Arch. Biol. Med. Exp. *23:* 285-297 (1990)
Printed in Chile

Aislamiento de promotores de transcripción de *Thiobacillus ferrooxidans* y de *T. acidophilus* y su introducción por conjugación a *T. intermedius**

(Characterization of transcription promoters from *Thiobacillus* genus and its use in genetic transfer studies)

CLAUDIA METZ, HUGO SANCHEZ y ALEJANDRO VENEGAS

Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas.
Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile

The chemolithotrophic acidophilic bacteria, *Thiobacillus ferrooxidans* is considered as the most important microorganism in relation to copper and uranium bioleaching ability. Since *T. ferrooxidans* is a strict chemolithotrophic microorganism, its genetic manipulation is a very hard task. Until now, all efforts have been unsuccessful. Therefore, we decided to approach the problem in steps, trying initially to manipulate some *T. ferrooxidans* related strains. We chose *Thiobacillus acidophilus* that shares its habitat with *T. ferrooxidans* and *Thiobacillus intermedius,* for its heterotrophic nature that makes them easier to grow and suitable for heterologous conjugation.

The main objective of this work was directed towards the isolation and characterization of transcription promoters from *T. acidophilus* and *T. ferrooxidans* genomic DNA. Four different promoters from *T. acidophilus* and four from *T. ferrooxidans* were isolated and sequenced.

In order to test their functional capacity in bacterial systems different from *E. coli,* they were subcloned and transferred to other bacteria. One of these recombinant plasmids was successfully transferred to *T. intermedius* and from it to *Ps. putida.* The subcloned promoter was able to confer streptomycin resistance to *Ps. putida.*

La biolixiviación consiste en la disolución de metales a partir de minerales, mediante la acción oxidativa de microorganismos, principalmente bacterias. La interacción de microorganismos del suelo en diferentes procesos data desde muy temprano en la historia, como se concluye de algunas descripciones encontradas en libros escritos en China aproximadamente en el año 150 a.C., donde, también, a fines del primer milenio, la explotación de sulfato de cobre producido por biodegradación natural era ya conocida (Yao Dun Pu, 1982). Avances similares ocurrieron con posterioridad en Europa, especialmente en España (Taylor y Whelan, 1942).

La mayoría de los microorganismos aislados de minerales donde se produce biolixiviación, que han sido caracterizados a la fecha, son mesófilos que crecen a temperaturas entre 20° y 35° (Hutchins *et al.,* 1986). Los microorganismos más importantes para el proceso de lixiviación se desarrollan en soluciones ácidas y obtienen energía oxidando sustratos inorgánicos. Estos incluyen *Thiobacillus ferrooxidans, Thiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Brierley, 1982).

También se encuentran en el medio de lixiviación bacterias heterótrofas, incluyendo otros miembros del género *Thiobacillus,* como *T. acidophilus, T. intermedius* y hongos, todos incapaces de oxidar hierro.

En general, los estudios genéticos sobre bacterias lixiviantes son escasos. Varios estudios sobre el aislamiento y caracterización de plásmidos en diversas cepas de *T. ferrooxidans* se enfocaron en este aspecto con el fin de identificar y aislar un potencial marcador genético en estos microorganismos. Se ha detectado la presencia de plásmidos de distintos tamaños en diver-

* Este proyecto fue financiado por: PNUD/ONUDI CHI 85/002 y PNUD/ONUDI CHI 88/003.

sas cepas de *T. ferrooxidans* que han sido estudiadas particularmente con el propósito de encontrar algún plásmido que se replicase también en *E. coli* para facilitar estos estudios (Mao *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1981; Holmes *et al.*, 1984; Sánchez *et al.*, 1986), pero no se encontró que su presencia se correlacionara con alguna característica fisiológica o metabólica identificable.

Algunos genes han sido aislados y caracterizados como el gen de la glutamina sintetasa (Barros *et al.*, 1985a; Rawlings *et al.*, 1987), genes *nif* de la nitrogenasa (Pretorius *et al.*, 1986; Rawlings, 1989) y un gen que codifica una proteína similar a RecA de *E. coli* y que es capaz de restituir la capacidad de recombinación homóloga en cepas de *E. coli recA*$^-$ (Ramesar *et al.*, 1988; Ramesar *et al.*, 1989). Además se ha descrito el aislamiento del gen de rusticianina, una proteína que contiene cobre y que se cree es el primer aceptor de electrones del ión ferroso (Kulpa *et al.*, 1986), pero la caracterización de este gen no ha sido publicada. Ultimamente se describió el aislamiento y expresión en *E. coli* de genes que otorgan resistencia a iones mercurio (Shiratory *et al.*, 1989) y la caracterización de secuencias de inserción presentes en *T. ferrooxidans* (Yates *et al.*, 1988).

Recientemente hemos caracterizado un operón ribosomal que contiene el gen para rRNA de 16S, un tRNA para isoleucina y otro para alanina, el gen para rRNA de 23S y el gen para rRNA de 5S, siguiendo la misma organización génica que presentan los operones ribosomales en *E. coli* (Flores *et al.*, 1991).

Hasta el momento se han descrito varios intentos para manipular *T. ferrooxidans,* todos ellos infructuosos (Barros *et al.*, 1985b; Pichuantes *et al.*, 1986; Ramesar, 1988). Por esto se ha propuesto desarrollar sistemas adecuados para la manipulación genética de otras bacterias del mismo género *Thiobacilli,* como *T. acidophilus* y *T. intermedius,* las cuales se encuentran en estrecha relación con *T. ferrooxidans* en los minerales lixiviados. Una etapa determinante para llevar a cabo este proceso es disponer de vectores de clonamiento y de expresión de ciertos genes de modo que sean funcionales en la bacteria a modificar. Además se requiere desarrollar un método para introducir información genética en estos microorganismos.

El objetivo fundamental de este trabajo está enfocado específicamente hacia el aislamiento y la caracterización de algunos promotores provenientes de bacterias acidófilas (*T. acidophilus* y de *T. ferrooxidans*), que sean funcionales en la bacteria lixiviante o en alguna otra cepa relacionada, así como también en *E. coli.* Luego subclonarlos en un vector de amplio rango de hospedero para ser utilizado en ensayos de conjugación en *T. intermedius.*

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Bacterias: *Escherichia coli:* –C600 (F$^-$, thi–1, thr–1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, lambda$^-$). –HB101 (F$^-$, hsdS20 (r_b^- m_b^-), recA13, ara–14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (str^R), xyl–5, mtl–1, lambda$^-$, supE44).

Pseudomonas putida KT2440 (amp^R, nal^R, cam^R, r$^-$, m$^+$, tet^S, kam^S) fue una donación del Dr. Rafael Vicuña.

