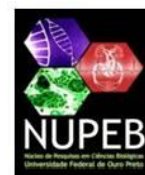




UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Métodos Pós-Genômicos aplicados à Caracterização de População Microbiana Presente em Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco

AUTORA: ROBERTA D'ANGELO AZEVEDO

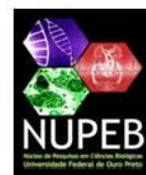
ORIENTADOR: PROF. DR. WILLIAM DE CASTRO BORGES

CO-ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. RENATA GUERRA DE SÁ COTA

OURO PRETO – MG
ABRIL, 2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Métodos Pós-Genômicos aplicados à Caracterização de População Microbiana Presente em Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Molecular.

OURO PRETO – MG
ABRIL, 2011

A994m

Azevedo, Roberta D'Angelo.

Métodos pós-genômicos aplicados à caracterização de população microbiana presente em biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco [manuscrito] / Roberta D'Angelo Azevedo. - 2011.

ix, 71f.: il., color.; graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Guerra de Sá Cota

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biologia Molecular.

1. Biologia molecular - Teses. 2. Lixiviação bacteriana - Teses. 3. Expressão gênica - teses. 4. Proteômica - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto.
II. Título.

CDU: 577.212:622.7

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

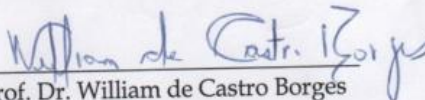


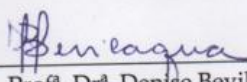
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

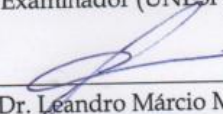
"Métodos Pós-Genômicos Aplicados à Caracterização de População Microbiana
Presente em Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco."

Aos 07 dias do mês de abril de 2011, às 14:00h, na Sala de Seminários do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Roberta D'Angelo Azevedo. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. William de Castro Borges
Presidente


Prof.^a Dr.^a Denise Bevilaqua
Examinador (UNESP)


Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 07/04/2011

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, no Laboratório de Enzimologia e Proteômica (NUPEB/UFOP), e no Laboratório de Bio&Hidrometalurgia (DEMET/UFOP), com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Suba o primeiro degrau com fé.

Não é necessário que você veja toda a escada.

Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

Aos meus pais,
José Roberto e Juçara,
pelo amor incondicional e
pelo exemplo de vida e determinação.

Agradecimentos

À **Deus**, por traçar a minha trajetória de forma tão especial.

Aos **meus pais**, José Roberto e Juçara, pelo constante incentivo, pela força nos momentos mais difíceis e por acreditarem nos meus sonhos. Amo muito vocês!

Ao **Prof. Dr. William Castro Borges**, pela orientação, pelo profissionalismo, pelo apoio constante e por me dar a oportunidade de mostrar meu trabalho. Muito obrigada!

À **Prof^a. Dr^a. Renata Guerra de Sá**, pela co-orientação, pela presença constante neste trabalho e principalmente por incentivar a minha formação.

Ao **Prof. Dr. Versiane Albis Leão**, pela oportunidade e disponibilização do Laboratório de Bio&Hidrometalurgia, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira**, por suas valiosas discussões científicas.

À **Karina, Natália e Roberta**, pelos bons momentos, conversas, conselhos, rocks e risadas. Meninas, tudo foi bem mais fácil com vocês por perto. Muito Obrigada!

Ao **Flávio e à Isabel**, por nunca terem negado ajuda com os ensaios de biolixiviação. Muito obrigada!

Ao **Leandro** e ao **Jonathan**, pelo auxílio com os últimos géis bidimensionais.

Aos colegas do **LBBM**: Prof. Elísio e Prof^a. Karen, Matheus, Mônica, Nilza, Tiago, Roenick, Diego, Jordana, Leandro D., Leandro G., Nayara, Sávio, Victor, Eneida, Ezequiel e Eduardo, pela carinhosa convivência e por todos os ensinamentos.

Aos colegas do **LEP**: Prof. Milton, Micheline, Karina, Sonaly, Gustavo, Priscila, Marina, Igor, Aline, Simone, Vinicius e Alessandra. Obrigada pelo apoio.

Aos colegas do **Laboratório de Bio&Hidrometalurgia**: Prof. Vítor, Sueli, Damaris, Flávia, Lázaro, Tássia, Sérgio, Flavinho, Daniel e Márcio.

Ao **meu namorado**, José Roberto, que tornou esta caminhada mais leve com sua alegria e companheirismo. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado!

Aos meus **familiares e amigos**, por todo o carinho, apoio e incentivo.

À **Fernanda e à Samantha**, amigas de coração, com quem vivi momentos inesquecíveis em Ouro Preto, e que mesmo à distância estão sempre presentes!

À **Adarlene e à Letícia**, pela amizade especial.

Aos **colegas** de mestrado.

Aos companheiros desde a graduação: **Micheline, Samuel, Bruno, Kátia, Carol, Leonardo e Iara**.

Aos colegas dos laboratórios do **NUPEB**.

À **Cida**, por ser sempre tão carinhosa e atenciosa!

À **Camila, Carol, Jucélia, Natália e Priscila**, pela companhia durante esses dois anos.

Ao Centro de Investigação e Desenvolvimento em Fermentação Industrial (CINDEFI) CONICET-UNLP da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata, por gentilmente fornecerem as amostras referência de *At. ferrooxidans* utilizados neste trabalho.

Ao **CNPq**, pelo apoio financeiro fundamental para que este trabalho fosse realizado.

Muito obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O Processo de Biolixiviação.....	2
1.2- Os Microrganismos Presentes no Processo de Biolixiviação.....	5
1.3- A Era Genômica na Caracterização dos Microrganismos.....	8
1.4- A Era Pós-Genômica na Caracterização dos Microrganismos.....	12
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1- Reator de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Sistema Contínuo.....	22
3.2- Coleta das Amostras do Biorreator.....	23
3.3- Preparação das Amostras.....	24
3.4- Eletroforese SDS PAGE.....	24
3.5- Eletroforese Bidimensional.....	25
3.6- Digestão de Proteínas em Gel para Sequenciamento.....	26
3.7- Espectrometria de Massas.....	26
3.8- Ensaio de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Garrafas.....	27
3.9- Análise da Expressão Gênica por qPCR.....	29
3.9-1- Extração do RNA total.....	29
3.9-2- Oligonucleotídeos Iniciadores.....	30
3.9-3- Síntese de cDNAs.....	30
3.9-4- Reação da PCR Quantitativa em Tempo Real.....	31
3.9-5- Curva de Eficiência dos Iniciadores.....	32
3.9-6- Curva de Dissociação dos <i>Amplicons</i>	32
3.9-7- Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1- Extração e Análise do Perfil Protéico do Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco.....	36
4.2- Identificação das Proteínas Indicadoras da População Microbiana do Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco.....	39
4.3- Ensaio de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Garrafas.....	47
4.4- Análise da Expressão de Genes do Carboxissoma e do Metabolismo Energético por qPCR.....	50
5. CONCLUSÕES.....	55

6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7.	ANEXOS.....	67

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo para o mecanismo de contato indireto de biolixiviação. Visão global da célula bacteriana incorporada a EPS ligada à pirita por meio de interações eletrostáticas. CM: Membrana Citoplasmática; PS: Espaço Periplasmático; OM: Membrana Externa (Adaptado de Rohwerder e cols., 2003).

Figura 2: Taxa (r) da concentração de íon Fe^{2+} por hora sob vários potenciais (Eh). (a) Produção de íon Fe^{2+} a partir da lixiviação de pirita por íons Fe^{3+} . (b-c) Oxidação Fe^{2+} por microrganismos (Adaptado de Rohwerder e cols., 2003).

Figura 3: Microscopia eletrônica de células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Adaptado de Peng e cols., 2005).

Figura 4: Representação circular da sequência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Os dois círculos internos representam as proteínas preditas que codificam os genes na fita direta e reversa, respectivamente. As categorias funcionais estão indicadas pelas cores: metabolismo energético (verde), metabolismo de DNA (vermelho), síntese de proteínas (rosa), transcrição (amarelo), metabolismo de aminoácidos (laranja), metabolismo central intermediário (azul escuro), processo celular (azul claro), metabolismo de nucleotídeos (turquesa), proteínas hipotéticas (cinza), elementos móveis (preto) e diversas funções (marrom). O terceiro e quarto círculos indicam as principais transposases e elementos móveis (laranja), genes relacionados aos plasmídeos (vermelho) e elementos de fagos (azul). O quinto e sexto círculos indicam os genes RNAt (cinza). O sétimo e oitavo círculos mostram os genes preditos envolvidos com a oxidação de enxofre (roxo), ferro (vermelho), e hidrogênio (laranja). O nono e décimo círculos mostram o viés e a inclinação, respectivamente, do conteúdo GC no genoma. (Valdés e cols., 2008).

Figura 5: Vias preditas (via das pentoses-fosfato, glicólise, glicogênio, ciclo TCA) para o metabolismo central de carbono (Valdés e cols., 2008). Os círculos em vermelho evidenciam o papel da enzima RuBisCO no metabolismo de carbono.

Figura 6: Modelo para oxidação de ferro baseado no genoma de *A. ferrooxidans*. Representação esquemática das enzimas e proteínas envolvidas na transferência de elétrons durante a oxidação do ferro (Valdés e cols., 2008).

