



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1100418-5 A2



★ B R P I 1 1 0 0 4 1 8 A 2 ★

(22) Data de Depósito: 18/02/2011
(43) Data da Publicação: 21/05/2013
(RPI 2211)

(51) Int.Cl.:
C12N 1/20
C12N 15/74
C12S 99/00
C12R 1/01
C22B 3/18

(54) Título: PROCESSO DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIA ACIDÓFILAS E CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE TRANSFORMAÇÃO

(73) Titular(es): Unicamp - Universidade Estadual de Campinas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Vale S.A.

(72) Inventor(es): Ana Paula Guarnieri Christ, Fabiana Alexandrino, Laura M.M. Ottoboni, Oswaldo Garcia Jr.

(57) Resumo: Processo de modificação genética de bactérias acidófilas e construção de um vetor de transformação. A presente invenção descreve um processo de transformação de bactérias acidófilas quimiolitotróficas através da técnica de eletroporação. O processo proposto é capaz de transformar uma linhagem de bactéria com um vetor de transformação denominado vetor pAF que contém uma origem vegetativa de replicação capaz de conferir ao vetor a habilidade de se replicar no interior da bactéria, sem alterar suas funções fisiológicas naturais e, o uso das bactérias modificadas de acordo com a invenção em processos de biolixiviação de minérios sulfatados de cobre, ouro, urânio níquel, zinco, cobalto e outros.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **“Processo de modificação genética de bactérias acidófilas e construção de um vetor de transformação”**

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere a um processo de transformação genética de bactérias acidófilas quimiolitotróficas, sem alterar as propriedades fisiológicas naturais das bactérias, de modo que a nova cepa transformada possa ser capaz de sobreviver e se multiplicar em seu habitat natural.

10 A presente invenção também se refere a um processo para tratamento das células de bactérias acidófilas quimiolitotróficas capaz de permeabilizar transientemente a membrana celular da bactéria, de modo que a membrana se torne permissiva à entrada de material genético exógeno. Adicionalmente, a presente invenção tem por objeto o processo de inserção de material genético de interesse nas cepas de bactérias acidófilas quimiolitotróficas e, também a
15 construção de um vetor capaz de se auto-replicar quando inseridos em células de bactérias acidófilas quimiolitotróficas.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

20 As bactérias do gênero *Acidithiobacillus* são acidófilas, autótrofas e quimiolitotróficas, ou seja, essas bactérias vivem em pH ácidos de 0 a 4, sua fonte de carbono é o CO₂, e sua fonte de energia são os compostos inorgânicos. Sendo que duas espécies desse gênero são importantes e muito utilizadas na biomineração: *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*.

25 A espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* representa bactérias Gram-negativas, não patogênicas, com ótimo crescimento em torno de 30°C e pH em torno de 2,0 e tem sido utilizada como um microrganismo modelo em estudos de processos de biolixiviação (Holmes et al., 2008, BMC Genomics 9: 597).

 Como mencionado acima, *Acidithiobacillus ferrooxidans* é um dos microrganismos mais utilizados na lixiviação bacteriana de metais, processo este denominado biolixiviação. Durante o processo de biolixiviação, o metabolismo

microbiano causa a solubilização dos minerais que apresentam, em sua constituição, formas reduzidas de enxofre e ferro. Esta solubilização pode ocorrer de forma direta pelo ataque enzimático, ou indireto, através da produção de H_2SO_4 e Fe^{3+} pelo metabolismo da bactéria.

5 A biolixiviação é uma tecnologia já consolidada na indústria
mínoro-metalúrgica e é aplicada com sucesso no tratamento de minérios
refratários de ouro e na recuperação de cobre contido em minérios marginais e
rejeitos. A biolixiviação é definida como o método para solubilização dos metais a
partir de matrizes complexas em um meio ácido, empregando a ação direta ou
10 indireta dos microrganismos (Rawlings 2005, Microb. Cell. Fact. 4(1): 13). A
biolixiviação é direta quando os microrganismos atuam no metal ou em seu
contra-íon, liberando um íon do metal de interesse dentro da solução em ambos
os casos. Por outro lado, a biolixiviação é indireta quando o microrganismo gera
condições químicas que acelerem e favorecem a solubilização do metal.

15 A biolixiviação é responsável por aproximadamente 10% da produção
mundial de cobre e é particularmente importante na recuperação de metais a
partir de minérios de baixo teor, os quais não seriam economicamente viáveis de
se extrair por processos convencionais como a pirometalurgia. Desse modo, a
aplicação da biolixiviação para recuperação de metais a partir de minérios de
20 baixo teor demonstrou ser uma alternativa economicamente e ambientalmente
viável, pois o processo não requer alto consumo de energia e, comparado com o
processo pirometalúrgico pode ser considerado uma estratégia menos poluente
(Jonhson & Rawlings, 2007, Microbiology 153: 315-24).

 As espécies pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus* são utilizadas em
25 processos de biolixiviação, sendo que a espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*
favorece a oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} empregando oxigênio como um acceptor de
elétrons. O Fe^{3+} gerado é um agente com maior potencial de oxidação e pode
oxidar os sulfetos presentes ou qualquer composto que necessite ser oxidado.
Apesar da grande utilização de *Acidithiobacillus ferrooxidans* no processo de

biolixiviação, o crescimento lento do microrganismo associado à sua sensibilidade ao íon cloreto e a metais pesados como As^{3+} , Hg^{2+} e Ag^+ têm limitado uma aplicação mais abrangente desta tecnologia.