Thiobacillus: –Thiobacillus ferrooxidans: A4, proporcionada por el Dr. M. Rodríguez e inicialmente aislada de la mina El Rincón, Andacollo. *–T. acidophilus* (kam^R, amp^R, tet^S, cam^S, Hg^S, Ag^S, Tel^S) fue donada por M.E. Torres de INTEC/CHILE. *–Thiobacillus intermedius* (amp^R, nal^R, str^R, Hg^R, tet^S, cam^S, tel^S) fue proporcionada por el Dr. A. P. Harrison, Universidad de Missouri, USA.

Plásmidos: –pKT240 (kam^R, amp^R, mob$^+$). –RP4 (kam^R, amp^R, tet^R, tra$^+$, mob$^+$) –pRK 2013 (kam^R, tra$^+$, mob$^+$) fueron proporcionados por el Dr. R. Vicuña, –pKK232–8 (amp^R) se otvuvo de Pharmacia, Uppsala, Suecia.

Mantención y crecimiento de las cepas

Las cepas de *E. coli* se mantenían en placas de agar al 1,2%, en medio Luria (Triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5%). Las cepas de *T. ferrooxidans* se mantenían en placa según el método descrito por Harrison (1984), y en medio líquido 9K modificado (Tuovinen y Kelly, 1973). *T. acidophilus* en el medio TSB, descrito por Johnson *et al.* (1987). *T. intermedius* en placa en medio I o medio III descritos por Kuenen y Tuovinen (1985) y crecido en medio líquido Luria. *T. acidophilus* fue crecido en medio líquido TAC (Kuenen y Tuovinen, 1985). Para crecer *T. ferrooxidans* se utilizó el medio 9K modificado (Tuovinen y Kelly, 1973).

Purificación de DNA cromosomal

Se purificó DNA cromosomal de *T. acidophilus* y *T. ferrooxidans* A4. Se crecieron tres litros de medio líquido con estas cepas en las condiciones ya descritas. Una vez colectadas las células por centrifugación, se lavaron con solución I (EDTA 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y glucosa 50 mM). Luego de centrifugar, el sedimento se resuspendió en 5 ml de la solución I. Se congeló a −30° y se descongeló para facilitar la ruptura celular, se agregaron 0,3 ml de lisozima 10 mg/ml y 0,2 ml de RNAsa A 10 mg/ml, incubándose 15 min en hielo. Se transfirió a un tubo de 50 ml con tapa rosca y se llevó a 10 ml con solución I, se adicionaron 625 μl de SDS al 10% y se incubó a 37° por 60 min, con inversión ocasional. A continuación se agregaron 0,5 ml de proteinasa K 10 mg/ml y 3 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) permaneciendo a 37°, con agitación suave toda la noche. Al día siguiente se hicieron tres extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). A continuación se precipitó agregando, sin mezclar las fases, 3 volúmenes de etanol absoluto y el DNA que precipita en la interfase alcohol-agua, se enrolló en una bagueta. El DNA se transfirió y se lavó en un tubo con etanol al 75%. Finalmente el DNA se resuspendió en 100 μl de TE, obteniéndose aproximadamente 150 μg de DNA purificado de alto PM.

Determinación de sensibilidad a antibióticos

La sensibilidad a antibióticos fue determinada en tubos con 2 ml de medio líquido. Para ello se hicieron diluciones seriadas del antibiótico y se agregaron 5 μl de cultivo de la cepa a estudiar crecida hasta saturación, incubando a 37° con agitación por 14 a 18 hr. Se designó MIC (concentración inhibitoria mínima) a la menor concentración de antibiótico a la cual no se registró crecimiento bacteriano.

Secuenciación del DNA

Se utilizó una modificación del método de los didesoxinucleótidos desarrollado por Sanger *et al.* (1977), basada en la adecuación de Messing (1983) al uso de vectores derivados de M13 para secuenciación de DNA. Las reacciones de secuenciación se realizaron siguiendo el protocolo comercial Sequenase de USB (United States Biochemical Corporation, USA).

Ensayos de conjugación

El procedimiento usado para la conjugación con las especies *Thiobacilli* fue similar a las conjugaciones descritas clásicamente. Las células dadoras y receptoras se crecieron en medio líquido hasta $D.O._{650}$ de 0,8. Se mezclaron en relación 1:1 en un tubo Eppendorf (0,7 ml c/u) y se centrifugaron en microcentrífuga Eppendorf por 30 seg. Luego se resuspendieron en 100 μl de solución salina estéril (NaCl 0,9%). El volumen total de células se sembró sobre medio sólido adecuado según se indica más abajo y se incubó a 30° por 20 hr. Las células se recuperaron de la placa por resuspensión en 4 ml de solución salina estéril. Se inocularon 100 μl de distintas diluciones sobre medio de selección con el antibiótico apropiado. Las placas fueron incubadas por varios días a 30°.

En aquellos casos en que el plásmido a ser introducido por conjugación no era autotransferible, se incluyó *E. coli*/RP4 para permitir la transferencia.

Las conjugaciones tanto entre *E. coli* y *T. intermedius* como entre *Ps. putida* y *T. intermedius* se realizaron en placas agar-Luria. Las conjugaciones entre *T. intermedius* y *T. acidophilus* se realizaron en placas con medio mixto. Estas se prepararon así: sobre una placa Petri inclinada aproximadamente en un ángulo de 15°, se vertieron 15 ml de medio TAC; luego de gelificar se agregó igual volumen de medio I, dejándose gelificar sin inclinación. También se realizaron estos ensayos de conjugación en placas con medio I (pH 4,5). Los ensayos se realizaron mezclando células dadoras, "helper" (*T. intermedius*/RP4) y receptoras en relación 1:1:1, incubándose la mezcla 20 hr a 30°. Las células se resuspendieron en medio TAC. Se inocularon 100 μl de distintas diluciones sobre medio de selección con el antibiótico apropiado. Las placas fueron incubadas por varios días a 30°.

Retroconjugación de transconjugantes

En una placa Luria se sembró un césped de 200 μl de células receptoras crecidas en fase log y se incubó 2 horas a 30° ó 37° dependiendo de la bacteria. Luego, sobre este manto, se depositó en forma estéril cada colonia transconjugante a analizar y se dejó la placa creciendo 12-14 horas a 30° o 37°. Luego se transfirió cada colonia a una placa de selección que sólo favorece el crecimiento de la receptora conjugada con el plásmido en estudio y se dejó crecer 12-16 horas a 30°.

Hibridación del DNA plasmidial

La transferencia se realizó de acuerdo a Southern (1975) y para la hibridación se siguió el protocolo de Wahl *et al.*, (1979).

RESULTADOS Y DISCUSION

Un vector útil para manipulación genética de bacterias debe poseer: marcadores genéticos (para seleccionar la bacteria modificada), replicones (orígenes de replicación y la maquinaria necesaria para su funcionamiento) que sean funcionales en la bacteria a manipular, promotores de

transcripción y otras señales necesarias para lograr la expresión del gen foráneo que interesa. Además se requiere cierto conocimiento básico mínimo de la genética de las bacterias lixiviantes, particularmente conocer cómo funcionan y están estructurados los genes en dichas bacterias incluyendo las señales de regulación, especialmente los promotores de transcripción y señales de Shine-Dalgarno a nivel de traducción. Finalmente, es necesario contar con un método para introducir DNA al microorganismo a modificar.

