Centre.
- HOWARD, A.; LUNDGREN, D. G. 1970. Inorganic pyrophosphatase from *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). **Can. J. Biochem.**, **48**:1302-1307.
- HUBER, H.; STETTER, K.O. 1990. *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. **Appl. Environm. Microbiol.**, **56**: 315-322
- HUTCHINS, S. R.; DAVIDSON, M. S.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. **Ann. Rev. Microbiol.**, **40**: 311-336.
- INOUE, C; SUGAWARA, K.; SHIRATORI, T.; KUSANO, T.; KITAGAWA, Y. 1989. Nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* chromosomal gene encoding mercuric reductase. **Gene**, **84**: 47-54.
- ISHIHARA, M.; KAMIO, Y; TERAOKI, Y. 1978. Cupric ion resistance as a new

- genetic marker of a temperature sensitive R plasmid, Rst1 in *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **82**: 74-80.
- JAIN, R. K. 1990. Copper-resistant microorganisms and their role in the environment. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **6**: 356-365.
- JEREZ, C.A. 1988. The heat shock response in meso- and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, **56**: 289-294
- JEREZ, C.A.; CHAMORRO, D.; PEIRANO, I.; TOLEDO, H.; ARREDONDO, R. 1988. Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. **Biochem. Int.**, **17**: 989-999.
- JI, G.; SILVER, S. 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **J. Ind. Microbiol.**, **14**: 61-75.
- KAUR, P.; ROSEN, B. P. 1992. Plasmid - encoded resistance to arsenic and antimony. **Plasmid**, **27**: 29-40.
- KELLY, D. P.; HARRISON, A. P. 1984. Genus *Thiobacillus*, pp. 1842-1858. In: J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig & J. G. Holt (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 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*, pp. 2638-2657. In: A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

- KUSANO, T.; SUGAWARA, K.; INOUE, C.; TAKESHIMA, T.; NUMATA, M.; SHIRATORI, T. 1992. Eletrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. **J. Bacteriol.**, **174**: 6617-6623.
- LANE, D. J.; HARRISON Jr., A. P.; STAHL, D.; PACE, B.; GIOVANNONI, S. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron- oxidizing eubacteria. **J. Bacteriol.**, **174**: 269- 278.
- LANE, D. J.; STAHL, D. A.; OLSEN, G. J.; HELLER, D. J.; PACE, N. R. 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA sequences. **J. Bacteriol.**, **163**: 75-81.
- LAWRENCE, R. W.; POULIN, R. 1995. The demand for biotechnology in mining in the 21st century, pp.185-195. *In*: T. Vargas, C. A. Jerez, J. V. Wiertz, and H. Toledo (ed.), Biohydrometallurgical processing, University of Chile, Santiago.
- LEDUC, L.G.; FERRONI, G.D. 1993. The need for *T. ferrooxidans* strain selection in applications of bioleaching, pp. 25-42. *In*: W.D. Gould, L. Lortie & D. Rodrigue (ed.), Proceedings of the Tenth Annual Meeting of BIOMINET, CANMET Special Publication SP94-1, Mississauga, Canada.
- LEDUC, L.G.; FERRONI, G.D.; TREVORS, J.T. 1997. Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **13**: 453-455.
- LEE, Y.A.; HENDSON, M.; SCHROTH, M.N. 1992. Cloning and characterization of copper-resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. **Phytopathology**, **82**: 1125.

- LEE, B.T.O.; BROWN, N.L.; ROGERS, S.; BERGEMANN, A.; CAMAKARIS, J.; ROUCH, D. 1990. Bacterial response to copper in the environment: copper resistance in *Escherichia coli* as a model system. **NATO ASI Ser. G.**, **23**: 625-632.
- LU, W.; EVANS, E. H.; McCOLL, S. M.; SAUNDERS, V. A. 1997. Identification of cyanobacteria by polymorphisms of PCR-amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiol. Lett.**, **153**: 141-149.
- LUKTENHAUS, J.F. 1977. Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **131**: 631-637.
- LUNDGREN, D. G.; SILVER, M. 1980. Ore leaching by bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, **34**: 263-283.
- MARTIN, P. A. W.; DUGAN, P. R.; TUOVINEN, O. H. 1981. Plasmid DNA in acidophilic chemolithotrophic *Thiobacilli*. **Can. J. Microbiol.**, **27**: 850-853.
- MERGEAY, M. 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. **Trends Biotechnol.**, **9**: 17-24.
- MISRA, T. K. 1992. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. **Plasmid**, **27**: 4-16.
- MOREIRA, D.; AMILS, R. 1997. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **47**: 522-528.
- NATARAJAN, K. A.; SUDEESHA, K.; RAO, R. 1994. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Antonie van Leeuwenhoek**, **66**: 303-306.
- NIES, D. H. 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes.