Em razão da importância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* no processo de biolixiviação, torna-se importante a capacidade de manipular geneticamente este microrganismo. O emprego de um método eficaz de transformação das células da bactéria pode aperfeiçoar a atividade de oxidação; aumentar a resistência aos compostos tóxicos; acelerar o crescimento e incorporar propriedades de interesse.

A transformação genética de *Acidithiobacillus* spp tem-se mostrado muito complexa. No entanto, devido à relevância de *Acidithiobacillus ferrooxidans* no processo de biolixiviação torna-se imprescindível a padronização de processos que permitam a transformação genética dessa espécie, melhorando suas condições de crescimento e oxidação, bem como a incorporação de propriedades interessantes, como a resistência a compostos tóxicos.

Informações básicas sobre a genética molecular de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram acumuladas durante os anos. Muitos autores descreveram tentativas de promover a transferência de material genético para *Acidithiobacillus* spp utilizando diversas abordagens, como por exemplo, a utilização de sistemas de conjugação entre cepas acidofílicas e *E. coli* e, principalmente, através da utilização da técnica de eletroporação.

O cultivo das bactérias do gênero *Acidithiobacillus* é complexo, já que estas bactérias devem ser mantidas em pH extremamente ácido. Esta característica dificulta o processo de transformação destes microrganismos.

Tem sido desafiador e nem sempre promissor a padronização de um processo de transformação genética reprodutível para *Acidithiobacillus ferrooxidans* e para os demais microrganismos acidófilos quimiolitotróficos utilizados nos processos de biolixiviação, como por exemplo, os microrganismos *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus prosperus*,

Leptospirillum ferrooxidans, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Acidianus brierleyi* e *Acidianus infernus*.

Roberto e Bruhn (Roberto e Bruhn; 1992, Geomicrobiology Journal 10(3-4), 249-55) descreveram que o uso da eletroporação é limitado para
5 transformar bactérias acidófilas e que a técnica de conjugação parece ser mais aplicável.

Kusano e colaboradores (Kusano et al., 1992, J. Bacteriol. 174: 6617-6623) descreveram a eletroporação de 30 cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com um vetor contendo um gene de resistência ao mercúrio (*operon mer*). Apenas uma das cepas foi transformada e a reprodutibilidade da técnica foi
10 muito baixa, tanto que nenhum outro grupo se mostrou capaz de reproduzir o processo descrito por esses autores.

Em 1995, English e colaboradores (English et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61: 3256-3260) descreveram um experimento de eletrotransformação
15 de *Thiobacillus neapolitanus* com um vetor contendo o replicon carboxissoma de *Thiobacillus intermedius*. Apesar dos resultados da eletroporação terem sido positivos, os autores não conseguiram demonstrar a expressão da proteína, o que seria um indicativo de não funcionalidade do vetor.

Foram identificados estudos que demonstram o interesse em
20 modificações e/ou identificação de fatores genéticos em microrganismos acidófilos e quimiolitotróficos com a intenção de melhorar a atividade destes microrganismos na biolixiviação (Bruscella et al; 2007, Microbiology 153 (1): 102-10; Farah et al; 2005, Appl. and Environ. Microbiol. 71(11): 7033-7040).

Estudos com base no sistema de conjugação geraram quatro publicações
25 que descreveram a transferência genética entre cepas de *Escherichia coli* e *Acidithiobacillus* spp (Yankofsky et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 652-657; Jin et al., 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58: 429-430; Liu et al., 2000, J. Bacteriol. 182: 2269-2276 e van Zyl et al., 2008, Appl Environ. Microbiol. 74: 5686-5694). Entretanto, apenas o estudo de van Zyl e colaboradores demonstrou ser uma

técnica eficientemente capaz de gerar um mutante nulo de uma cepa de *Acidithiobacillus caldus*, porém esse tipo de abordagem ainda não está descrita para linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Recentemente, o pedido de patente americano US 2009/0035864
5 descreve um processo para transformar *Acidithiobacillus* spp baseado na modificação das condições de crescimento das bactérias. O grupo relata que culturas de *Acidithiobacillus* spp adaptadas a uma faixa de pH entre 5 e 7 são passivas de serem transformadas por qualquer processo já conhecido, especialmente por eletroporação. No entanto, considerando que o pH ótimo de
10 crescimento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* varia entre 1,5 e 2,5, a adaptação desse organismo a um pH muito maior (pH entre 5 e 7) representa uma alteração severa da fisiologia das bactérias. Uma cepa transformada sob condições fisiológicas alteradas tem seu metabolismo adaptado a condições específicas, e assim sendo, esse novo microrganismo pode perder a capacidade de crescer em
15 suas condições naturais. Segundo Suzuki (Suzuki, 2001, Biotechnology Advances 19: 119-132) os microrganismos atuantes em processos de biolixiviação/biooxidação de minerais, para apresentarem boa atuação, precisam ter características específicas, como por exemplo, a possibilidade de atuar numa faixa expandida de temperatura (de 30° a 70°C), faixa de pH ácido (1,8 a 2,2) e
20 alta relação dos íons Fe^{3+} / Fe^{2+} . Assim, as bactérias nativas apresentam vantagem sobre cepas de coleção, pois já estão adaptadas às condições climáticas, à mineralogia e à composição química de minérios a serem tratados.