Búsqueda de un promotor de transcripción

Basado en los requerimientos antes mencionados se planteó como paso inicial la búsqueda de promotores de transcripción de dos especies de *Thiobacillus*, aspecto que se llevó a cabo en el supuesto de su similitud funcional con aquellos promotores conocidos de *E. coli.* Con este fin se digirió DNA cromosomal de *T. acidophilus* y de *T. ferrooxidans* con MboI para obtener fragmentos con un tamaño promedio entre 0,5-1 kb y se ligaron al vector pKK232-8 (Brosius, 1984) previamente digerido con BamHI. Este vector es un plásmido derivado de pBR322 que, además del gen para resistencia a ampicilina, posee el gen para la cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Este último carece de promotor de transcripción y en su lugar existe un sitio de clonamiento múltiple que permite insertar fragmentos de DNA, que en el caso de corresponder a un promotor de transcripción se puede seleccionar por la habilidad de dirigir la síntesis de la enzima CAT. Luego de transformar *E. coli* HB101, la selección de los recombinantes con promotores se hizo por expresión del gen para CAT, sembrando la mezcla de transformación en medio Luria con ampicilina (amp) 40 μg/ml y cloranfenicol (cam) 20 μg/ml. Inicialmente se aislaron promotores de *T. acidophilus,* microorganismo que aunque siendo también un tiobacilo acidófilo y que comparte el hábitat con *T. ferrooxidans,* es incapaz de lixiviar minerales sulfurados (Harrison, 1984). La ventaja que posee frente a *T. ferrooxidans* es que es un heterótrofo facultativo, lo cual simplifica su manipulación genética *in vitro*, ya que es más fácil de crecer en medio sólido y podría ser factible realizar ensayos de transferencia genética directa por conjugación con otros microorganismos como *Pseudomonas* o *T. intermedius.*

Los transformantes obtenidos con DNA de *T. acidophilus* fueron sembrados en placas con cam 20 μg/ml, obteniéndose 35 colonias recombinantes, las cuales fueron replicadas en placas con amp 40 μg/ml y concentración de cam variable. En la placa con mayor concentración de cam (200 μg/ml) se obtuvieron sólo 8 colonias (clones denominados pKTa1 al pKTa8. Se procedió a caracterizarlos, inicialmente por un análisis de tamaño de inserto y determinando la resistencia a cam en medio líquido mediante el ensayo de concentración mínima inhibitoria o MIC (Tabla I). Se determinó la secuencia nucleotídica de estos 8 promotores (Fig. 1) y se encontró que aquéllos que contenían el mismo tamaño de inserto correspondían a copias del mismo clon. Cuando se utilizó DNA de *T. ferrooxidans* se obtuvieron 15 colonias con cam 20 μg/ml (pKTf1 a pKTf15). Entre éstas, sólo 4 (pKTf9, 10, 11 y 12) crecieron en cam 100 μg/ml. Finalmente, sólo pKTf12 creció en cam 200 μg/ml. Algunos de estos clones fueron secuenciados (Fig. 1).

TABLA I

Determinación de tamaño de inserto y concentración mínima inhibitoria de cloranfenicol para clones recombinantes con promotores de *T. acidophilus* en el vector pKK232-8

Clon (HB101)	Tamaño (pb)	cam (μg/ml)
pKTa1	152	<600
pKTa2	950	>600
pKTa3	152	>600
pKTa4	152	>600
pKTa5	152	>600
pKTa6	64	400
pKTa7	340	500
pKTa8	152	>600
pKK232-8	--	< 10

La determinación de tamaño de inserto se obtuvo del análisis de migración electroforética en geles de poliacrilamida y la de resistencia a cam (MIC), en tubos con un ml de medio Luria 1x usando dilución seriada de cam, la que varió entre 600 y 10 μg/ml. La incubación se hizo con agitación fuerte a 37° por 16 horas.

```
pKTa2     .         .         .         .         .         .         .
AGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTCAGTTGCC
AAGCAATGTTTGGGTGGGCACTCTGAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGAGTCAA
GTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGAAGCCAGGTGGT
GACACCGAGCTGATC                                        *

pKTa4     .         .         .         .         .         .         .
GATCTTGCGGATGACCTGCCGCGGGACTCGGCCGCCCCATCTGTGGATGCTTACTGCCATAGACTCTACA
CCTCCAGAATCGATGAAAATGACGTGGCGCAGTCAAAAGTAATTTGAAAAATGGTCAGGATATTATATTC
TATCAGGAGATC
     *

pKTa6     .         .         .         .         .         .         .
GATCGTGAAAATAATTGATAATTATTTTTGAATTTATATGCTATAAGCATTCCACGGGCGGATC
                                                       *

pKTa7     .         .         .         .         .         .         .
GATTCGAATACGATATGAGTCGGCTTCGACGACAACGGCCGGATCGGAACATGTCGCCGCATCTTCTTGC
ACACGATTAAAAAATCACGATAGCTATTGAATGTATAGTTCACGAATTTTTTATACAATTTTAGCTCAAA
TGAGAAATCATGCCGATC                                                     *

pKTf1     .         .         .         .         .         .         .
TTGCTTTTTTCGCTCGAATTATGCTGCACTGAGTCCTGAAACAGGGTGCACGAGTGTGAGGTGCAGNATG
                                     *
GCGACCATCAACCCCAGGGAAGACCAGGATAAAAACGTGATTGGCTGGCAAGCATCATTCGCAAACGCGG
GTTTCCGTCCAGACGCGGACATTCCGCACAAAGAGAGATGCCGAGTCCTGGGCCAAGATC

pKTf3     .         .         .         .         .         .         .
GATCATGAACTGCTATAACAAGAATTATCCATTCTGCTTATGTTGCCCTTTTTGGCAGCATAACAGGCTG
GGATGATTGGGAACTGGTGATGCTGAATTAAAATCATCGGAAAAATTCACCAAGCTCGAAAAACATTTTG
ATAAATTGCTGGATAATGTAGACACGCTCATTATCCCGCATCACGGCTCAATGAGAAATTATAATCAGAA
AATTGCTGACTACGCTCTCCATCATATAATAACATCAGATC
                                         *

pKTf5     .         .         .         .         .         .         .
AATACCCACAGTTCTATCCGGCTGGAAAAACAAATTATTATGGAAATCTAGTATATGATGTCATATGTTA
GTGAACTGCATAGGAGAATGACCATGAGAATAAGCCTGCAGAGGGTCGTCTTTGGTGTAGCCGCCACACT
    *  *                MetArgIleSerLeuGlnArgValValPheGlyValAlaAlaThrLeu
GCTCTCGACNGTCACTGCTGCAGATGCCGTCACGGTCGTATACCACGGCAATGACGGGCTGGTGATC
 LeuSerThrValThrAlaAlaAspAlaValThrValValTyrHisGlyAsnAspGlyLeuValIle...

pKTf6     .         .         .         .         .         .         .
CGCACCTCCAGCAGGAAGGCCCGCGGCTTGCAATATCCTTCCGGAGCGGTTAGTGTGACCTGTAACTGCA
GGTAATACATCACATAAATTGCTGATATGTGAAGCTGCCCGGTGTTTTTATGATC          *
                                 *
```

Fig. 1: Secuencia nucleotídica de los promotores de *Thiobacillus acidophilus* V1 (pKTa2, 4, 6 y 7) y *Thiobacillus ferrooxidans* A4 (pKTf1, 3, 5 y 6). Las cajas Pribnow y −35 aparecen resaltadas en negrita. El probable inicio de transcripción está indicado (*). Además se muestra la traducción del posible transcrito del clon pKTf5, y la secuencia de "Shine-Dalgarno" subrayada.