Figura 7: Principais abordagens experimentais relacionadas à exploração do proteoma de microrganismos lixiviadores. (A) Etapa de preparo da amostra envolvendo os passos de coleta do material de partida, o qual pode ser um bioreator ou amostra retirada diretamente do meio ambiente, recuperação dos microrganismos por métodos diversos e extração / isolamento do conteúdo proteico. (B) Separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional, coloração do gel, excisão das bandas de interesse e digestão em gel. A partir desta etapa os peptídeos podem ser analisados diretamente em espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF-ToF, ou fracionados previamente através de cromatografia líquida de alta eficiência comumente por meio de duas etapas ou dimensões: uma troca catiônica seguida de separação em fase reversa das amostras geradas na primeira dimensão. Estas etapas de separação dos peptídeos tem por objetivo principal aumentar a percentagem de cobertura de sequência para uma

determinada proteína. **(C)** Alternativamente, o extrato proteico obtido pode dar origem a uma mistura peptídica complexa através de digestão enzimática em solução. Por este método faz-se necessária a separação dos peptídeos por métodos cromatográficos, previamente à análise por espectrometria de massas, para aumentar a percentagem de cobertura do proteoma a ser analisado. Neste caso a espectrometria pode ser realizada *off-line* utilizando-se de um MALDI-Tof-Tof, ou o cromatógrafo pode ser acoplado diretamente a um espectrômetro de massas que opera por ionização do tipo Electrospray. As etapas subsequentes para ambas abordagens envolvem recuperação dos dados espectrais e busca de homologia nos bancos de dados por meio de softwares apropriados (Adaptado de Keller e Hettich, 2009).

Figura 8: Possível adaptação de bactérias acidófilas ao ambiente ácido. As proteínas periplasmáticas de microrganismos acidófilos como *A. ferrooxidans* formam uma barreira positiva para retardar a entrada de prótons do exterior (Adaptado de Jerez, 2008).

Figura 9: Modelo de metabolismo celular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 baseado no genoma. Inclui sistemas de transporte, componentes quimiolitotróficos, metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre, e ciclo biogeoquímico (Valdés e cols., 2008)

Figura 10: Esquema da montagem experimental do sistema de biolixiviação em sistema contínuo.

Figura 11: Membranas Millipore após a filtração de 1L da amostra do biorreator de lixiviação de zinco.

Figura 12: Esquema do sistema ‘rolling bottle’ de biolixiviação em garrafas.

Figura 13: Perfil eletroforético da amostra biorreator. Eletroforese SDS-PAGE 12% da amostra biorreator, gel corado por *Coomassie Blue*. As setas indicam as proteínas mais abundantes da preparação. R: Amostra Biorreator. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

Figura 14: Eletroforese bidimensional da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* (A) e da amostra biorreator (B). Aproximadamente 100 µg dos extratos protéicos foram submetidos à isoeletrofocalização em gel pH 3-10, seguido da separação de acordo com a massa molecular, géis corados por *Coomassie Blue*. As setas e os números indicam *spots* que apresentaram mesmo ponto isoelétrico e mesma massa molecular nos dois géis. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

Figura 15: Perfil eletroforético da amostra do biorreator. A amostra do biorreator (R) foi submetida à eletroforese SDS-PAGE, a corrida ocorreu por durante 15 minutos com objetivo de concentrar as proteínas. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

Figura 16: Alinhamento entre as sequências das proteínas de microcompartimentos e da proteína do carboxissoma (CsoS2) de *Prochlorococcus marinus*. Os peptídeos trípticos indicados em vermelho foram identificados por MS. O peptídeo no retângulo é específico da proteína do carboxissoma (CsoS2) de *P. marinus*.

Figura 17: Esquema do mecanismo proposto para a concentração de carbono pelos carboxissomas. Observar a estrutura icosaédrica do carboxissoma em roxo (Yeates e cols., 2008).

Figura 18: Representação de Sequência Genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (NC_011206). As setas verdes indicam as proteínas que foram identificadas por MS: proteínas de microcompartimento (Lferr_1381, Lferr_1382 e Lferr_1383) e proteína estrutural do carboxissoma – CsoS2 (Lferr_1387), e as azuis, os genes utilizados para a confecção dos *primers*: *carboxyB* (Lferr_1384), *carboxyA* (Lferr_1385), anidrase carbônica (Lferr_1386), e rubisco (Lferr_1388, Lferr_1389).

Figura 19: Potencial de oxidação (Eh) das amostras cultivadas em (A) meio sem minério durante 4 dias e (B) meio com minério durante 50 dias. R1: biorreator sem minério. R3: biorreator sem minério e com carbonato de cálcio. AF1: *A. ferrooxidans* sem minério. AF3: *A. ferrooxidans* sem minério e com carbonato de cálcio. R2: biorreator com minério. R4: biorreator com minério e com carbonato de cálcio. AF2: *A. ferrooxidans* com minério. AF4: *A. ferrooxidans* com minério e com carbonato de cálcio.

Figura 20: Foto de microscopia ótica com aumento de 1000x da amostra *A. ferrooxidans* (A) e da amostra biorreator (B). As setas indicam células bacterianas na forma de bastonetes.

Figura 21: Extração de RNA total. Gel de agarose/formaldeído contendo 5µg de RNA total. AF1: *A. ferrooxidans* sem minério. AF3: *A. ferrooxidans* sem minério e com carbonato de cálcio. R1: biorreator sem minério. R3: biorreator sem minério e com carbonato de cálcio.

Figura 22: Número de moléculas de RNA dos genes rusticianina (A) e citocromo C (B) da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* e amostra reator nas condições 1 (sem minério) e 2 (com minério). O gene 16S ribossomal de *A. ferrooxidans* foi utilizado como gene referência e o número de moléculas determinado pelo método do ΔCq . Os resultados foram multiplicados por 1000. A análise estatística foi realizada utilizando o pós teste de Bonferroni no programa Prisma com $P < 0,05$. As diferenças estatísticas foram representadas pelos sinais: *: diferença estatística em relação à condição 1. #: diferença estatística sob mesma condição em relação a amostras cepa referência.

Figura 23: Número de moléculas de RNA dos genes estruturais do carboxissoma (A) e das enzimas anidrase carbônica (can) e rubisco (B) da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* nas condições 1 (sem minério), 2 (com minério), 3 (sem minério e com carbonato de cálcio) e 4 (com minério e com carbonato de cálcio). O gene 16S ribossomal de *A. ferrooxidans* foi utilizado como gene referência e o número de moléculas determinado pelo método do ΔCq . Os resultados foram multiplicados por

1000. A análise estatística foi realizada utilizando o pós teste de Bonferroni no programa Prisma com $P < 0,05$. As diferenças estatísticas foram representadas pelos sinais: *: diferença estatística em relação à condição 1. #: diferença estatística em relação à condição 2 e **: diferença estatística em relação à condição 3.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características gerais do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Adaptado de Valdés, 2008)

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores referentes aos genes avaliados.

Tabela 3: Proteínas identificadas por espectrometria de massas para o reator de biolixiviação

Tabela 4: Classificação de acordo com a anotação do *Gene Ontology* das proteínas identificadas por MS

Tabela 5: Número de células bacterianas por mL e percentual de extração de zinco após 50 dias de cultivo. R2: amostra biorreator com minério. R4: amostra biorreator com minério e carbonato de cálcio. AF2: cepa referência *A. ferrooxidans* com minério. AF4: cepa referência *A. ferrooxidans* com minério e carbonato de cálcio.

Lista de Abreviaturas e Siglas

%: Porcentagem
 α : Alfa
 β : Beta
 γ : Gama
 μg : Micrograma
 μL : Microlitro
 $^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius
1-DE: Eletroforese em uma dimensão
2-DE: Eletroforese Bidimensional
ACN: Acetonitrila
ATP: Adenosina trifosfato
BLAST: do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*
CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano- sulfonato
cm: Centímetros
CO₂: Dióxido de Carbono
Cols.: Colaboradores
D.O: Densidade óptica
DAM: Drenagem Ácida de Mina
Da: Daltons
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DNase: Desoxirribonuclease
dNTP: Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
DTT: Dithiothreitol
Eh: Potencial Redox
EPS: Polissacarídeo extracelular
Fig.: Figura
g: Aceleração da gravidade
GO: *Gene Ontology*
IAA: Iodoacetamida
IPG: do inglês, *Immobilized pH Gradient*
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
kDa: Quilo Dalton
mA: Miliamperes
mg: Miligramas
mL: Mililitro
mM: Milimolar
mV: Milivolts
M: Molar
MM: Padrão de massa molecular
MS: Espectrometria de Massas
mRNA: RNA mensageiro
NCBI: do inglês, *National Center for Biotechnology Information*
nm: Nanômetros
pb: Pares de bases
PCR: do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
pH: Potencial hidrogeniônico

q-PCR: do inglês, *Quantitative Reverse Transcription PCR*
RNA: Ácido ribonucleico
RNase: Ribonuclease
rpm: Rotações por minuto
RT-PCR: do Inglês, *Reverse Transcriptase PCR*
SDS: Sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE: do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
TFA: Ácido Trifluoroacético
Tm: Temperatura de *melting*
Tris: Tris-hidroximetilaminometano
U: Unidade
X g: Gravidade