Em resumo, até o momento não existe um processo conhecido e reprodutível capaz de transformar células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sem
25 alterar as suas propriedades fisiológicas. O mesmo se aplica aos demais microrganismos acidófilos quimiolitotróficos empregados nos processos de biolixiviação, não sendo limitado, portanto, a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Adicionalmente, há poucos trabalhos publicados nesta área e a maioria

com resultados inconclusivos ou impossíveis de serem reproduzidos, uma vez que esses microrganismos são de difícil manipulação genética. Além do crescimento lento e do baixo número de células, o cultivo desses microrganismos em meio sólido é difícil, inviabilizando a realização de vários experimentos.

5 Assim, sendo *Acidithiobacillus ferrooxidans* o microrganismo mais comumente utilizado em processos de biolixiviação, o desenvolvimento de um processo de transformação genética de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sem alterar sua fisiologia natural, é extremamente importante para o campo da biolixiviação. Buscando obter células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* transformadas para
10 melhorar a biolixiviação, foi desenvolvido um processo de transformação de linhagem permissiva de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, sem alterar a fisiologia natural da espécie utilizando um vetor funcional capaz de se replicar no interior da célula.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

15 A presente invenção trata de um processo de transformação de bactérias acidófilas quimiolitotróficas, sem alterar as propriedades fisiológicas naturais das bactérias, de modo que a nova cepa transformada possa ser capaz de sobreviver e se multiplicar em seu habitat natural.

De acordo com a presente invenção o processo de transformação
20 consiste das etapas de: (a) obtenção das células competentes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* através da alteração da permeabilidade da membrana celular; (b) construção de um vetor capaz de se auto-replicar quando inserido em *Acidithiobacillus ferrooxidans*; (c) transformação das células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente induzidas ao estado transiente de competência, através
25 da utilização da técnica de eletroporação.

Um segundo aspecto da presente invenção trata da construção de um vetor auto-replicador, ou seja, vetor que contém sequências de DNA que o torna funcional.

Adicionalmente, a presente invenção também compreende um processo

para o tratamento das células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, capaz de permeabilizar transientemente a membrana celular da referida bactéria de modo que ela se torne permissiva à entrada de material genético exógeno como, por exemplo, vetores.

- 5 Outro aspecto da presente invenção consiste da importância da origem de replicação, a ser inserida no vetor. Esta origem tem que permitir a replicação do plasmídeo no interior das células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

- 10 A figura 1 mostra o diagrama do vetor pAF destacando características essenciais as quais o torna funcional em *Acidithiobacillus* spp. A OriE - permite a replicação do plasmídeo em *Escherichia. coli*, necessário para subclonagens; Tc – gene de resistência à tetraciclina; Kan – gene de resistência à canamicina; OriV - permite a replicação do plasmídeo em *Acidithiobacillus* spp.

- 15 A figura 2 mostra um gel de agarose 1% com a recuperação do vetor pAF de rLRpAF: (1) marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®), (2) DNA plasmideal isolado de rLRpAF, (3) DNA de uma cultura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR não recombinante e (4) 1 µg de DNA de pAF (controle positivo).

- 20 A figura 3 mostra a amplificação da OriV a partir de rLRpAF: (1) marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®), (2) PCR a partir de uma cultura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR, (3) PCR a partir de uma cultura de rLRpAF, (4) PCR a partir de DNA de pAF, (5) PCR sem amostra (controle negativo) e (6) marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®).

 A figura 4 mostra um gráfico da curva de oxidação do Fe²⁺ de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR não transformada e transformada (rLRpAF).

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

 A presente invenção trata de um processo de transformação de bactérias acidófilas quimiolitotróficas, mais especificamente da linhagem LR de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Sendo que para o processo de transformação é utilizado um vetor caracterizado por conter uma origem de replicação vegetativa, a

qual confere ao vetor, a capacidade de se replicar no interior da célula transformada.

É importante ressaltar que a presente invenção não é limitada a linhagem LR de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e nem as bactérias do gênero *Acidithiobacillus*. A presente invenção também pode ser empregada para transformação de outros microrganismos acidófilos quimiolitotróficos termotolerantes ou não, como por exemplo, e não se restringindo, a *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus prosperus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Acidianus brierleyi* e *Acidianus infernus*.

A transformação de bactérias é um processo através do qual o DNA plasmideal (vetor) é introduzido na célula bacteriana, temporariamente permeável, com a função de introduzir material genético de interesse.

De acordo com a presente invenção o processo de transformação das bactérias ocorre de forma a não alterar suas propriedades fisiológicas naturais, de modo que a nova cepa transformada possa ser capaz de sobreviver e se multiplicar em seu habitat natural.

De acordo com a presente invenção o processo de transformação consiste nas etapas: (a) obtenção das células competentes de bactérias acidófilas quimiolitotróficas através da alteração da permeabilidade da membrana celular; (b) construção de um vetor capaz de se auto-replicar quando inserido em células de bactérias acidófilas quimiolitotróficas; (c) transformação das células de bactérias acidófilas quimiolitotróficas previamente induzidas ao estado transiente de competência, através da técnica de eletroporação.