Plasmid, 27: 17- 28.

NIES, D. H.; MERGEAY, M.; FRIEDRICH, B.; SCHLEGEL, H. G. 1987. Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. **J. Bacteriol.**, **169**: 4865-4868.

NORRIS, P.R.; BARR, D.W.; HINSON, D. 1988. Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite, pp. 43-49. *In*: P.R. Norris & D.P. Kelly (ed.), Biohydrometallurgy (Proceedings of the International Symposium, Warwick 1987), Science and Technology Letters, Kew.

NORRIS, P.R.; PARROTT, L. 1986. High temperature, mineral concentrate dissolution with *Sulfolobus*, pp.355-365. *In*: R.W. Lawrence, R.M.R. Branion & H.G. Ebner (ed.), Fundamental and Applied Biohydrometallurgy. Elsevier, Amsterdam.

NOVO, M.T.M.; SOUZA, A.P.; GARCIA JR.,O.; OTTOBONI, L.M.M. 1996. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. **Syst. Appl. Microbiol.**, **19**: 91-95.

ODERMATT, A.; SUTER, H.; KRAPF, R.; SOLIOZ, M. 1992. An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. **Ann. New York Acad. Sci.**, **671**: 484-486.

ODERMATT, A.; SUTER, H.; KRAPF, R.; SOLIOZ, M. 1993. Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, **268**: 12775-12779.

OLAFSON, R.W. 1986. Physiological and chemical characterization of

cyanobacterial metallothionein. **Environm. Health Perspect.**, **65**: 71-75.

OLSEN, G.J.; OVERBEEK, R.; LARSEN, N.; MARSH, T.L.; MCCAUGHEY, M.J.; MACIUKENAS, M.A.; KUAN, W.-M.; MACKE, T.J.; XING, Y; WOESE, C.R. 1992. The Ribosomal Database Project. **Nucl. Ac. Res.** **11**, 20 Suppl: 2199-2200.

PENG, J. B.; YAN, W.- M.; BAO, X. -Z. 1994 a. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **176**: 2892- 2897.

PENG, J. B.; YAN, W.- M.; BAO, X. -Z. 1994 b. Expression of heterogenous arsenic resistance genes in the obligately autotrophic biomining bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Appl. Environm. Microbiol.**, **60**: 2653- 2656.

PIVOVAROVA, T. A.; GOLOVACHEVA, R. S. 1985. Microorganisms important for hydrometallurgy: cytology, physiology and biochemistry. pp. 27-55. *In*: G. I. Karavaiko & S. N. Groudev (ed.). Biogeotechnology of metals. Proceedings of International Seminar and Training Course (Moscow and Sofia, 1982). United Nations Environment Programme (UNEP), Centre of International Projects-GKNT, Moscow.

PIZARRO, J.; JEDLICKI, E.; ORELLANA, O.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. **Appl. Environm. Microbiol.**, **62**: 1323-1328.

PRAMILA, T.; RAO, G.R.; NATARAJAN, K.A.; RAO, C.D. 1996. Differential influence of ions on the copy number of plasmids in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Curr. Microbiol.**, **32**: 57-63.

- RAMESAR, R. S.; WOODS, D. R.; RAWLINGS, D. E. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *recA*-like gene from the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Gen. Microbiol.**, **134**: 1141-1146.
- RAWLINGS, D. E.; JONES, W. A.; O'NEILL, E. G. ; WOODS, D. R. 1987. Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene and its controlling region the acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. **Gene**, **53**: 211-217.
- RAWLINGS, D. E.; KUSANO, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Microbiol. Rev.**, **58**: 39-55.
- RAWLINGS, D. E.; WOODS, D. R. 1985. Mobilization of *Thiobacillus ferrooxidans* plasmids among *Escherichia coli* strains. **Appl. Environm. Microbiol.**, **49**: 1323- 1325
- ROGERS, S. D.; BHAVE, M.; MERCER, J. F. B.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T. O. 1991. Cloning and characterization of *cutE*, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **173**: 6742-6748.
- ROSSOW, F.T.; ROWBURY, R.J. 1984. Effect of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. **J. Appl. Bacteriol.**, **56**: 63-79.
- ROUCH, D.A.; BROWN, N.L. 1997. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. **Microbiology**, **143**: 1191-1202.
- ROUCH, D.; CAMAKARIS, J.; LEE, B.T.O.; LUKE, R.K.J. 1985. Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.**,

131: 939-943.

SAKAMOTO, K; YAGASAKI, M.; KIRIMURA, K.; USAMI, S. 1989. Resistance acquisition of *Thiobacillus thiooxidans* upon cadmium and zinc ion addition and formation of cadmium ion-binding and zinc ion-binding proteins exhibiting metallothionein-like properties. **J. Ferm. Bioeng.**, **67**: 266-273.