Se ha visto que los promotores procarióticos presentan una secuencia consenso que está dada por dos segmentos de DNA, uno centrado a −10 pb (denominado "Pribnow box") y el otro ubicado a −35 pb respecto del punto de iniciación de la transcripción. La ubicación del "Pribnow box" normalmente es de 5 a 9 pb antes del

inicio de transcripción, aunque puede llegar a estar entre las bases −5 y −15. La distancia entre ambos elementos conservados del promotor (−10 y −35) puede variar entre 16 y 19 pb. Esto se cumple para el 90% de los promotores, existiendo algunas excepciones siendo el óptimo 17 pb (Lewin, 1987, Aoyama *et al.*, 1983).

Los resultados de secuenciación indicaron que para cada uno de estos promotores existen secuencias que corresponden muy bien con la de consenso. Estas y la secuencia consenso (Lewin, 1987) se muestran en la Tabla II.

Para el promotor pKTa2 existe la posibilidad de dos secuencias de −35, una de ellas, TTATGT, ubicada dos pb más alejada de la secuencia −10 y la otra sería ATGTCC. En el primer caso la separación entre ambas zonas sería de 18 pb, uno más que lo óptimo. El promotor pKTa6 posee una G en vez de la última T en la región del "Pribnow box", a pesar de ser ésta una de las bases más conservadas. El promotor pKTa7 presenta las dos cajas con una separación de 21 pb que es mayor que lo óptimo. En general, una separación de más de 19 pb entre ambos elementos del promotor conlleva a una funcionalidad deficiente (Stéfano y Gralla, 1982). Este principio contrasta con la alta expresión de CAT bajo el control de pKTa7. Una explicación posible para esto es que el promotor pKTa7 presenta, junto a la secuencia −35, otra caja de −10 (tipo "Pribnow box") (ver en Fig. 1: TTGAATg TATAGT, se escribe con minúscula el residuo de guanina que no estaría formando parte de ninguna caja o "box"), esto podría deberse a un tipo especial de promotor, regulado de alguna forma por estos dos "Pribnow box" seguidos. Otra explicación sería que pKTa7 estuviese formado sólo por la región −10 TATAGT y/o TACAAT, como se ha descrito para algunos promotores de bacteriófagos (Elliot y Geiduschek, 1984). Una última posibilidad sería que el "Pribnow box" fuera la

TABLA II

Comparación entre las secuencias promotoras aisladas de especies del género *Thiobacilli* con la secuencia promotora de consenso

	"−35"							"Pribnow box o −10"					
Consenso	T_{82}	T_{84}	G_{78}	A_{65}	C_{54}	A_{45}	16–19 pb	T_{80}	A_{95}	T_{45}	A_{60}	A_{50}	T_{96}
T. acidophilus													
pKTa2	A	T	G	T	C	C	– 16 pb –	T	A	C	A	A	T
pKTa4	T	T	G	A	A	A	– 14 pb –	T	A	T	A	T	T
pKTa6	T	T	G	A	T	A	– 14 pb –	T	A	T	A	T	G
pKTa7	T	T	G	A	A	T	– 21 pb –	T	A	C	A	A	T
T. ferrooxidans													
pKTf3a	T	T	G	G	G	A	– 16 pb –	T	A	A	A	A	T
pKTf3b	T	T	G	C	T	G	– 16 pb –	T	A	T	A	A	T
pKTf1	T	T	G	C	T	T	– 13 pb –	T	A	T	G	C	T
pKTf6a	T	T	G	C	A	A	– 17 pb –	T	A	G	T	G	T
pKTf6b	C	T	G	T	A	A	– 19 pb –	T	A	A	A	T	T
pKTf5a								T	A	T	T	A	T
pKTf5b								T	A	T	G	A	T
pKTf5c								T	A	T	G	T	T

Nota: Los subíndices en la secuencia de consenso indican la frecuencia (%) en que se encuentran dichas bases en los diferentes promotores descritos (Lewin, 1987).

secuencia inmediatamente previa a la de −35 (secuencia TAGCTA) y la secuencia −35 estaría separada por 18 pb y correspondería a la secuencia TTGCAC.

Los puntos de iniciación de la transcripción se encuentran entre 6 y 9 pb después de "Pribnow box", siendo preferentemente, en más del 90% de los casos, una purina (A o G). Se da con cierta frecuencia que dicho punto es la A central del triplete "CAT", aunque esta propiedad no es tan conservada (Lewin, 1987), por lo que no es requisito encontrar estas características en los promotores aislados. Usando un análisis computacional de una larga lista de promotores se llegó a establecer una regla para determinar el posible inicio de transcripción (O'Neill, 1989), éste ocurre en la 7ª base después de "Pribnow box" si ésta es una purina; si la 7ª base no es una purina y la 8ª sí lo es, entonces el inicio se producirá en esta última. En caso que la 8ª base tampoco sea una purina, el inicio puede producirse en una purina en la posición 6 ó 9. En caso extremo, en que estas posiciones tampoco estén ocupadas por una purina, el inicio de transcripción se produce en una C en la posición 8. Esta regla se cumple en el 90% de los promotores a los cuales se les conoce su inicio de transcripción (O'Neill, 1989). Basado en estos datos los puntos de iniciación (*) propuestos para el caso de los promotores aquí descritos, serían los siguientes:

```
pKTa2  tacaatGGCGGTGACAG
                    *
pKTa4  tatattCTATCAGGAGA
                   *
pKTa6  tatatgCTATAAGCATT
                   *
pKTa7  tacaatTTTAGCTCAAA
                     *
```

Para la unión del mRNA a ribosomas se ha visto que es importante una secuencia de bases que se conoce como Shine-Dalgarno; dicha secuencia se ubica en el mensajero previo al primer codón AUG y generalmente corresponde a la secuencia AGGAGG, la que es complementaria a las últimas bases del rRNA 16S (Shine y Dalgarno, 1974). Es común encontrar en los mensajeros 4-5 bases de ella. La secuencia del posible transcrito producido a partir del plásmido pKTa2, no presenta ningún codón de iniciación, aunque sí posee tres posibles secuencias de Shine-Dalgarno. Esto hace suponer que este promotor sería en realidad una secuencia fortuita o que el gen no codifica proteína alguna. La secuencia correspondiente al mRNA del plásmido pKTa2 es la siguiente:

```
GACAGUGGGAAGCCAGGUGGUGACACCGAGCUGAUC...
  ++−−++        +++−++
     −+++−+
```

Se indica con "+" las bases coincidentes con la secuencia Shine-Dalgarno y con "−" aquellas que difieren. La codificación podría empezar con el codón GUG como se ha descrito en algunos casos (Watson *et al.*, 1987), pero el sexto codón, a partir del GUG contenido en la tercera secuencia de Shine-Dalgarno, corresponde al triplete de terminación UGA. La única explicación sería que éste fuese un péptido líder como se ha encontrado en algunos operones como es el caso del operón trp y que forma parte del sistema regulador denominado atenuador. No obstante, esto es poco probable por su escasa longitud y falta de tripletes repetidos, lo que es una característica típica de los péptidos líder (Watson *et al.*, 1987).