De acordo com a presente invenção o termo "células competentes" compreende células permissivas a entrada de material exógeno.

De acordo com a presente invenção, um dos requisitos para o sucesso do processo de transformação de linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bem como dos demais microrganismos acidófilos quimiolitotróficos, é o

desenvolvimento de vetores capazes de se auto-replicar no interior das células bacterianas.

Com a finalidade de se obter um vetor funcional, algumas características foram exploradas. Alguns plasmídeos conhecidos como plasmídeos de largo
5 espectro de hospedeiros (broad-host-range) têm a capacidade de se replicar em diversas espécies de bactérias, sendo considerados plasmídeos promíscuos. Os plasmídeos de largo espectro de hospedeiros, especialmente os pertencentes ao grupo de incompatibilidade das bactérias Gram-negativas (plasmídeos IncQ e IncP), foram os mais estudados e apresentaram características adequadas para o
10 desenvolvimento de um sistema hospedeiro-vetor para as linhagens de bactérias que não apresentam plasmídeos naturais ou que ainda não possuam plasmídeos descritos.

De acordo com a presente invenção, uma característica comum e importante nos vetores é a presença de uma sequência de DNA denominada de
15 origem de replicação vegetativa (OriV), sequência esta responsável pela habilidade de replicação do material inserido em muitos tipos de bactérias Gram-negativas.

Rawlings e colaboradores (Rawlings et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 2735-2739), isolaram uma região de replicação de um plasmídeo de largo
20 espectro de hospedeiros de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (pTF-FC2). Esta região possui grande similaridade com a OriV de um plasmídeo IncQ de *Escherichia coli*. A clonagem desta sequência de DNA de *Acidithiobacillus ferrooxidans* permite que o vetor replique na linhagem GW125a de *Escherichia coli* (linhagem deficiente na produção de DNA polimerase), sugerindo que um plasmídeo que
25 contenha uma sequência similar seria capaz de se replicar dentro de linhagens de bactérias Gram-negativas, inclusive *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Na presente invenção, nota-se que a OriV de 200 pb amplificada a partir de um transposon comercial (EZ-Tn5™), apresentou 44,05% de similaridade com a sequência encontrada no plasmídeo PTF-FC2 descrito por Rawlings e

colaboradores (Rawlings et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 2735-2739), e 100% de similaridade com IncP e com os plasmídeos promíscuos R18, R68, RK2, RP1 e RP4 de *E. coli* (Peng et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 2892-2897). Sendo assim, tem-se que a inserção desta OriV, retirada do transposon EZ-Tn5TM, permite a
5 construção de um vetor com grande probabilidade de replicação em *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Assim, esta abordagem, assumida na presente invenção, demonstrou ser eficiente, uma vez que o vetor pAF foi capaz de replicar dentro das células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, como pode ser observado nas figuras 2 e 3. Sendo que a disponibilidade de uma origem de replicação
10 promíscua comercial facilita a construção de vetores para transformação genética de linhagens de *Acidithiobacillus* e demais microrganismos acidófilos quimiolitotróficos, no caso de ausência de plasmídeos naturais nas linhagens a serem transformadas.

A construção de um vetor funcional deve conter alguns elementos
15 básicos: (1) origem de replicação de *E. coli* (Ori E), permitindo que as subclonagens sejam feitas em linhagens de *E. coli*; (2) um promotor adequado, preferencialmente o lac P (promotor do gene que codifica para β -galactosidase); (3) genes de resistência a antibióticos, preferencialmente a ampicilina, canamicina ou tetraciclina, para promover a seleção das células transformadas; (4) um sítio
20 de clonagem múltipla (MCS) para inserir os genes ou fragmentos de interesse; e finalmente, (5) um gene repórter que codifica, por exemplo, uma enzima, como a β -galactosidase ou uma proteína verde-fluorescente como marcador secundário.

De acordo com a presente invenção, o vetor foi construído utilizando técnicas de biologia molecular (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A
25 Laboratory Manual) como descrito no Exemplo 1.

Uma vez construído o vetor, a próxima etapa, de acordo com a presente invenção, consiste na transformação da linhagem LR de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, empregada como exemplo.

A transformação genética de espécies do gênero *Acidithiobacillus* e

demais bactérias acidófilas quimiolitotróficas, empregadas em processos de biolixiviação, tem sido particularmente desafiadora. Uma questão importante que contribui para a sua dificuldade é o substrato onde essas bactérias são cultivadas. O fato de o substrato ser uma mistura de sais inorgânicos ajustado para uma faixa

5 de pH muito baixa, interfere em quase todos os passos necessários para a manipulação genética destes microrganismos. A maneira ideal é que a transformação genética ocorra de uma forma a não alterar a fisiologia das bactérias, evitando problemas como a sua readaptação fisiológica de crescimento e estabilidade do DNA plasmideal.

10 Assim com a finalidade de solucionar o problema existente, a presente invenção descreve um processo de transformação genética que permite transformar as bactérias acidófilas quimiolitotróficas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por eletroporação mantendo o seu cultivo, após o processo de transformação, nas mesmas condições do habitat natural da bactéria, ou seja,

15 mesmo pH e temperatura, não sendo alterado seu estado fisiológico natural.