SEEGER, M.; JEREZ, C.A. 1992. Phosphate limitation affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Geomicrobiol. J.**, **10**: 227-237.

SEEGER, M.; JEREZ, C.A. 1993. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. **FEMS Microbiol. Rev.**, **11**: 37-42.

SEEGER, M.; OSORIO, G; JEREZ, C.A. 1996. Phosphorylation of GroEL, DnaK and others proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. **FEMS Microbiol. Lett.**, **138**: 129-134.

SHIRATORI, T.; INOUE, C.; NUMATA, M.; KUSANO, T. 1991. Characterization and cloning of plasmids from the iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Curr. Microbiol.**, **23**: 321-326.

SHIRATORI, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K.; KUSANO, T.; KITAGAWA, Y. 1989. Cloning and expression of *Thiobacillus ferrooxidans* mercury ion resistance genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **171**: 3458-3464.

SILVER, S. 1992. Plasmid - determined metal resistance mechanisms: range and overview. **Plasmid**, **27**: 1-3.

SILVER, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. **Gene**, **179**: 9-19.

SILVER, S; LEE, B.T.O.; BROWN, N.L.; COOKSEY, D.A. 1993. Bacterial

plasmid resistances to copper, cadmium and zinc. pp. 38-53. *In*: A.J. Welch (ed.), Chemistry of Copper and Zinc Triads. The Royal Society of Chemistry, London.

SILVER, S.; MISRA, T. K. 1988. Plasmid - mediated heavy metal resistances.

Ann. Rev. Microbiol., **42**: 717-743.

SILVER, S.; PLUNG, L.T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. **Ann. Rev. of Microbiol.**, **50**: 753-789.

SOLIOZ, M.; ODERMATT, A. 1995. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, **270**: 9217-9221.

SOLIOZ, M.; ODERMATT, A.; KRAPF, R. 1994. Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. **FEBS Lett.**, **346**: 44-47.

STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C.; JONES, J.B. 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, **76**: 240-243.

TAKAMIYA, M.; SALAZAR, O.; VARGAS, D.; JEDLICKI, E.; ORELLANA, O. 1990. Identification and structural analysis of a ribosomal RNA gene promoter from *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEBS Lett.**, **272**: 50-54.

TEMPLE, K.L.; LeROUX, N.W. 1964. Syngensis of sulfide ores: sulfate-reducing bacteria and copper toxicity. **Econ. Ecol.**, **59**: 271-278.

TETAZ, T.J.; LUKE, R.K. 1983. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, **154**: 1263-1268.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in

relation to the microbiological leaching of sulphide ore. **Z. Allg.**

Mikrobiologie, **12**: 311-346.

TUOVINEN, O.H.; NIEMELA, S. I.; GYLLENBERG, H.G. 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. **Antonie van Leeuwenhoek**, **37**: 489- 496.

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUCHIYA, H. M. 1979. Nitrogen requirement of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Appl. Environm. Microbiol.**, **37**: 954-958.

VARGAS, E.; GUTIÉRREZ, S.; AMBRIZ, M.E.; CERVANTES, C. 1995. Chromosome- encoded inducible copper resistance in *Pseudomonas* strains. **Antonie van Leeuwenhoek**, **68**: 225-229.

WALTER, E. G.; TAYLOR, D. E. 1992. Plasmid- mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. **Plasmid**, **27**: 52-64.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Ac. Res.**, **18**: 7213-7218.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Ac. Res.**, **18**: 6531-6535.

WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, **51**:221-271.

WULF-DURAND, P; BRYANT, L. J.; SLY, L. I. 1997. PCR- mediated detection of acidophilic, bioleaching-associated bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, **63**: 2944-2948.

YANKOFSKY, S. A.; GUREVICH, R.; GRIMLAND, N.; STARK, A. A. 1983.

Genetic transformation of obligately chemolithotrophic *Thiobacilli*. **J. Bacteriol.**, **153**: 652-657.

YATES, J.R.; CUNNINGHAM, R.P.; HOLMES, D.S. 1988. IST2: an insertion sequence from *Thiobacillus ferrooxidans*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **85**: 7284-7287.

YATES, J.R.; HOLMES, D.S. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. **J. Bacteriol.**, **169**: 1861-1870.

YOON, J.-H.; LEE, S. T.; KIM, S.-B.; KIM, W. Y.; GOODFELLOW, M.; PARK, Y.-H. 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **47**:111-114.

YOSHIDA, N.; MORINAGA, T.; MUROOKA, Y. 1993. Isolation and Characterization of a heavy metal-binding protein from a heavy metal-resistant strain of *Thiobacillus* sp. **J. Ferm. Bioeng.**, **76**: 25-28.