Para el plásmido pKa7 es posible asignar al transcrito la siguiente secuencia:

```
AAAUGAGAAAUCAUGCCGAUC...
  +−+++−      MetProIle...
```

En este caso la secuencia del plásmido presenta una secuencia similar a la de Shine-Dalgarno ubicada cuatro bases antes de un codón de iniciación AUG. Esto sugiere que dicho promotor pertenecería a un gen de una proteína de *T. acidophilus*. Para identificar esta proteína se requieren más datos de secuencia del transcrito, pero lamentablemente el inserto de dicho plásmido no continúa más allá del tercer aminoácido.

Sin embargo, existe la posibilidad que como los promotores están siendo aislados en base a la funcionalidad de éstos en *E. coli*, este método puede llevar errónea-

mente a aislar secuencias fortuitas, en las que se presente azarosamente la coexistencia de las cajas −35 y −10; pero sin significado funcional real en *T. acidophilus.* Para aclarar esto debería buscarse la expresión de dichos promotores en *T. acidophilus* detectando la expresión de los posibles transcritos *in vivo*. No obstante, hay otros datos en la literatura que sugieren desde un punto de vista funcional que los promotores del género *Thiobacilli* no deben ser muy diferentes a los de *E. coli.* Por ejemplo, se ha expresado en *E. coli* el gen de la glutamina sintetasa (Rawlings *et al.*, 1987) y el del gen de una proteína similar a RecA (Ramesar *et al.*, 1988), ambos de *T. ferrooxidans,* aunque del análisis de la secuencia de los genes aislados de este microorganismo no ha permitido identificar claramente las estructuras promotoras, ya que no se encuentran los elementos típicos (cajas −10 y −35) (Ramesar, 1988). Puede ser que el promotor del gen de glutamina sintetasa (Rawlings *et al.*, 1987) de *T. ferrooxidans* no sea el más representativo y se trate más bien de una excepción, como ocurre con varios genes del operón *nif de Klebsiella pneumoniae* (Buck *et al.*, 1985) y genes relacionados con la esporulación de *B. subtilis* (Kunkel *et al.*, 1988).

En cuanto al presente trabajo se encontró entre los promotores de *T. ferrooxidans* clonados, que el plásmido pKTf1 presentaba una secuencia en posición 1 para la caja de −35 y 20 para la −10. En cambio el plásmido pKTf3 presentaba dos posibles secuencias (a y b) con las cajas de −35 y −10, en las posiciones 77 y 213, 99 y 235 (ver Fig. 1 y Tabla II), respectivamente. En el caso del plásmido pKTf6 también se encontraron dos posibles secuencias, ubicadas en posiciones 28 y 60 (caja −35); 51 y 85 (caja −10).

El plásmido pKTf5, presenta tres posibles cajas "Pribnow", pero no presenta secuencias homologables con la caja de −35. Esta secuencia que funciona como promotor de la transcripción en *E. coli,* puede ser sólo una secuencia fortuita como se ha discutido antes para el plásmido pKTa2, o puede tratarse de un promotor que definitivamente carece de región −35. Este plásmido presenta la secuencia CAT en posición 79 (ver Fig. 1), es decir, 10 pb más allá del último "Pribnow Box" de la serie de tres. Esto podría estar indicando que éste es un sitio de iniciación de transcripción. Esta suposición está apoyada por el hecho de que inmediatamente a continuación se encuentra una secuencia del tipo "Shine-Dalgarno" (subrayada), la cual está alejada sólo 5 pb de un codón de iniciación de traducción, el cual inicia un marco de lectura abierto hasta donde se extiende el inserto (38 aminoácidos). Falta demostrar que este fragmento corresponde realmente a una porción de un gen de una proteína de *T. ferrooxidans.* Para ello será necesario marcar radiactivamente el plásmido pKTf5 para utilizarlo como sonda e hibridarlo con RNA aislado desde este microorganismo.

A pesar de que la preparación de DNA cromosomal contenía una proporción importante del plásmido pTfA4 (Sánchez *et al.*, 1986), ninguna de las secuencias promotoras corresponde, por homología, con alguna de las regiones secuenciadas de dicho plásmido (Hevia *et al.*, 1988), por lo que se supone que los promotores aislados derivan de las regiones aún no clonadas de pTfA4 o provienen de DNA cromosomal de *T. ferrooxidans* A4.

Inserción de promotores en pKT240

Hasta el momento no ha sido posible conjugar directamente *T. acidophilus* con *E. coli*, aun utilizando plásmidos de amplio rango de hospedero (Hevia *et al.*, 1988). Existe la posibilidad de que los promotores de transcripción de los marcadores genéticos de los plásmidos utilizados en los ensayos antes descritos (Hevia *et al.*, 1988), no sean reconocidos por la maquinaria transcripcional de *T. acidophilus.* Basados en estos resultados decidimos incorporar los fragmentos de DNA de *T. acidophilus* clonados (pKTa2, 4, 6 y 7) que incluyen promotores de transcripción en un plásmido de amplio rango de hospedero, delante de un marcador genético que puede ser utilizado para seleccionar *T. acidophilus* transconjugantes. Es así que escogimos el vector pKT240 que posee como marcadores genéticos los genes

de resistencia a ampicilina y kanamicina. Además de estos marcadores genéticos posee el gen para resistencia a estreptomicina, el cual carece de promotor de transcripción (ver Fig. 2). Sin embargo, delante de este gen truncado, en el lugar apropiado existe un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción EcoRI. Esto permite clonar fragmentos de restricción en dicha posición. Si éstos contienen un promotor, serán capaces de conferir resistencia a estreptomicina a la bacteria receptora. Para esto se procedió según se esquematiza (Fig. 2), a obtener fragmentos EcoRI de los plásmidos con los promotores clonados (pKTa2, 4, 6 y 7) y reinsertarlos en el sitio EcoRI de pKT240. Con estas construcciones se transformó *E. coli* C600 y se seleccionaron clones capaces de crecer en placas con 10 μg/ml str. *E coli* C600 sin transformar no es capaz de crecer en el medio de cultivo con 10 μg/ml de str.