Resumo

O processo de biolixiviação é uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente para a remoção dos resíduos minerais. Os microrganismos responsáveis por este processo são as bactérias acidófilas, dentre as quais destacam-se as do gênero *Acidithiobacillus* que obtêm energia a partir da oxidação do ferro (II) ou enxofre elementar. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos para que intervenções biotecnológicas possam ser empregadas no sentido de aperfeiçoar os processos de biolixiviação por elas desenvolvidos. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem utilizando, nos últimos anos, abordagens pós-genômicas visando a caracterização de bioreatores. Dando continuidade a esta linha de investigação, este trabalho teve como objetivo identificar a comunidade microbiana envolvida no processo de biolixiviação de sulfeto de zinco e determinar níveis de expressão de genes envolvidos em vias centrais do metabolismo desses microrganismos. Microrganismos mantidos em um biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco foram coletados por filtração para subsequente extração de proteínas. O perfil eletroforético da amostra, analisado por 1-DE e 2D-PAGE, revelou a integridade da preparação com proteínas distribuídas por toda a faixa de ponto isoelétrico (pI) e com variedade de massa molecular. A análise comparativa do gel 2D entre a amostra cepa referência e a população microbiana do biorreator indicou semelhança relevante na distribuição dos *spots* no gradiente de pH 3-10. Após digestão em gel, as proteínas foram identificadas por espectrometria de massas através da busca por similaridade. Treze proteínas relacionadas à estrutura do carboxissoma e à oxidação do ferro (II) foram identificadas. Para simular as condições do biorreator foram realizados ensaios de biolixiviação em garrafas, nas quais os microrganismos foram mantidos por 50 dias e apresentaram taxa de extração de zinco de aproximadamente 50% e Eh próximo a 600 mV. Posteriormente, oito genes do operon carboxissoma e dois genes do operon de oxidação do ferro foram selecionados para correlacionar níveis de expressão com alterações em quatro condições de biolixiviação do reator. Nossos resultados indicaram que a concentração do zinco modula os níveis de expressão dos genes estudados. Isto nos permite sugerir que alterações transcricionais são necessárias e, portanto, passíveis de manipulação para se atingir patamar de eficiência desejável de lixiviação. A identificação de proteínas envolvidas na biolixiviação e a compreensão de sua regulação, são passos importantes para melhorar a eficácia da remoção dos resíduos minerais.

Abstract

Bioleaching constitutes a suitable alternative for the removal of mineral wastes from industrial activities, therefore producing real benefits to the environment. The microorganisms mostly commonly associated to bioleaching are acidophilic bacteria, and the ones belonging to the *Acidithiobacillus* sp genre are known to extract energy from the oxidation of iron (II) or elemental sulfur to survive. In this scenario, these microbes merit attention due to their biotechnological potential. However, little is known about the biochemical mechanisms involved for the proposal of a more efficient bioreactor activity. In this context, our research group has been employing post-genomic approaches for the characterization of natural and industrial bioreactors. In the present work we aimed the identification of a microbial community involved in the process of zinc sulfide leaching and the understanding of the gene expression regulation, at central metabolic pathways, promoted by growth in the presence of this mineral. To accomplish this goal, microorganisms maintained in a zinc sulfide reactor were recovered by filtration for subsequent protein extraction. The electrophoretic profile of the protein preparation, evaluated by 1-DE and 2-DE, revealed the integrity of the crude extract with protein bands exhibiting a variety of molecular mass and isoelectric pI. A comparative 2-DE analysis between the *Acidithiobacillus ferrooxidans* reference strain and the bioreactor microbial population indicated a marked similarity for the distribution of protein spots in the pH range 3-10. In gel digestion of the total protein extract from the bioreactor sample, followed by nano-electrospray tandem mass spectrometry, allowed the identification of 13 proteins with the majority displaying identities to the carboxisome structure and to proteins involved in iron metabolism, all encoded by the *A. ferrooxidans* genome. In the presence of zinc sulfide both the reference strain and the bioreactor population took around 50 days to achieve approximately 50% zinc extraction and Eh 600 mV. Our next approach involved selection of ten genes, 8 from the carboxisome operon and 2 from the iron oxidation operon, to correlate their expression levels during microbial growth under four experimental conditions. Our results revealed that zinc modulate the expression profile of the investigated genes. This led us to suggest that transcriptional changes are necessary for cellular adaptation in the presence of zinc-containing mineral. The identification of proteins involved with the bioleaching process and the understanding of their regulation are important steps towards improving the efficiency of mineral waste removal.

1.Introdução

1.1- O Processo de Biolixiviação

A recuperação de metais por meio da aplicação de microrganismos é atualmente uma técnica biotecnológica estabelecida. O processo de mobilização de íons metálicos provindos de minerais insolúveis a partir da oxidação biológica é denominado biolixiviação. Esta técnica é principalmente empregada aos metais: cobre, cobalto, níquel, zinco e urânio (Bosecker, 1997; Ehrlich, 2002; Olson e cols., 2003; Rawlings, 1997, 2002; Rohwerder e cols., 2002).

O processo de biolixiviação natural é conhecido desde os tempos antigos. Plínio, o Velho (23-73 d.C.), que tinha uma paixão para observar as maravilhas da natureza, discute em seu tratado sobre história natural a "*Vitrum vitreolus quase*" - uma substância semelhante ao vidro - encontrado em rochas, que atualmente poderia ser descrita como drenagem ácida de mina (DAM). Um dos primeiros registros dos efeitos da lixiviação é na ilha de Chipre. Existem relatos que o médico grego Galeno, em 162 d.C., coletou água das minas de Skouriotissa, concentrou por evaporação e formou cristais de sulfato de cobre. Descobertas recentes revelaram evidências que antecedem estes fatos. Na verdade, foram descobertas observações a respeito de lixiviação natural de cobre e a formação de uma "nascente ácida" durante a Dinastia Han Oriental (206 a.C. - 220 d.C.) na China. Além disso, um processo de precipitação do cobre por meio de imersão em solução de azul de vitríolo foi identificado em 150 a.C. na China. Portanto, provavelmente, o processo natural de lixiviação de cobre já podiam ser reconhecidos nesta data (Dresher, 2004).

Em 1947, Colmer e Hinkel observaram um líquido de coloração azul, típico de soluções contendo cobre, escorrendo de uma pilha de rejeitos que continha sulfeto de cobre, o que não deveria ocorrer na ausência de um forte agente oxidante. Investigações revelaram a ocorrência natural de bactérias oxidando sulfetos ferrosos nas pilhas, e o sulfato férrico e o ácido sulfúrico resultantes atuaram como agentes oxidantes e lixiviaram o sulfeto de cobre. Estas bactérias foram denominadas *ferrooxidans* por sua habilidade de oxidar sulfetos ferrosos. Uma vez identificadas, rapidamente o processo foi comercializado. Segundo Zimmerly e colaboradores (1958) a primeira aplicação comercial de bactérias nos processos de lixiviação ocorreu no fim da década de 1950 na mina de cobre Bingham Canyon Mine, próxima a Salt Lake City, Utah, EUA. Devido ao avanço nas pesquisas, na última década o Chile se tornou o principal investidor de biolixiviação em escala industrial (Dresher, 2004).

Atualmente, a crescente demanda por metais não ferrosos (zinco, cobre, níquel, entre outros), associada ao empobrecimento das reservas minerais e às restrições da legislação ambiental, está forçando as empresas do setor mineral a buscar novas alternativas de produção que, entre outras características, sejam menos agressivas ao meio ambiente.

De acordo com Rawlings (2002), o uso de microrganismos no processamento de minérios apresenta vantagens quando comparado aos métodos físico-químicos convencionais. Os processos biológicos não requerem grande quantidade de energia e não produzem dióxido de enxofre nem outro gás poluente. Além disso, os resíduos de processos biominerais são quimicamente menos ativos. Entretanto, a principal vantagem do processo de biolixiviação é a capacidade de recuperar metais a partir de minérios de baixo teor de forma economicamente viável. Estudos revelaram que o processo de biolixiviação requer apenas 1/5 do custo necessário aos métodos químicos tradicionais (Pathak e cols., 2009).

A literatura demonstra a possibilidade de dois mecanismos atuarem durante a biolixiviação de sulfetos metálicos. O primeiro é o denominado “mecanismo de contato indireto”, no qual o microrganismo, aderido à superfície do mineral, realiza a dissolução do mesmo, por meio de reações envolvendo enzimas (Boon, 2001; Fowler & Crundwell, 1999b; Fowler & Crundwell, 1999a; Fowler & Crundwell, 1999c; Hansford & Vargas, 2001; Sand e cols., 2001; Tributsch, 2001). A bactéria produz um polissacarídeo extracelular (EPS) mantendo o contato entre o mineral e a bactéria. Nesta interface, ocorrem as reações de oxidação dos minerais e estas reações são consideradas mais rápidas e mais eficientes quando comparada às reações de biooxidação (Rawlings, 2005; Rohwerder e cols., 2003). Na realidade, a interação do EPS com o mineral se dá através de interações eletrostáticas (Sand e cols., 2001). Por este mecanismo, uma alta taxa de dissolução está associada a uma elevada concentração de microrganismos na superfície do mineral. A figura 1 ilustra uma visão global da célula bacteriana para o mecanismo de contato indireto de biolixiviação.