O processo de transformação genética é composto por seis etapas importantes: (1) padronização da fase de crescimento do inóculo, para que a bactéria esteja mais suscetível à permeabilização de sua membrana; (2) permeabilização ou enfraquecimento da parede celular da bactéria resultando na

20 obtenção de células competentes; (3) aplicação de pulsos elétricos, (4) incorporação do DNA plasmideal com genes de interesse utilizando vetores apropriados; (5) inóculo e recuperação e (6) seleção das células transformadas.

De acordo com a presente invenção, a fase de crescimento ótima é a fase na qual o cultivo das células atinge a faixa entre 50% a 80% de oxidação de Fe^{2+}

25 no meio, preferencialmente entre 60% e 70%, uma vez que foi observado que as células nessa faixa de crescimento são mais permissivas às próximas etapas do processo.

Após as células cultivadas atingirem a fase de crescimento ótima, as células são lavadas com solução salina com a finalidade de aclimatá-las em uma

solução com pH adequado para a manutenção da estabilidade dos reagentes e do DNA que serão utilizados nas etapas subsequentes. Esta alteração do substrato é fundamental para que o vetor utilizado na etapa de transformação e o antibiótico utilizado para a etapa de seleção, não sejam desnaturados ou degradados pelo

5 baixo pH do meio. Após as lavagens com a solução salina, as células cultivadas são incubadas com um agente permeabilizador de parede celular, gerando células de bactérias acidófilas quimiolitotróficas eletrocompetentes. Os processos mais comuns de eletroporação utilizam como agentes permeabilizadores o glicerol ou a glicina. Porém, durante os experimentos verificou-se que o glicerol foi tóxico para

10 as células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* promovendo lise celular mesmo em baixas concentrações (0,5%). No entanto, a incubação das células em soluções contendo de 0,5% a 3,0%, em massa/volume, de glicina, preferencialmente de 1,0 a 2,0%, em massa/volume, em uma concentração ótima de 1,0 a 1,5%, em massa/volume, demonstrou ser eficiente na permeabilização da parede celular

15 sem provocar a lise das células, gerando células eletrocompetentes permissivas à incorporação do DNA.

Na próxima etapa do processo ocorre a incubação das células eletrocompetentes (células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR previamente

20 tratadas com glicina) com 1 a 5 µg de DNA (Vetor pAF), seguido da aplicação do pulso gerado pelo equipamento BioRad Gene ® Pulser, responsável por promover a formação de poros temporários na membrana celular. O vetor penetra na célula através desses poros transientes, que foram abertos durante o pulso elétrico sob condições ótimas, condições estas determinadas após diversas tentativas. De

25 acordo com a presente invenção as condições do pulso elétrico consideradas ótimas são: Capacitância de 25 µF; Resistência de 200Ω; Tensão entre 1,0 e 2,0 kV, sendo a tensão ótima preferencial de 1,0 a 1,5 kV; e com duração do pulso de 2 a 5 milissegundos.

Com o objetivo de recuperar e estabilizar a membrana celular após o

pulso elétrico, as células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foram incubadas por 1 hora em um meio de cultura apropriado, como por exemplo, o T&K suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH entre 1,5 a 2,5, preferencialmente em pH 1,8. Sendo que esta etapa permite que as células eletroporadas, se recuperem no meio de cultivo ideal, restaurando suas condições fisiológicas naturais.

Foi utilizado o meio de cultura T&K, desenvolvido por Tuovinen & Kelly (1973), com pequenas modificações, que representa um dos meios específicos para cultivo da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*. O meio T&K é formado pela mistura de duas soluções A e B na proporção de 4:1, respectivamente. Sendo a Solução A composta por 0,4 g/l de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; e a Solução B composta somente por 33,4 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Após serem estabilizadas, as células transformadas foram submetidas à etapa de seleção, etapa esta que tem como finalidade selecionar as células que mantiveram o DNA plasmideal incorporado, ou seja, as células transformadas (recombinantes). A seleção é realizada na presença de um agente seletivo, e neste caso em particular, o agente seletivo é um antibiótico, e as células transformadas apresentam resistência a este antibiótico. No caso da presente invenção, as células transformadas apresentam resistência ao antibiótico canamicina.

Após o período de recuperação, o inóculo é novamente lavado várias vezes com solução salina, a fim de equilibrar as células em um substrato adequado para o tratamento com o antibiótico, uma vez que a maioria dos antibióticos conhecidos são degradados em uma faixa de pH abaixo de 4,0. Em seguida, as células foram incubadas por um período de no mínimo 2 horas e no máximo 8 horas, sendo o período de incubação preferencial de 4 horas, em solução salina contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina. O período de incubação preferencial de 4 horas foi previamente padronizado e garante que todas as células que sobrevivem a esta seleção contenham o gene de resistência a canamicina, ou seja, são células recombinantes/transformadas, as quais

incorporaram o vetor pAF, e consequentemente identificadas como células rLRpAF. É importante notar que o agente de seleção não se limita à canamicina.