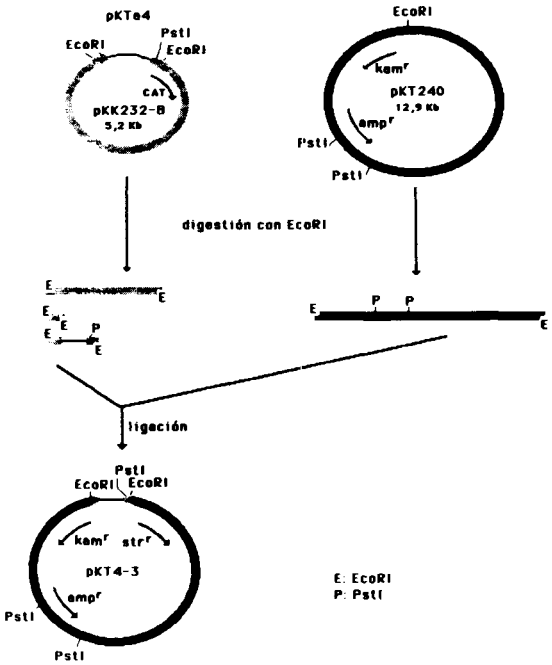

Fig. 2: Construcción de vectores de amplio rango de hospedero conteniendo los promotores de transcripción de *Thiobacillus acidophilus*, ejemplificado por pKT4-3. CAT, cloranfenicol acetil transferasa; amp^R, gen de resistencia a ampicilina; kam^R, gen de resistencia a kanamicina; str^R, gen de resistencia a estreptomicina. En este esquema se representa por una barra negra ancha a los segmentos correspondientes a pKT240, barra ancha gris pKK232-8 y delgada negra el inserto de pKTa4.

Para cada uno de los plásmidos se analizaron 5 subclones, seleccionándose el más resistente a str en cada caso. Los clones: pKT2-5, pKT4-3, pKT6-2 y pKT7-5, provienen de los plásmidos pKTa2, 4, 6 y 7, respectivamente. El MIC de cada uno se muestra en la Tabla III. La presencia de los insertos en estos plásmidos se visualizó digiriéndolos con PstI (los insertos EcoRI obtenidos son muy pequeños). Al digerir pKT240 con PstI se obtienen dos fragmentos de 0,8 y 12,1 kb, este último contiene el sitio de clonamiento EcoRI. De este modo, al clonar en este sitio un fragmento de DNA proveniente del pKK232-8, el cual posee otro sitio PstI (ver Fig. 2), el patrón electroforético de la banda de 12,1 kb se verá modificado, obteniéndose a partir de ella dos bandas, una de 8 kb y otra que corresponde al tamaño del inserto más el remanente del vector (4,1 kb). Un gel de agarosa con los productos de digestión con PstI de los diversos plásmidos construidos, se muestra en la Fig. 3.

TABLA III

Concentración mínima inhibitoria de estreptomicina para clones recombinantes con promotores de *T. acidophilus* insertados previo al gen de resistencia a estreptomicina en el vector pKT240

Clon	Estreptomicina (μg/ml)
pKT2-5	200
pKT4-3	>600
pKT6-2	200
pKT7-5	400
pKT240	< 25

La determinación de MIC fue hecha en tubos con un ml de medio Luria, variando las concentraciones de str por dilución consecutiva entre 25 y 600 μg/ml. La incubación se hizo con agitación fuerte a 37° por 16 horas.

Con estos plásmidos recombinantes, de amplio rango de hospedero, se procedió a realizar experimentos de transferencia de material genético a *T. acidophilus*, ya sea por transformación o conjugación. Lamentablemente los intentos de transferir estos plásmidos desde *E. coli* a *T. acidophilus* directamente fueron infructuosos. Existe una gran diferencia entre ambas especies bacterianas en lo referente a los requerimientos tanto nutricionales como de

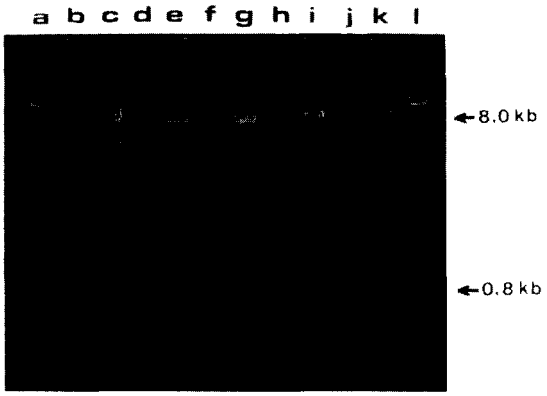

Fig. 3: Visualización de los insertos que contienen promotores de *T. acidophilus* que fueron clonados en el sitio EcoRI de pKT240. El análisis se hizo en un gel de agarosa al 1,5% en amortiguador TAE 1x con los clones pKT digeridos con la enzima PstI. Carriles: a y 1: estándar de peso molecular lambda HindIII-ϕX174 HaeIII. b, d, f y h: clones pKT2-5, pKT4-5, pKT6-2 y pKT7-5 sin digerir. c, e, g e i: clones pKT2-5, pKT4-3, pKT6-2 y pKT7-5 digeridos con PstI. j: pKT240 sin digerir y k: digerido con PstI.

condiciones de crecimiento. Por lo tanto, las posibilidades de conjugación directa entre estas especies son muy bajas. Es así como se decidió utilizar *T. intermedius* como microorganismo intermediario para los ensayos de conjugación entre *E. coli* y las otras especies de *Thiobacillus*. Anteriormente había sido posible transferir RP4 y algunos derivados, por medio de conjugación desde *E. coli* a *T. intermedius* (Hevia *et al.*, 1988).

Conjugación de E. coli a T. intermedius

Estos ensayos se realizaron usando *E. coli* C600 como la cepa dadora del plásmido recombinante pKT4-3. Como pKT240 no es autotransferible, se requirió de una conjugación triparental, utilizando pRK2013 en *E. coli* HB101 como plásmido "helper". Como pRK2013 (Tra^+) es un plásmido de estrecho rango de hospedero, sólo es capaz de replicarse en *E. coli* no en *T. intermedius*, que es la especie receptora. La conjugación se realizó en medio sólido LB por 8 horas a 30°; la relación celular entre dadoras, "helper" y receptoras fue de 1:1:1. La selección de los transconjugantes se realizó en placas LB con $HgCl_2$ 10^{-5} M y kanamicina (kam) 1,5 mg/ml, ya que *T. intermedius* es resistente a estos niveles de Hg^{2+} pero es sensible a esta alta concentración de kam. En estas condiciones son capaces de crecer sólo los transconjugantes *T. intermedius* que han recibido el plásmido pKT4-3. En esta etapa no se ensayó la expresión del gen de resistencia a str ya que *T. intermedius* es naturalmente resistente a este antibiótico.