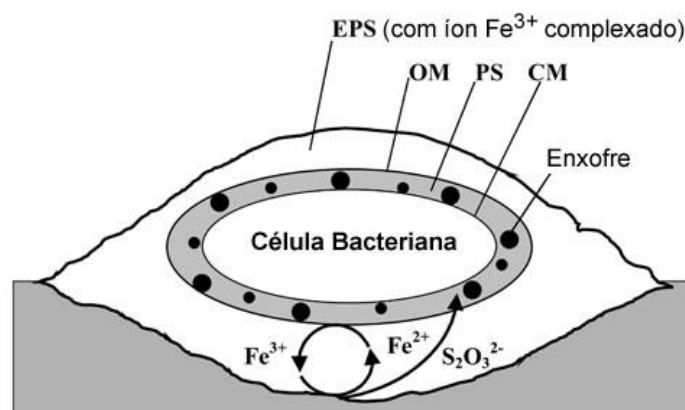
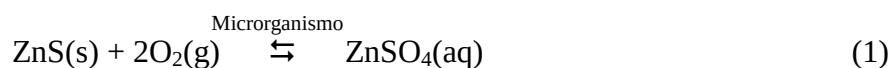


Figura 1: Modelo para o mecanismo de contato indireto de biolixiviação. Visão global da célula bacteriana incorporada a EPS ligada à pirita por meio de interações eletrostáticas. CM: Membrana Citoplasmática; PS: Espaço Periplasmático; OM: Membrana Externa (Adaptado de Rohwerder e cols., 2003).

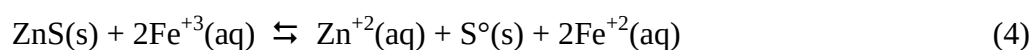
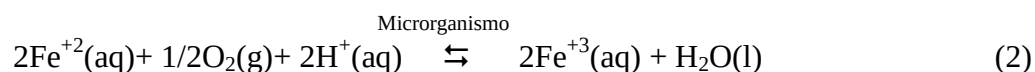
O segundo mecanismo é denominado “mecanismo indireto”. Neste, o mineral é atacado quimicamente pelo íon férrico e/ou por prótons (H^+) presentes na solução, dependendo da configuração eletrônica do sulfeto. Durante a oxidação química do mineral, o íon férrico é convertido a íon ferroso. A função do microrganismo, neste caso, é reoxidar o íon ferroso a íon férrico (reação 2), regenerando desta forma o agente oxidante. Quando ocorre a formação de enxofre elementar, o microrganismo também deve oxidar este último (reação 3), impedindo que se forme uma barreira para a difusão do agente oxidante até a superfície do mineral, onde ocorre a reação de oxidação (Sand e cols., 2001).

Para a esfalerita (ZnS), as reações envolvidas durante sua biolixiviação, segundo Boon (1996) são:

Mecanismo de contato indireto:



Mecanismo indireto:



As relações entre as concentrações molares de Fe^{2+} e Fe^{3+} definem o potencial eletroquímico do sistema, representado por Eh. Este é um parâmetro importante nos processos de biolixiviação, já que corresponde a uma medida indireta da atividade bacteriana. Esta medida baseia-se na reação de oxidação de Fe^{2+} , catalisada pelo microrganismo e representada na reação 2. A elevação na concentração de íon Fe^{3+} , provocada pelo aumento na taxa de oxidação de íon Fe^{2+} resulta no aumento de valores de Eh. Como a reação 2 é catalisada por microrganismos, uma elevação nos valores de Eh significa uma elevação na atividade bacteriana. A figura 2 mostra a relação entre a concentração de Fe^{2+} por hora sob vários potenciais (Eh) na presença e na ausência de microrganismos.

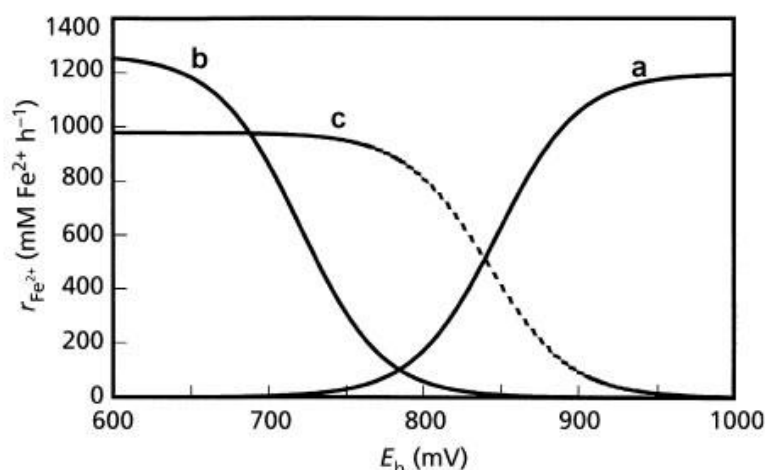


Figura 2: Taxa (r) da concentração de íon Fe^{2+} por hora sob vários potenciais (Eh). (a) Produção de íon Fe^{2+} a partir da lixiviação de pirita por íons Fe^{3+} . (b-c) Oxidação Fe^{2+} por microrganismos (Adaptado de Rohwerder e cols., 2003).

1.2- Os Microrganismos presentes no Processo de Biolixiviação

Os principais microrganismos envolvidos nos processos de biolixiviação são responsáveis pela produção do íon férrico e do ácido sulfúrico. Independente do tipo de processo ou da temperatura do sistema adotada, esses microrganismos apresentam características fisiológicas comuns que os tornam adequados para o papel de solubilização de minerais. As principais características são: I. Apresentam crescimento autotrófico através da fixação de CO_2 da atmosfera; II. Obtêm energia através do uso de

íon ferroso ou compostos de enxofre como doadores de elétrons, e geralmente utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons; III. São acidófilos, crescem em pH baixo em torno de 1,4-1,6; IV. São tolerantes a uma grande variedade de íons metálicos (Dopson e cols., 2003).

Diversos microrganismos que atuam nos processos de biolixiviação sob diferentes condições já foram isolados e de modo parcial caracterizados, embora não necessariamente identificados. Atualmente o estudo de comunidades inteiras ao invés de cepas puras tem sido aplicado à microbiologia de acidófilos. Os resultados sugerem que as interações microbianas estão muito difundidas nos ambientes de lixiviação natural, e que as culturas mistas são frequentemente mais robustas e mais eficientes na oxidação de minerais do que culturas puras de acidófilos. Entretanto as alterações físico-químicas (pH, Eh, temperatura, concentração de metal) que ocorrem durante o processo de oxidação mineral proporcionam uma pressão seletiva que resultará na predominância de alguns microrganismos com papel determinante no processo, enquanto que os outros associados ao corpo de minério possuem pouca ou nenhuma importância para o processo de dissolução mineral (Johnson, 2001).

Nos processos que ocorrem à temperatura ambiente até 40°C, os principais microrganismos encontrados são bactérias gram-negativas, como as oxidantes de ferro e enxofre, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, as oxidantes de enxofre, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus caldus* e as oxidantes de ferro, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Leptospirillum ferriphilum*. Neste intervalo de temperatura os consórcios microbianos de lixiviação também incluem microrganismos acidófilos heterotróficos como as bactérias do gênero *Acidiphilium* e as *Archaea* do gênero *Ferroplasma* (Rawlings, 2005).

Existem poucos processos comerciais de biolixiviação que atuam em temperatura superior a 45°C e, portanto, os estudos dos microrganismos que dominam estes processos são escassos. Rawlings e colaboradores (1999) identificaram espécies dos gêneros *Leptospirillum* e *Sulfobacillus*, e *A. caldus* como os microrganismos dominantes em processos no intervalo de 45-50°C. O tratamento de minérios que opera em temperaturas maiores que 70°C, possui consórcio microbiano dominado por *Archaea* principalmente dos gêneros *Sulfolobus* e *Metallosphaera* (Norris e cols., 2000).

Dentre todos os microrganismos envolvidos nos processos de biolixiviação, a espécie *A. ferrooxidans* foi a primeira capaz de oxidar minerais a ser identificada (Colmer e Hinkle, 1947), sendo considerada a mais importante nas operações comerciais de lixiviação de sulfetos de zinco. Por este motivo, esta espécie é amplamente estudada e pode ser considerada um microrganismo modelo para o estudo do comportamento da microbiota acidófila. Anteriormente foi denominada *Thiobacillus ferrooxidans*, porém por meio de análises da sequência 16S DNAr ficou claro que o gênero *Thiobacillus* incluía bactérias com elevado grau de heterogeneidade que pertenciam às subdivisões α -, β - e γ - de *Proteobacteria*. Sendo assim, o gênero *Thiobacillus* foi subdividido e um novo gênero, *Acidithiobacillus*, foi criado para adequar os membros acidófilos superiores do antigo gênero (Kelly e Wood, 2000). Filogeneticamente, as bactérias do gênero *Acidithiobacillus* estão situadas na subdivisão γ - de *Proteobacteria*.

A bactéria *A. ferrooxidans* é gram-negativa e monotríquia, não é capaz de esporular e como pode ser observado na figura 3 apresenta forma de bastonete, com 0,5-0,6 μ m de largura e 1,0-2,0 μ m de comprimento. Ocorrem isoladas ou aos pares, formando diplobacilos e raramente formam pequenos estreptobacilos (Jensen e Webb, 1995). A temperatura ótima para o crescimento de *A. ferrooxidans* é em torno de 33°C, embora possam crescer em qualquer temperatura no intervalo de 20-40°C. O crescimento ocorre no pH na faixa de 1,0-4,5, com o valor ótimo entre 2,0-2,3 (Mousavi e cols., 2007; Rohwerder e cols., 2003).