Após a seleção, as células rLRpAF são inoculadas em um meio de cultivo, especificamente em meio T&K suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH variando entre 1,5 a 2,5, preferencialmente em pH 1,8, para obtenção da massa celular necessária para os experimentos de confirmação da presença do vetor pAF. Opcionalmente, as células recombinantes/transformadas podem ser plaqueadas em meio T&K sólido, pH entre 1,5 a 2,5, preferencialmente em pH 1,8, mantidas a 30°C por 10 a 20 dias, e as colônias que crescerem correspondem às células rLRpAF.

Os exemplos dos procedimentos realizados na presente invenção são mostrados abaixo e, não devem ser considerados uma limitação, mas sim, uma ilustração da invenção. Ressalta-se que a linhagem LR de *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi utilizada como uma linhagem experimental, e que o processo proposto não se restringe à transformação dessa única linhagem, podendo ser aplicado em qualquer linhagem de microrganismos acidófilos quimiolitotróficos termotolerantes, ou não, como por exemplo, e não se restringindo a, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus prosperus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Acidianus brierleyi* e *Acidianus infernus*.

Destacamos que todas as unidades mencionadas na descrição da presente invenção obedecem ao Sistema Internacional de Unidades.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Construção do Vetor pAF

O vetor pBR322 comercial (Invitrogen®) foi utilizado como esqueleto para construção do vetor pAF. Uma origem de replicação vegetativa (OriV) foi previamente amplificada a partir de um transposon comercial (EZ-Tn5™) e inserida em um vetor de subclonagem pGEM-T. Posteriormente, o fragmento da OriV foi removido do pGEM-TOriV nos sítios de restrição de *Cla* I e *Hind* III e esse

fragmento foi clonado em pBR322 nos mesmos sítios de restrição. O gene de resistência a canamicina (Kan) foi removido do vetor pET28a, comercializado pela empresa Novagen, e subclonado em um sítio MCS (sítio de múltipla clonagem) no vetor pUC19 entre os sítios de restrição *Hind* III e *Sal* I. Em seguida, o

5 pBR322OriV foi digerido com as enzimas *Hind* III e *Sal* I para inserção do gene de resistência a canamicina, gerando o vetor pBR322OriV-Kan. O vetor resultante dessa construção, denominado pAF, apresenta aproximadamente 6301 pb e seu mapa está representado na Figura 1.

Para suportar este exemplo a linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi

10 transformada com o vetor pAF utilizando o processo do CaCl₂. As colônias transformadas foram selecionadas em meio de cultura LB sólido contendo 50 μ g/mL de canamicina. O meio LB é amplamente utilizado para o crescimento e manutenção de bactérias e é constituído de 10 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de cloreto de sódio e 15 g/l de ágar para os meios de cultura

15 sólidos.

As colônias resistentes a canamicina foram inoculadas em meio líquido contendo 50 μ g/ml de canamicina para posterior extração do plasmídeo por mini-preparação. Em seguida, foi realizada uma amplificação, pela técnica de PCR, de diferentes regiões (OriV e gene da canamicina) do plasmídeo e os

20 resultados confirmaram que o plasmídeo isolado é o vetor pAF construído de acordo com a presente invenção.

Exemplo 2: Obtenção de células competentes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR

As células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR foram cultivadas em meio

25 T&K líquido (K₂HPO₄.3H₂O, 0,4 g/l; MgSO₄.7H₂O, 0,4 g/l; (NH₄)₂SO₄, 0,4 g/l), suplementado com FeSO₄.7H₂O (33,4 g/l), pH 1,8 ajustado com ácido sulfúrico, e incubadas por 18 horas sob agitação de 250 rpm, a 30°C. O crescimento celular foi interrompido quando a cultura atingiu entre 50% e 80% e oxidação de Fe²⁺ no meio (titulado com dicromato de potássio - K₂Cr₂O₇).

As células foram coletadas por filtração em membranas de 0,45 µm e lavadas várias vezes com solução salina (NaCl 0,9%, em massa/volume, em água Milli-Q, pH 5,8 a 7,4). Para obtenção das células eletrocompetentes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR, a biomassa proveniente de 500 ml de cultura foi incubada em 1 ml de solução salina contendo glicina 1-2%, em massa/volume, sendo a concentração ótima de 1 a 1,5% de glicina, em massa/volume, por 30 minutos, sob agitação (250 rpm) a 30°C. Em seguida, as células foram coletadas e incubadas em gelo por 1 hora. Após incubação as células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (5 mM de fosfato de sódio, 1 mM de cloreto de magnésio; pH 5,8 a 7,4) e finalmente, ressuspensas em 200 µl de tampão de eletroporação (1 M de sacarose, 3 mM de cloreto de magnésio, pH 5,8 a 7,4).

Exemplo 3: Eletrotransformação de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR

As células eletrocompetentes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR foram obtidas como descrito no exemplo 2. Para cada 45 µl de células eletrocompetentes foi adicionado 1 µg de DNA plasmidial (vetor pAF construído de acordo com a presente invenção). Essa mistura foi submetida à eletroporação em cubetas de 0,2 mm conservadas em gelo até o momento da emissão do pulso. As condições de eletroporação foram 1,0 – 2,0 kV, 200 Ω, por 2,4 a 5 milissegundos. Logo em seguida, as células foram recuperadas em 1 ml de meio T&K suplementado com FeSO₄.7H₂O (pH 1,8) e incubadas por 1 hora sob agitação (250 rpm) a 30°C. As células recuperadas foram coletadas e lavadas duas vezes com solução salina, e inoculadas em 2 ml de solução salina contendo 50 µg/ml de canamicina por 4 horas (sob agitação de 250 rpm e a 30° C), com o objetivo de induzir a expressão do gene de resistência ao antibiótico. Após essa seleção, as células foram coletadas e inoculadas em 10 ml de meio T&K contendo FeSO₄.7H₂O (pH 1,8) e incubadas a 30°C sob agitação de 250 rpm.