La conjugación de *T. intermedius* se verificó realizando una preparación de DNA plasmidial del transconjugante aislado (Fig. 4A). Luego de una transferencia "Southern" se hibridó usando como sonda ^{32}P-pKT240, y sólo se observó hibridación positiva en el caso del transconjugante y con los controles de pKT4-3 y pKT240 aislados de *E. coli* (Fig. 4B).

Ensayo de retroconjugación

Como una manera de corroborar los resultados de la selección fenotípica de los *T. intermedius* transconjugantes se procedió a realizar una retroconjugación desde estos transconjugantes a *Ps. putida* KT2440. Se escogió esta cepa receptora por ser resistente a cam, lo que la hace seleccionable frente a *T. intermedius*, siendo, además, sensible a kam, marcador genético contenido en el plásmido usado en el experimento de conjugación.

La retroconjugación se realizó utilizando esta vez como cepa "helper" un *T. intermedius* que contiene el vector de amplio rango de hospedero RP4 (kam, amp y tet resistente). Las células de *T. intermedius* transconjugantes fueron capaces de transferir su plásmido a *Ps. putida* KT2440, lo que se detectó por el cambio fenotípico de las receptoras, las que adquirieron la capacidad de crecer en kam. El control *Ps putida* KT2440, inoculada junto con *T. intermedius* silvestre, fue incapaz de crecer en el medio de selección kam-cam (50 y 100 μg/ml, respectivamente). Para diferenciar una retroconjugante que hubiese sólo incorporado el plásmido RP4 de aquellos que contenían pKT4-3, se analizó el resultado de la retroconjugación sembrando en medio sólido con concentraciones crecientes de str. *Ps. putida* KT2440 es naturalmente resistente a str (< 200 μg/ml). Las colonias obtenidas en placas

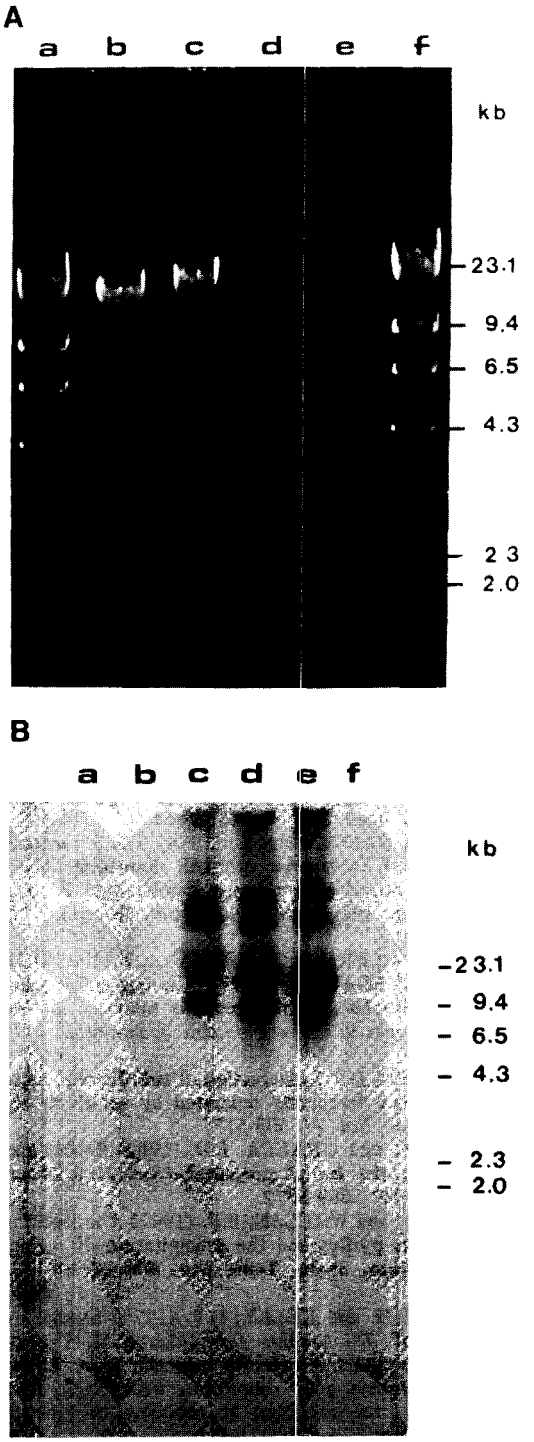

Fig. 4: Análisis de plásmidos incorporados por conjugación en *T. intermedius.* A) Gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x. B) "Southern Blot", se hibridó con pKT240 marcado con ^{32}P por "nick translation". a y f: estándar de peso molecular lambda HindIII. b: preparación de DNA plasmidial de *T. intermedius* "wild type". c: preparación de DNA plasmidial de *T. intermedius* transconjugante. d: pKT4-3 obtenido de *E. coli.* e: pKT240 obtenido de *E. coli.*

con str de 200 μg/ml se analizaron midiendo la resistencia a este antibiótico. *Ps. putida* KT2440 no conjugada, no es capaz de crecer en medio líquido Luria, que contiene 200 μg/ml de str. *Ps. putida* KT2440 con pKT4-3 crece en las mismas condiciones de cultivo hasta concentraciones mayores de 500 μg/ml de str. De este modo se demostró que el promotor de *T. acidophilus* es funcional no sólo en *E. coli* sino también en *Ps. putida.*

Conjugación de T. intermedius a T. acidophilus

Se realizaron conjugaciones usando como células dadoras *T. intermedius* que llevan pKT4-3, más un *T. intermedius* con RP4 como plásmido "helper". La selección se realizó en placa TAC con str 150 μg/ml, concentración a la cual *T. acidophilus* sin conjugar no es capaz de crecer. Lamentablemente, no se obtuvieron células transconjugantes.

Hasta el momento en la literatura no han aparecido resultados que comuniquen conjugación o transformación de *T. acidophilus.* Existe la posibilidad de que no sea posible conjugar *T. acidophilus* con las especies bacterianas utilizadas. Ultimamente se ha reportado la electroporación como un método eficiente de transferencia de material genético en diferentes especies. Esto indica que en el futuro cercano es necesario realizar este tipo de experimentos con *T. acidophilus* intentando introducir así los plásmidos recombinantes descritos en este trabajo. Experimentos preliminares en este sentido se están realizando.

REFERENCIAS

AOYAMA, T.; TAKANAMI, M.; OHTSUKA, E.; TANIYAMA, Y.; MARUMOTO, R.; SATO, H. and IKEHARA, M. (1983) Essential structure of *E. coli* promoter: Effect of spacer length between the consensus sequences on promoter function. *Nucl. Acids Res. 58:* 5855-5864.

BARROS, M.E.C.; RAWLINGS, D.E. and WOODS, D.R. (1985a) Cloning and expression of the *Thiobacillus ferrooxidans* glutamine synthetase gene in *Escherichia coli. J. Bacteriol. 164:* 1386-1389.