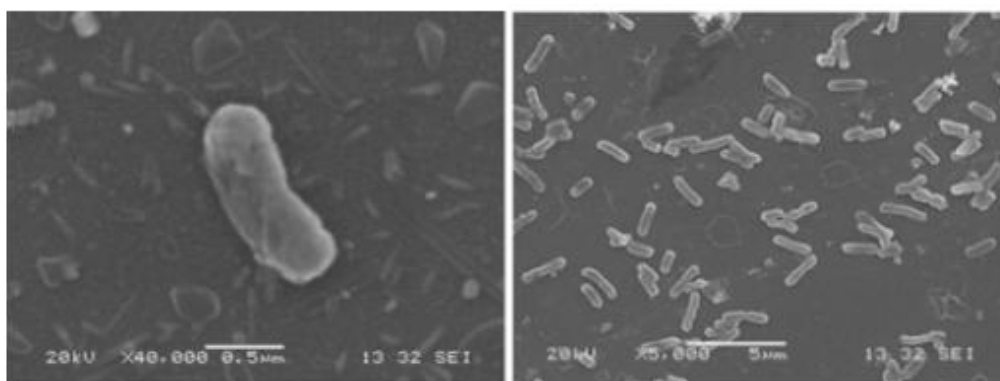


Figura 3: Microscopia eletrônica de células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Adaptado de Peng e cols., 2005).

1.3- A Era Genômica na Caracterização dos Microrganismos

Acredita-se que mais de 90% dos microrganismos em um determinado ambiente não sejam facilmente cultiváveis por meio de métodos convencionais (Amann e cols., 1995). Portanto, durante um longo período as contribuições individuais de diferentes espécies em um determinado ambiente permaneceram parcialmente desconhecidas. O recente desenvolvimento de inúmeras ferramentas moleculares que dispensam a necessidade de isolar cada espécie microbiana tem proporcionado novas perspectivas promissoras para a ecologia microbiana (Schneider e Riedel, 2010). Ao nível genético, os microrganismos são agrupados de acordo com as similaridades em seus genes, refletindo suas relações durante a evolução (Woese, 1987). Segundo He e cols. (2006), a aplicação de técnicas de filogenia molecular tem inclusive, acelerado o entendimento acerca da diversidade de microrganismos presente nos processos de biolixiviação.

A introdução de diversas técnicas de biologia molecular, como a hibridação DNA-DNA, a determinação do conteúdo CG do DNA, e análise filogenética do DNAr 16S (Harrison 1982; Lane e cols., 1992; Pizarro e cols., 1996) têm contribuído para a consolidação do conhecimento a cerca dos processos de biolixiviação (Rohwerder, 2003). Além disso, métodos baseados na PCR, como RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA* (Novo e cols., 1996; Selenska-Pobell e cols., 1998), análise do polimorfismo da região intergênica DNAr 16S-23S (Pizarro e cols., 1996), BOX (amplificação por PCR de regiões denominadas BOX, que são conservadas e repetitivas do no DNA cromossômico bacteriano) e ERIC PCR - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* (Selenska-Pobell e cols., 1998) tem se mostrado eficientes na identificação e caracterização de populações microbianas envolvidas em biolixiviação.

Em 2000, foi apresentado, ainda incompleto, o projeto de sequenciamento do genoma de *A. ferrooxidans* (Selkov e cols.; 2000). Esta foi a primeira caracterização genômica de uma bactéria acidófila extrema (Cárdenas e cols.; 2010). Segundo Jerez (2008), a importância de apresentar a sequência genômica deste microrganismo está relacionada à possibilidade de investigar e formular hipóteses a respeito da regulação da maioria dos genes sob diferentes condições ambientais.

Contudo, somente em 2008, Valdés e cols. publicaram a anotação completa da sequência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, uma ação conjunta das

intituições: *Integrated Genomics* e *The Institute for Genomic Research* (<http://tigr.org/>). A figura 4 ilustra a representação circular e a tabela 1 resume as principais características deste genoma. Como esperado, o genoma apresenta um completo repertório de genes necessários para a sobrevivência da célula, incluindo genes para a fixação de CO₂, biossíntese de nucleotídeos e de cofatores.

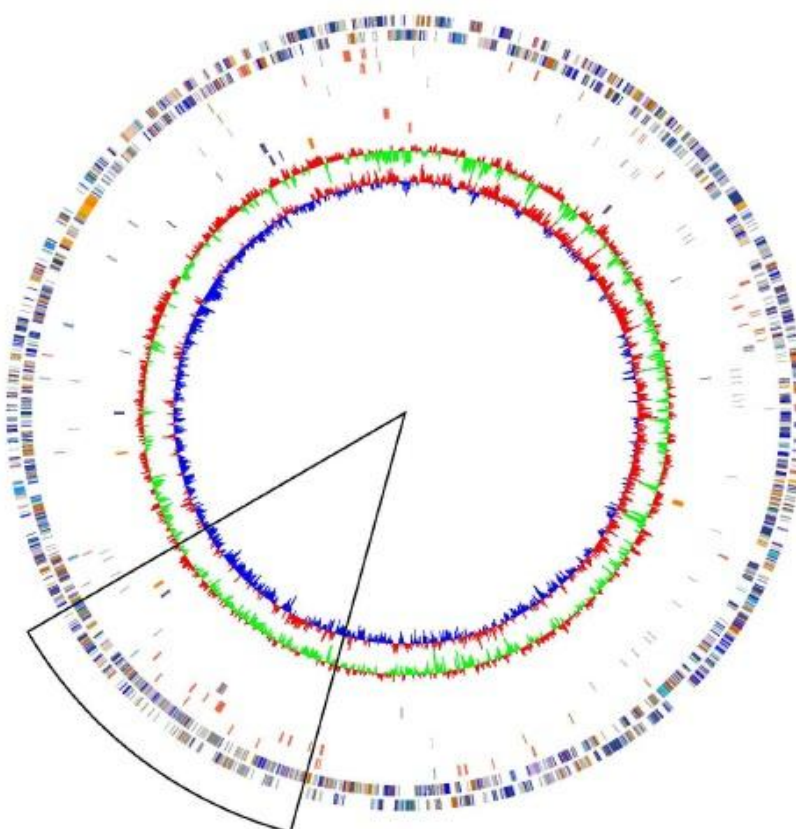


Figura 4: Representação circular da sequência genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Os dois círculos internos representam as proteínas preditas que codificam os genes na fita direta e reversa, respectivamente. As categorias funcionais estão indicadas pelas cores: metabolismo energético (verde), metabolismo de DNA (vermelho), síntese de proteínas (rosa), transcrição (amarelo), metabolismo de aminoácidos (laranja), metabolismo central intermediário (azul escuro), processo celular (azul claro), metabolismo de nucleotídeos (turquesa), proteínas hipotéticas (cinza), elementos móveis (preto) e diversas funções (marrom). O terceiro e quarto círculos indicam as principais transposases e elementos móveis (laranja), genes relacionados aos plasmídeos (vermelho) e elementos de fagos (azul). O quinto e sexto círculos indicam os genes RNAt (cinza). O sétimo e oitavo círculos mostram os genes preditos envolvidos com a oxidação de enxofre (roxo), ferro (vermelho), e hidrogênio (laranja). O nono e décimo círculos mostram o viés e a inclinação, respectivamente, do conteúdo GC no genoma. (Valdés e cols., 2008).

Tabela 1: Características gerais do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Adaptado de Valdés, 2008)

Características	Valor
Tamanho do genoma completo (pb)	2.982.397
Percentual GC (%)	58,77
Número total de sequências codificantes	3.217
Porção codificante (%)	97,45
Número de operons RNAr (16S-23S-5S)	2
Número de operons RNAt	78
Proteínas com função conhecida	2.070
Proteínas hipotéticas conservadas	388
Proteínas hipotéticas	759
Categorias funcionais melhor representadas	(%)
Envelope celular	7,8
Proteínas de transporte e ligação	7,61
Metabolismo energético	6,52

A espécie *A. ferrooxidans* fixa o CO₂ através do ciclo de Calvin-Benson-Bassham (ciclo de Calvin), utilizando a energia e o poder redutor derivados da oxidação do ferro ou do enxofre. Os primeiros estudos desenvolvidos por Silver (1970) revelaram uma relação direta entre a taxa de oxidação de ferro e de enxofre e a taxa de fixação de CO₂ nesta bactéria. Várias enzimas do Ciclo de Calvin já foram descritas, incluindo a enzima chave D-ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO). A figura 5 ilustra o papel da RuBisCO no metabolismo de carbono de *A. ferrooxidans*. Três cópias do cluster gênico para RuBisCo foram identificadas em *A. ferrooxidans* (Váldez e cols., 2008). Existem duas formas distintas de RuBisCO (I e II) com diferentes funções catalíticas presentes em microrganismos autotróficos. Genes que codificam a forma I já foram caracterizados em *A. ferrooxidans* (Kusano e cols., 1991). Os clusters gênicos que potencialmente codificam uma segunda cópia da forma I e uma cópia da forma II foram preditos e mostraram ser diferencialmente expressos dependendo do meio de cultura empregado, com ferro ou enxofre (Quatrini e cols., 2005).