As células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR eletrotransformadas (recombinantes) com o vetor pAF deu-se o nome de rLRpAF. É importante destacar que as células recombinantes da linhagem LR podem ser cultivadas em

meio T&K pH 1,8, o que significa que o processo da presente invenção é adequado para transformar a bactéria sem alterar o seu estado fisiológico.

Exemplo 4: Recuperação do vetor pAF a partir do cultivo de rLRpAF

5 As células da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR transformadas com o vetor pAF e selecionadas com canamicina por 4 horas, foram inoculadas em 500 ml de meio T&K suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 1,8) até a cultura atingir 90% de oxidação de Fe^{2+} no meio, com a finalidade de se obter células suficiente para a extração de DNA plasmideal.

10 O DNA plasmideal foi isolado com o kit Invitrogen® Mini Prep e submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. A Figura 2 mostra uma foto do gel de agarose 1% contendo o marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen®), DNA plasmideal isolado de rLRpAF, DNA plasmideal isolado a partir de uma cultura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR e 1 µg de DNA do vetor pAF (controle positivo). A presença da banda (indicada por seta) mostra que a linhagem LR recombinante
15 possui o DNA plasmideal presente no vetor pAF.

Um meio alternativo para testar a presença do vetor pAF dentro de rLRpAF foi através da técnica de PCR da região que contém a OriV do plasmídeo. O tamanho esperado do fragmento amplificado era de aproximadamente 350 pb. As reações de PCR foram realizadas com massa celular obtida a partir do cultivo
20 de rLRpAF e LR. Como controle positivo de PCR foi feita a amplificação do DNA do vetor pAF e como controle negativo foi realizada uma reação em branco. O resultado é apresentado na Figura 3 que mostra a amplificação da OriV de rLRpAF.

Exemplo 5: Curva de oxidação do Fe^{2+} de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR transformada e não transformada

25

Com o objetivo de comparar a oxidação de Fe^{2+} por *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR transformada com vetor pAF e não transformada, tanto a bactéria transformada como a não transformada foram inoculadas em meio T&K suplementado com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 1,8) e incubadas sob agitação (250 rpm) a

30°C. Como mostra a Figura 4, a rLRpAF apresenta um atraso na oxidação do Fe^{2+} em relação à linhagem não transformada devido ao período necessário para a bactéria se recuperar do processo de transformação. Com esse experimento é demonstrado que a linhagem transformada é capaz de oxidar o Fe^{2+} .

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS caracterizado por compreender as etapas de: (1) obtenção das células competentes de *Acidithiobacillus ferrooxidans*; (2) construção de um vetor capaz de se auto-replicar quando inserido nas células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*; (3) transformação das células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* previamente induzidas ao estado transiente de competência, através da utilização da técnica de eletroporação.
2. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por não alterar as propriedades fisiológicas naturais das bactérias.
3. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa de obtenção das células competentes compreendendo as etapas de: (a) padronização da fase de crescimento do inóculo; (b) filtração das células; (c) permeabilização ou enfraquecimento da parede celular da bactéria para obtenção de células eletrocompetentes.
4. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela padronização da fase de crescimento do inóculo ser a fase em que o inóculo atinge entre 50% a 80% de oxidação de Fe^{2+} no meio.
5. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela padronização da fase de crescimento do inóculo ser preferencialmente entre 60% a 70% de oxidação de Fe^{2+} no meio.
6. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela etapa de filtração ser realizada em membranas de 0,45 μm e lavagens sucessivas com

solução salina.

7. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela solução salina ser uma solução de NaCl, preferencialmente na concentração de 0,9% em massa/volume, de NaCl em água e pH na faixa de 5,8 a 7,5.

8. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela etapa de permeabilização da parede celular compreender as etapas de: (a) incubação das células previamente lavadas com solução de agente permeabilizador da parede celular; (b) lavagens sucessivas das células com tampão de lavagem, (c) ressuspensão das células em tampão de eletroporação.

9. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo agente permeabilizador ser a glicina.

10. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela glicina ser diluída em uma solução salina que compreende cerca de 0,5 a 3,0%, em massa/volume, de glicina.

11. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela solução de glicina compreender preferencialmente cerca de 0,5 a 3,0%, em massa/volume, de glicina, em uma concentração ótima de 1,0 a 2,0%, em massa/volume, de glicina.

12. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela incubação das células com o agente permeabilizador ser realizado pelo período de 10 minutos a 2 horas em temperatura entre 20 a 35°C.

13. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pela incubação das células com o agente permeabilizador ser realizado, preferencialmente pelo

período de 20 a 40 minutos.

14. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo tampão de lavagem ser constituído, preferencialmente pela solução contendo 1 mM de cloreto de magnésio e 5 mM de fosfato de sódio em pH 5,8 a 7,4.

15. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo tampão de eletroporação ser constituído, preferencialmente pela solução de 1 M de sacarose, 3 mM de cloreto de magnésio e pH 5,8 a 7,4.

16. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as etapas adicionais de: (a) mistura das células eletrocompetentes com um vetor construído; (b) aplicação de pulsos elétricos (eletroporação); e (c) seleção de células transformadas.

17. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelos pulsos elétricos serem aplicados em condições de Capacitância de 25 μ F, Resistência de 200 Ω , Tensão em torno de 1,0-2,0 kV por tempo de 2,4 a 5,0 milisegundos.

18. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelos pulsos elétricos serem aplicados na tensão de 1,0 a 1,5 kV.

19. PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ACIDÓFILAS, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pela recuperação das células eletroporadas em meio de cultura e posterior seleção das células transformadas.

20. VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, tendo seu processo de construção caracterizado por compreender as seguintes etapas: (1) utilizar o vetor pBR322 como esqueleto; (2) conter uma origem de replicação vegetativa (OriV) obtida de um transposon comercial; (3) inserção da OriV no vetor de subclonagem; (4)

remoção da OriV nos sítios de restrição determinados; (5) clonagem da OriV no vetor pBR322 nos mesmos sítios de restrição formando o vetor pBR322OriV; (6) digestão do pBR322OriV para inserção do gene de resistência a canamicina; (7) formação do vetor de interesse.

- 5 21. VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo uso do transposon comercial EZ-Tn5TM.
22. VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo uso do vetor de subclonagem comercial pGEM-T.
23. USO DO VETOR DE TRANSFORMAÇÃO, de acordo com qualquer uma
10 das reivindicações 20 a 23, caracterizado pelo fato de ser em processos de transferência de conteúdo gênico para bactérias acidófilas.
24. USO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de ser em processos de biolixiviação.

1/2

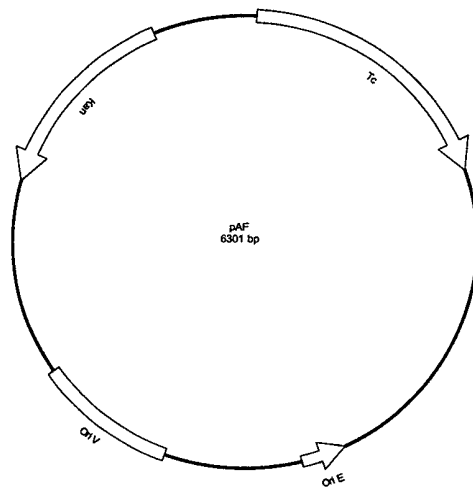


Figura 1

1 2 3 4

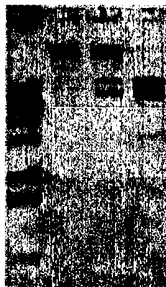
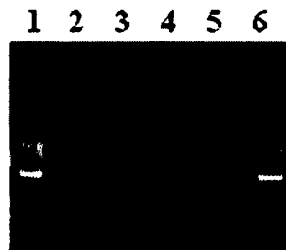
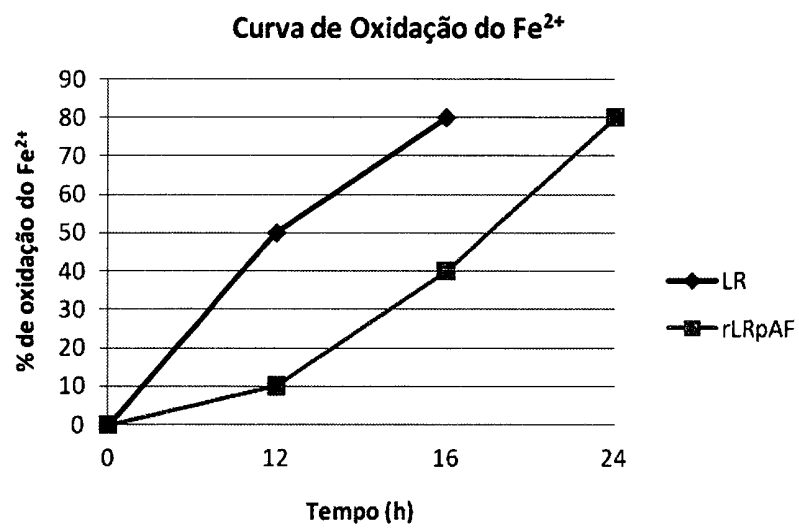


Figura 2

**Figura 3****Figura 4**

Resumo da Patente de Invenção para: **“Processo de modificação genética de bactérias acidófilas e construção de um vetor de transformação”**

A presente invenção descreve um processo de transformação de bactérias acidófilas quimiolitotróficas através da técnica de eletroporação. O processo
5 proposto é capaz de transformar uma linhagem de bactéria com um vetor de transformação denominado vetor pAF que contém uma origem vegetativa de replicação capaz de conferir ao vetor a habilidade de se replicar no interior da bactéria, sem alterar suas funções fisiológicas naturais e, o uso das bactérias modificadas de acordo com a invenção em processos de biolixiviação de minérios
10 sulfatados de cobre, ouro, urânio níquel, zinco, cobalto e outros.