BARROS, M.E.C.; RAWLINGS, D.E. and WOODS, D.R. (1985b) Production and regeneration of *Thiobacillus ferrooxidans* spheroplasts. *Appl. Environ. Microbiol. 50:* 721-723.

BRIERLEY, C.L. (1982) Microbial mining. *Sc. Am. 274:* 42-51.

BROSIUS, J. (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene 27:* 151-160.

BUCK, M.; KHAN, H. and DIXON, R. (1985) Site-directed mutagenesis of the *Klebsiella pneumoniae nifL* and *nifH* promoters and *in vivo* analysis of promoter activity. *Nucl. Acids Res. 13:* 7621-7638.

ELLIOT, T. and GEIDUSCHEK, E.P. (1984) Defining a bacteriphage T4 late promoter: absence of a "−35" region. *Cell 36:* 211-219.

FLORES, H.; SANCHEZ, H.; ALVARADO-URBINA, G.; ROJAS, E. and VENEGAS, A. (1991) Structural and molecular characterization of a *Thiobacillus ferrooxidans* rrn operon. *DNA*. Enviado a publicación.

HARRISON Jr., A.P. (1984) The acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol. 38:* 265-292.

HEVIA, E.; DROGUETT, G.; SANCHEZ, H.; CACERES, B.; LAU, P. and VENEGAS, A. (1988) Preliminary studies for genetic transfer from *E. coli* and *Ps. putida* to *Thiobacillus* species. En: Hidrometallurgy and Electrometallurgy of Copper. Ed. Cooper, R.C.; Lagos, G.E. and Ugarte, G. Vol. 3, 91-105.

HOLMES, D.S.; LOBOS, J.H.; BOPP, L.H. and WELCH, G.C. (1984) Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli. J. Bacteriol. 157:* 324-326.

HUTCHINS, S.; DAVIDSON, M.; BRIERLEY, J. and BRIERLEY, C. (1986) Microorganism in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol. 40:* 311-336.

JOHNSON, D.B.; MACVICAR, J.H.M. and ROLFE, S. (1987) A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *J. Microbiol. Meth. 7:* 9-18.

KUENEN, J.G. and TUOVINEN, O.H. (1985) The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* en: "The Prokariotes. A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria". Vol. I, Eds. M. P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel, Springer-Verlag, pp. 1023-1036.

KULPA, C.F.; ROSKEY, M.T. and MJOLI, N. (1986) Construction of genomic libraries and induction of iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans Biothechnol. Appl. Biochem. 8:* 330-341.

KUNKEL, B.; SANDMAN, K.; PANZER, S.; YOUNGMAN, P. and LOSICK, R. (1988) The promoter for a sporulation gene in the *spoIVC* locus of *Bacillus subtilis* and its use in studies of temporal and spatial control of gene expression. *J. Bacteriol. 170:* 3513-3522.

LEWIN, B. (1987) Genes III. J. Wiley and Sons, Inc. USA.

MAO, M.W.H.; DUGAN, P.R.; MARTIN, P.A.W. and TUOVINEN, O.H. (1980) Plasmid DNA in chemoorganotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* and *T. acidophilus. FEMS Microbiol. Lett. 8:* 121-125.

MARTIN, P.A.W.; DUGAN, P.R. and TUOVINEN, O.H. (1981) Plasmid DNA in acidophilic, chemolithotrophic *Thiobacilli. Can. J. Microbiol. 27:* 850-853.

MESSING, J. (1983) New M13 vector for cloning. *Methods Enzymol. 101:* 20-78.

O'NEILL, M.C. (1989) *Escherichia coli* promotors: consensus as it relates to spacing class, specificity, repeat substructure, and three-dimensional organization. *J. Biol. Chem. 264:* 5522-5530.

PICHUANTES, S.; COFRE, G.; VENEGAS, A. and RODRIGUEZ, M. (1986) Studies on native strain of *Thiobacillus ferrooxidans.* I. Growth characteristics and antibiotic susceptibility. *Biotechnol. Appl. Biochem. 8:* 276-283.

PRETORIUS, I.M.; RAWLINGS, D.E. and WOODS, D.R. (1986) Identification and cloning of *Thiobacillus ferrooxidans* structural *nif* genes in *Escherichia coli. Gene 45:* 59-65.

RAMESAR, R.S.; WOODS, D.R. and 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.

RAMESAR, R.S. (1988) Developmental genetic studies on *Thiobacillus ferrooxidans.* Tesis para optar al grado de PhD. University of Cape Town. Cape Town.

RAMESAR, R.S.; ABRATT, V.; WOODS, D.R. and RAWLINGS, D.E. (1989) Nucleotide sequence and expression of a cloned *Thiobacillus ferrooxidans recA* gene in *Escherichia coli. Gene 78:* 1-8.

RAWLINGS, D.E.; JONES, W.A.; O'NEILL, E.G. and WOODS, D.R. (1987) Nucleotide sequence of glutamine synthetase gene and its controlling region from acidophilic autotroph *Thiobacillus ferrooxidans. Gene 53:* 211-217.

RAWLINGS, D.E. (1989) Sequence and structural analysis of the α– and β– dinitrogenase subunits of *Thiobacillus ferrooxidans. Gene 69:* 337-343.

SANCHEZ, H.; HEVIA, E.; CACERES, B. and VENEGAS, A. (1986). Studies on native strains of *Thiobacillus ferrooxidans.* IV. Isolation, physical map and partial cloning of a cryptic plasmid. *Biotechnol. Appl. Biochem. 8:* 300-308.

SANGER, F.; NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. 74:* 5463-5467.

SHINE, J. and DALGARNO, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense Triplets and Ribosome Binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:* 1342-1346.

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

SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol. Biol. 98:* 503-517.

STEFANO, J.E. and GRALLA, L.D. (1982) Spacer mutations in the *lac* p^S promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:* 1069-1072.

TAYLOR, J.H. and WHELAN, P.F. (1942) The leaching of coprous pyrites and the precipitation of copper at Río Tinto, Spain. *Trans. Inst. Min. Metall. 52:* 35-71.

TUOVINEN, O.H. and KELLY, D.P. (1973) Studies on growth of *Thiobacillus ferrooxidans.* I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers and comparison with $^{14}CO_2$-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol. 88:* 285-298.

WAHL, G.; STERN, M. and STARK, G.R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 76:* 3683-3687.

WATSON, J.D.; HOPKINS, N.H.; ROBERTS, J.W.; STEITZ, J.A. and WEINER, A.M. (1987) Molecular Biology of the Gene. 4ª edición, Capítulos Nº 13 y Nº 16. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

YAO DUN PU (1982) The history and present status of practice and research work on solution mining in China, en "Interfacing Technologies in Solution Mining". Prc. 2d SMESPE Int. Solut. Min. Symp. Ed. W.J. Schlitt, Denver, CO, Nov. 18-20, 1981, pp. 13-20.

YATES, J.R.; CUNNINGHAM, R.P. and HOLMES, D.S. (1988) IS*T2*: An insertion sequence from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:* 7284-7287.