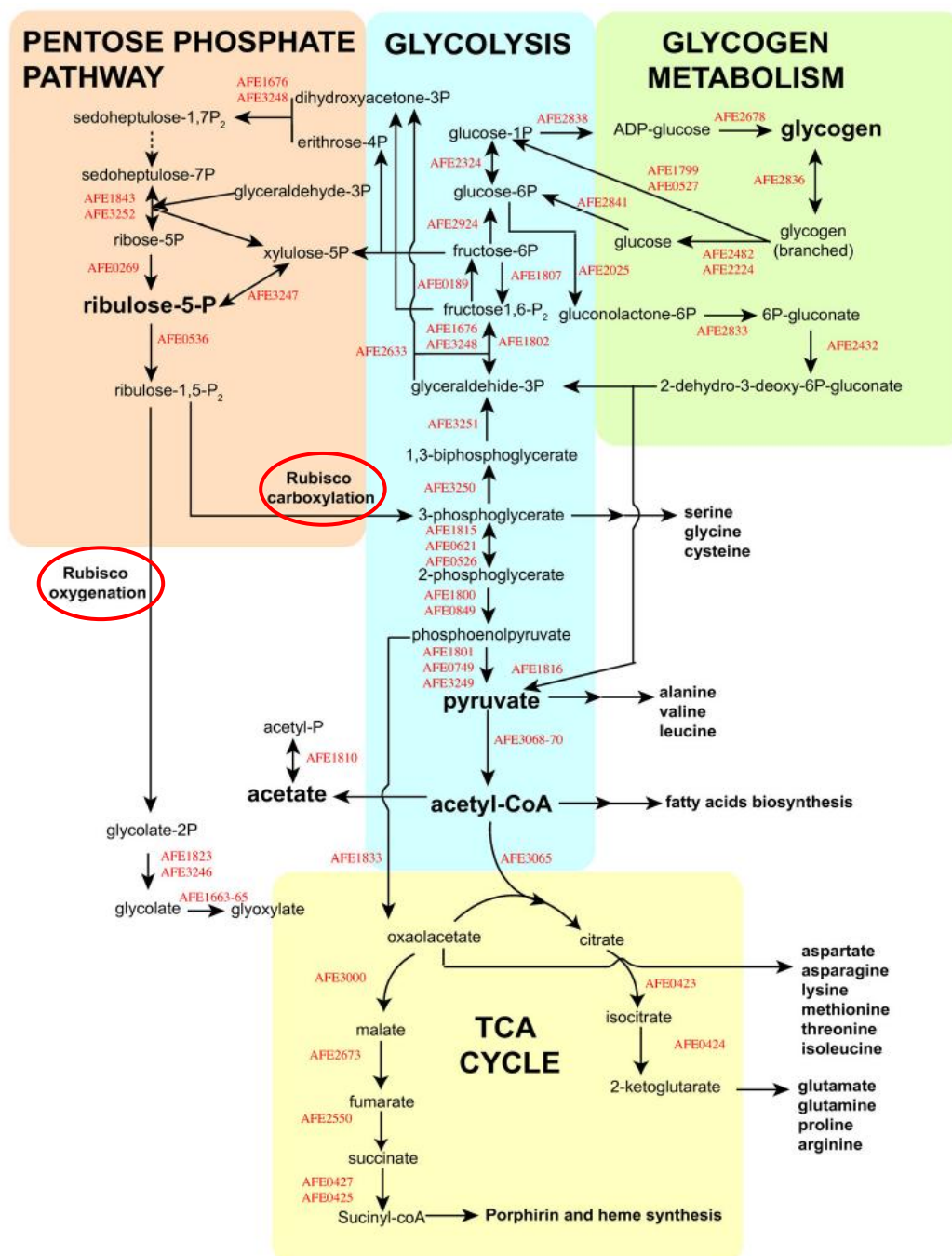


Figura 5: Vias preditas (via das pentoses-fosfato, glicólise, glicogênio, ciclo TCA) para o metabolismo central de carbono (Valdés e cols., 2008). Os círculos em vermelho evidenciam o papel da enzima RuBisCO no metabolismo de carbono.

A análise da sequência genômica de *A. ferrooxidans* através de ferramentas de bioinformática permitiu a identificação dos principais componentes da cadeia de transporte de elétrons envolvidas na oxidação do ferro e do enxofre. Os genes com função de oxidação do ferro estão organizados em duas unidades transcricionais: os operons *petI* e *rus*. A figura 4 ilustra as enzimas e proteínas envolvidas na transferência

de elétrons durante a oxidação do ferro. O operon *petI* codifica as três subunidades do complexo *bc1*, uma cadeia pequena de desidrogenase de função desconhecida e o citocromo *c*₄, que recebe os elétrons da rusticianina e os transportam para o complexo *bc1* (Levican e cols., 2002). O operon *rus* codifica dois tipos de citocromo *c* (Cyc1 e Cyc2), componentes da citocromo oxidase aa3 e a rusticianina (Appia-Ayme, 1999). O citocromo *c* (Cyc2) é responsável por receber os elétrons diretamente do Fe^{2+} , devido a sua localização na membrana externa. Baseado em estudos transcricionais, bioquímicos e genéticos (Holmes e Bonnefoy, 2006) foi proposto que os elétrons são transportados do Cyc2 até a rusticianina. A partir do Cyc2 alguns elétrons alimentam a via à jusante através de Cyc1 até citocromo oxidase aa3, e outros alimentam a via à montante que regenera o doador universal de elétrons NADH, por meio do fluxo reverso de elétrons através de CycA1< complexo *bc1*< ubiquinona (QH_2)< NADH desidrogenase, como pode ser observado na figura 6.

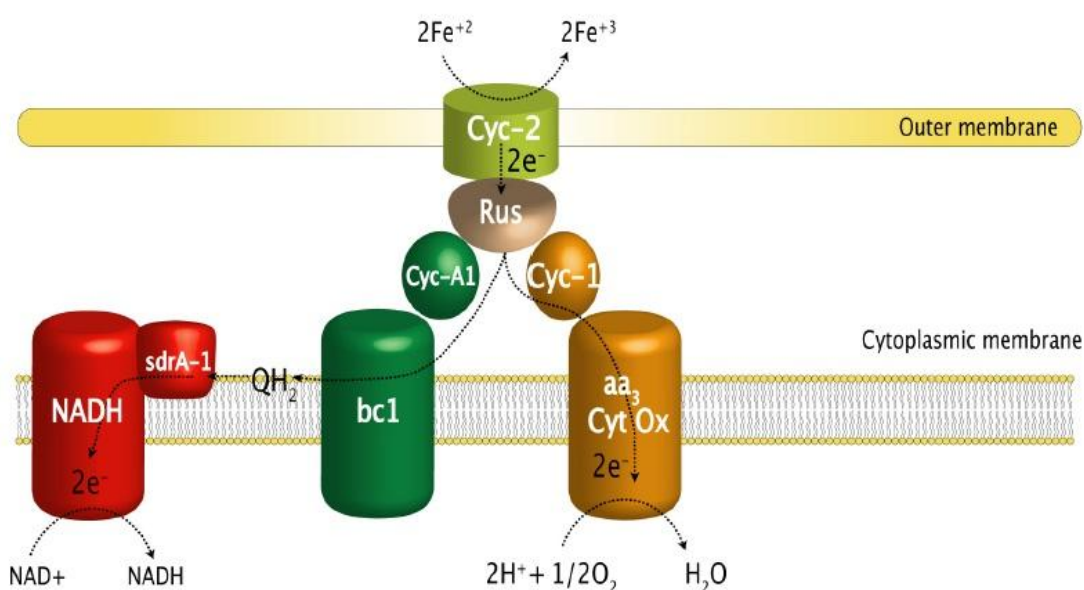


Figura 6: Modelo para oxidação de ferro baseado no genoma de *A. ferrooxidans*. Representação esquemática das enzimas e proteínas envolvidas na transferência de elétrons durante a oxidação do ferro (Valdés e cols., 2008).

Os genes que codificam as enzimas e proteínas preditas envolvidas na via de transferência de elétrons da oxidação de compostos inorgânicos de enxofre reduzidos (RISCs) também foram identificados no genoma. As vias de transferência de elétrons para os RISCs são mais complexas do que aquelas para a oxidação Fe^{2+} , dificultando a sua previsão e elucidação (Váldez, 2008).

Segundo Cárdenas e cols. (2010), atualmente existem, pelo menos 56 genomas completos ou em andamento de microrganismos acidófilos extremos, sendo que 30 são de bactérias e 26 *Archea*. Porém, estes autores sugerem que a informação genômica é insuficiente para proporcionar uma compreensão razoável da funcionalidade genômica, e por inferência, do potencial metabólico completo presente em um ambiente de biolixiviação.

1.4- A Era Pós-Genômica na Caracterização dos Microrganismos

Na virada do milênio, as novas tecnologias de sequenciamento *shotgun* de DNA como o pirosequenciamento 454 (Ahmadian e cols., 2006), juntamente com as significativas reduções dos custos do processo deram um grande impulso para a pesquisa e começaram a revelar a diversidade e a distribuição das populações microbianas naturais (Tringe e cols., 2005). Entretanto, as estratégias genômicas não permitem de maneira isolada explicar a funcionalidade dos microrganismos presentes em diversos ecossistemas. Além disso, vários genes identificados para os quais não há anotação, ainda aguardam atribuição funcional (Schneider e Riedel, 2010). Estas limitações têm estimulado o desenvolvimento de análises do transcrito, tais como o qPCR (*Quantitative Real Time* – PCR) e os micro a macro arranjos de DNA e RNA (Bustin, 2002). Contudo, a difícil correlação entre os níveis de transcrição e tradução para uma determinada proteína restringe o potencial investigativo dos estudos de transcrito (Zhou e Thompson, 2002). Neste contexto, a proteômica tem emergido como uma técnica promissora para auxiliar na identificação e caracterização de atividade microbiana ao nível molecular.

Segundo Persidis (1998), define-se como proteoma o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma e proteômica como o estudo do conjunto global de proteínas e a sua expressão, função e estrutura. A proteômica não só caracteriza os produtos gênicos finais, mas também fornece informações a respeito da abundância e estabilidade das proteínas, taxas de *turnover*, modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína, e desta forma propicia o fornecimento de informações críticas da atividade metabólica.

As metodologias de proteômica exigiram a utilização e aprimoramento de técnicas que abrangem desde a extração de proteínas de uma determinada amostra biológica, até as técnicas avançadas de separação, identificação e quantificação dos constituintes isolados. A eletroforese bidimensional (2-DE) foi descrita pela primeira vez em 1969 (Macko e cols.,1969) e refinada por Klose e O'Farrell em 1975. Por este processo, as proteínas são inicialmente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico, e em seguida, submetidas à separação de acordo com a massa molecular. Neste período, a identificação de proteínas, quando possível, era trabalhosa e dispendiosa, principalmente devido à escassez de informação genética.

A partir dos anos 90, a proteômica tornou-se muito mais difundida, viável e confiável, graças a pelo menos quatro revoluções técnicas: (i) a utilização de géis para a primeira dimensão contendo gradientes de pHs imobilizados, o que tornou possível a reprodutibilidade dos géis bidimensionais, (ii) o enorme aumento dos dados genômicos, que forneceram uma base sólida para a identificação de proteínas, (iii) o grande progresso na sensibilidade e precisão das técnicas de espectrometria de massas (MS), permitindo assim a identificação rápida e em larga escala de proteínas, a quantificação absoluta e relativa de proteínas, e a determinação de modificações pós-traducionais, e (iv) melhorias formidáveis no poder computacional e na bioinformática que permitiram o processamento e avaliação do conjunto de dados. Em 2002, John Fenn e Koichi Tanaka foram agraciados com o Prêmio Nobel de Química por desenvolverem as técnicas denominadas ‘soft ionization’ como MALDI (*Matrix - Assisted Laser Desorption Ionization*) e *Electrospray* as quais permitiram a ionização e transferência para a fase gasosa de moléculas de alta massa molecular como os peptídeos e proteínas intactas.

Os experimentos de proteômica microbiana baseados em MS envolvem várias etapas e podem ser separados em duas abordagens principais: (i) eletroforese em gel bidimensional (2-DE), MS empregando tanto *fingerprintings* do mapa peptídico ou MS em *tandem* (MS/MS) para identificação (ii) cromatografia líquida (LC) - MS/MS. Estas duas abordagens podem ser observadas na figura 7.

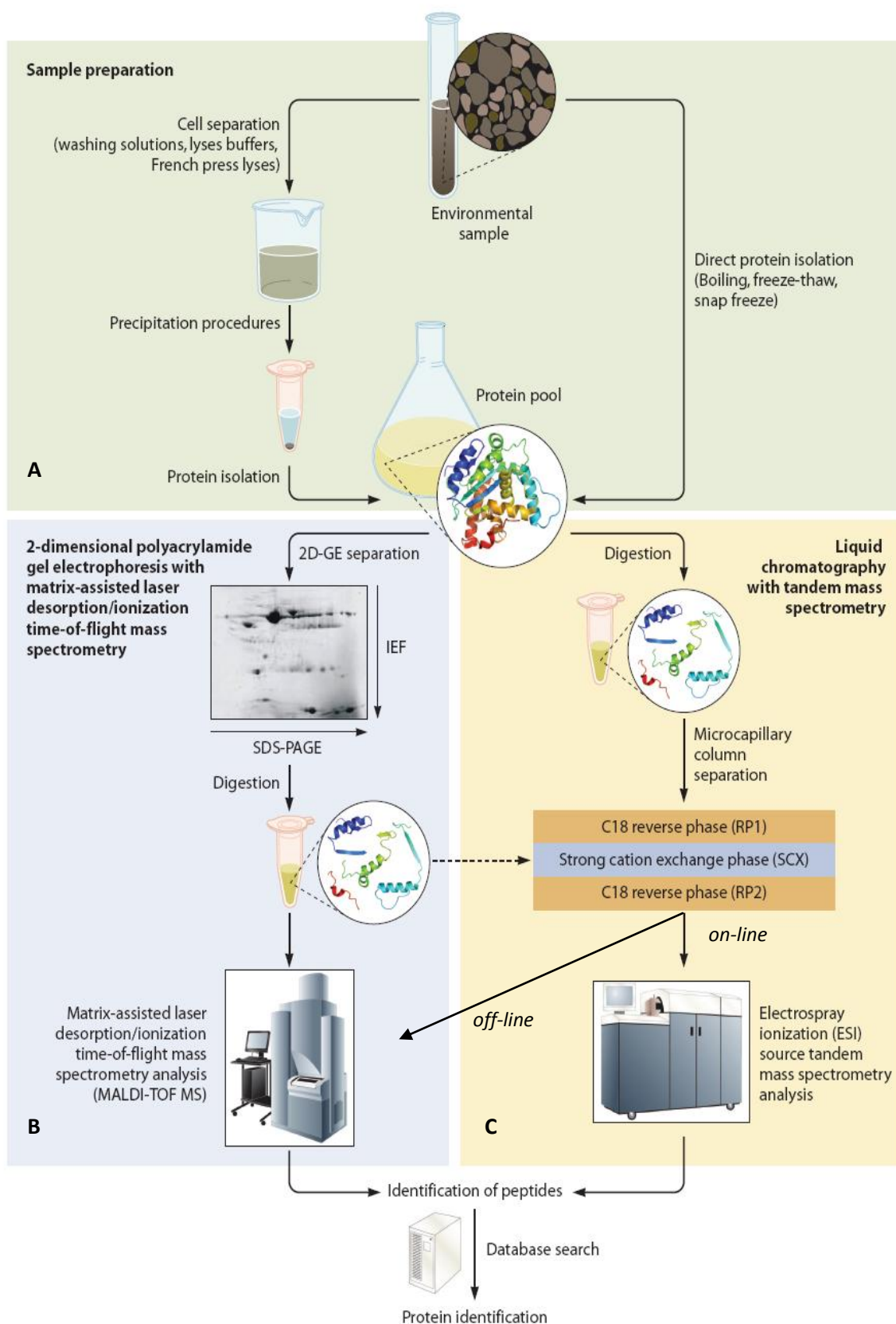


Figura 7: Principais abordagens experimentais relacionadas à exploração do proteoma de microrganismos lixiviadores. (A) Etapa de preparo da amostra...(continua na próxima página).

Continuação Figura 7: (A) Etapa de preparo da amostra envolvendo os passos de coleta do material de partida, o qual pode ser um bioreator ou amostra retirada diretamente do meio ambiente, recuperação dos microrganismos por métodos diversos e extração / isolamento do conteúdo proteico. (B) Separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional, coloração do gel, excisão das bandas de interesse e digestão em gel. A partir desta etapa os peptídeos podem ser analisados diretamente em espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF-ToF, ou fracionados previamente através de cromatografia líquida de alta eficiência comumente por meio de duas etapas ou dimensões: uma troca catiônica seguida de separação em fase reversa das amostras geradas na primeira dimensão. Estas etapas de separação dos peptídeos tem por objetivo principal aumentar a percentagem de cobertura de sequência para uma determinada proteína. (C) Alternativamente, o extrato proteico obtido pode dar origem a uma mistura peptídica complexa através de digestão enzimática em solução. Por este método faz-se necessária a separação dos peptídeos por métodos cromatográficos, previamente à análise por espectrometria de massas, para aumentar a percentagem de cobertura do proteoma a ser analisado. Neste caso a espectrometria pode ser realizada *off-line* utilizando-se de um MALDI-Tof-Tof, ou o cromatógrafo pode ser acoplado diretamente a um espectrômetro de massas que opera por ionização do tipo Electrospray. As etapas subsequentes para ambas abordagens envolvem recuperação dos dados espectrais e busca de homologia nos bancos de dados por meio de softwares apropriados (Adaptado de Keller e Hettich, 2009).

Vários estudos proteômicos têm sido realizados com *A. ferrooxidans*, e os resultados têm apresentado, em geral, uma boa validação com aqueles obtidos por estudos genômicos (Valenzuela e cols., 2005; Bouchal e cols., 2006; Chi e cols., 2007). No caso de *A. ferrooxidans*, a identificação de complexos de proteínas envolvidos nas reações de oxidação são de alta prioridade (Jerez, 2008; Bouchal e cols., 2006; Ramírez e cols., 2004).

As principais reações de oxidação de ferro e enxofre ocorrem no periplasma da bactéria (Rawlings, 2005; Yarzabal e cols., 2002), entretanto pouco se sabe a respeito do periplasma deste acidófilo e de seus componentes. Em 2007, Chi e cols. identificaram 131 proteínas na fração periplasmática de *A. ferrooxidans* cultivado em tiosulfato e 220 proteínas quando presente em outras condições de cultivo. As proteínas identificadas incluíram várias proteínas de transporte e ligação, proteínas de envelope celular, de metabolismo energético e proteínas relacionadas ao enovelamento e endereçamento. A maioria destas proteínas (70%) apresentou pontos isoelétricos acima de 7,0, portanto a maioria destas proteínas é tolerante a acidez. Estes resultados sugerem que os microrganismos acidófilos, como *A. ferrooxidans* possuem uma adaptação especial ao ambiente ácido, no qual sobrevivem. Acredita-se que esta ‘barreira’ de proteínas carregadas positivamente no periplasma poderia retardar e/ou dificultar o fluxo de prótons dentro do periplasma, evitando assim a acidificação excessiva deste espaço. A figura 8 ilustra o funcionamento desta ‘barreira’ de proteínas carregadas positivamente no periplasma de *A. ferrooxidans*.

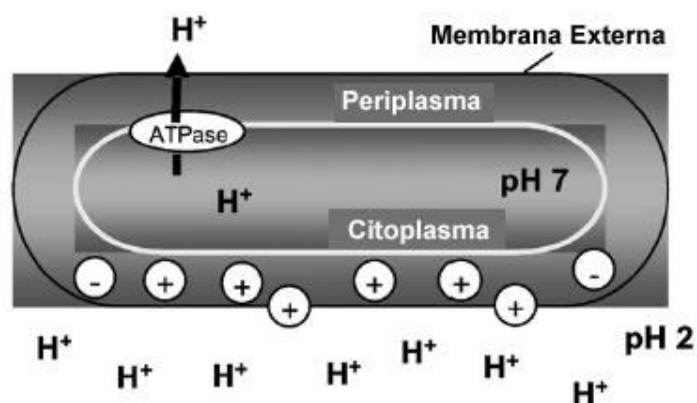


Figura 8: Possível adaptação de bactérias acidófilas ao ambiente ácido. As proteínas periplasmáticas de microrganismos acidófilos como *A. ferrooxidans* formam uma barreira positiva para retardar a entrada de prótons do exterior (Adaptado de Jerez, 2008).

Recentemente, a espectrometria de massas foi utilizada numa abordagem metaproteômica para o estudo de comunidades proteômicas no biofilme microbiano de regiões de drenagem ácida de mina (DAM). Ram e cols. (2005) detectaram 2033 proteínas das 5 espécies mais abundantes do biofilme, incluindo 48% da proteínas preditas do microrganismo dominante dos biofilmes, *Leptospirillum* grupo II. Estes autores também determinaram que uma proteína abundante correspondia ao citocromo, a molécula central para a oxidação do ferro e formação da DAM no biofilme natural.

A abordagem proteômica fornece simultaneamente informações sobre os membros que estão ativos dentro da comunidade, as vias bioquímicas e os mecanismos que são necessários para a sobrevivência nestes ambientes. Muitos estudos com microrganismos de processos de biolixiviação ainda buscam relações entre as proteínas que expliquem o potencial metabólico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. A figura 9 ilustra o esquema de uma célula de *A. ferrooxidans* e todas as funções metabólicas identificadas pela análise genômica desta espécie.

Dentro deste contexto, a utilização de abordagens genômicas e proteômicas contribuem para o entendimento a cerca do metabolismo dos microrganismos presentes em ambientes de lixiviação, fornecendo, portanto, informações importantes para melhorar a eficácia do processo de biolixiviação de sulfeto de zinco em sistema contínuo.

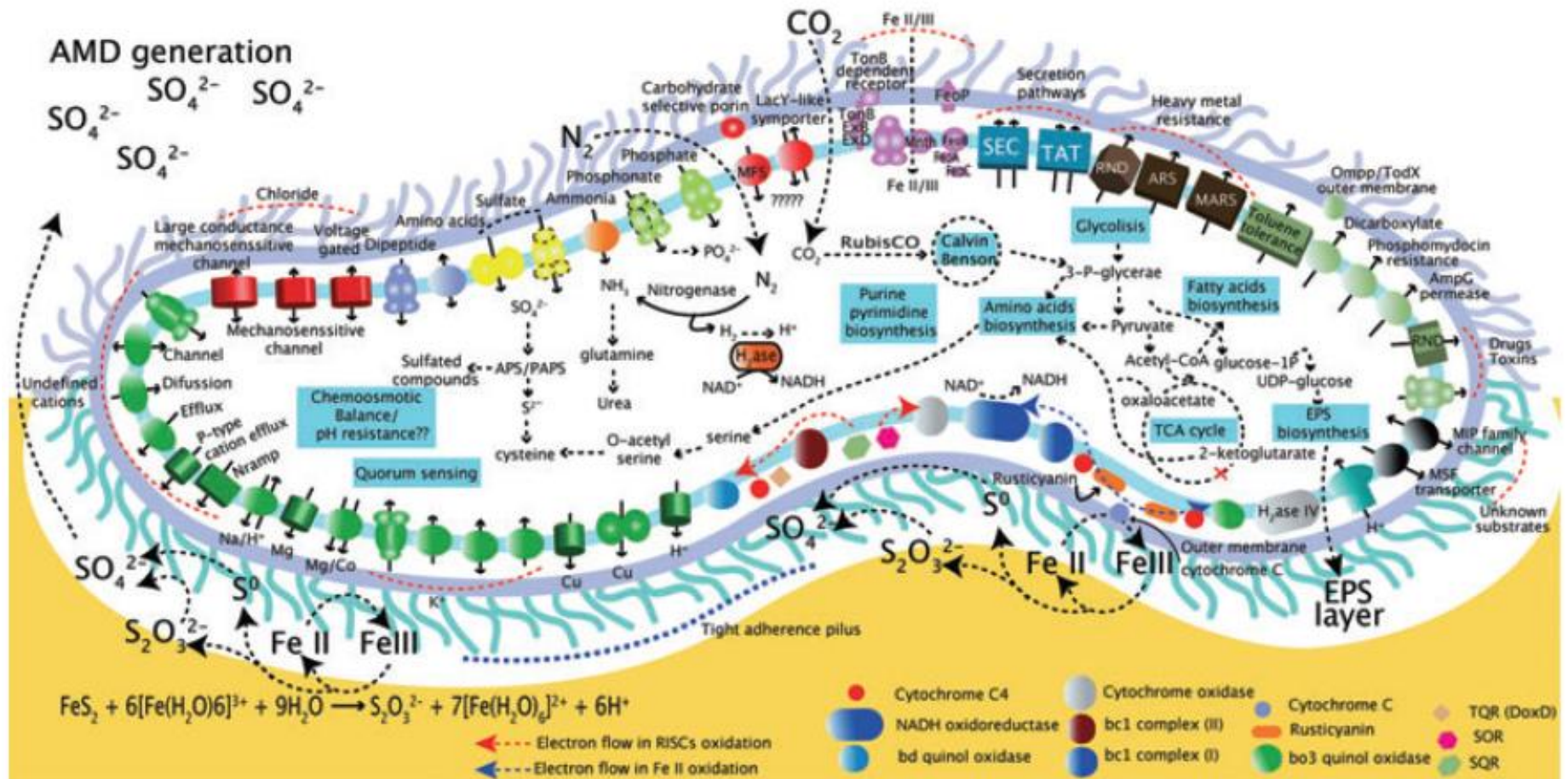


Figura 9: Modelo de metabolismo celular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 baseado no genoma. Inclui sistemas de transporte, componentes quimiolitoautotróficos, metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre, e ciclo biogeoquímico (Valdés e cols., 2008)

O Laboratório de Bio&Hidrometalurgia possui ampla experiência em mecanismos de lixiviação química e biológica de minerais. Nos últimos anos a lixiviação de zinco foi tema de um projeto, no qual foi construído um biorreator em sistema contínuo. Inicialmente, o consórcio bacteriano utilizado no biorreator de lixiviação de zinco foi formado pela combinação de uma amostra de *A. ferrooxidans*, e uma cultura enriquecida obtida de uma amostra de pirita, obtida de uma mina de zinco, e cultivada em Meio Glicose Norris Livre de Nitrogênio. Após três anos de atividade do biorreator, ao analisar os resultados dos ensaios de lixiviação de zinco, notou-se a necessidade de realizar um estudo da diversidade dos microrganismos presentes neste reator. Sendo assim, em 2008, foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular um trabalho de monografia intitulado ‘Diversidade Microbiana de Biorreatores de Lixiviação de Sulfeto de Zinco em Sistema Contínuo’, no qual foram utilizadas as técnicas de PCR, sequenciamento e RFLP para analisar a diversidade do biorreator quanto à presença dos gêneros considerados fundamentais no processo de biolixiviação: *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Ferroplasma*, *Acidiphilium* e *Sulfobacillus*. Após o sequenciamento do DNAr 16S dos cinco gêneros avaliados e a análise de polimorfismos através da técnica de RFLP este trabalho comprovou somente a presença do gênero *Acidiphilium* e da espécie *A. ferrooxidans* no biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco em sistema contínuo (Azevedo, 2008). O presente trabalho aplica novas ferramentas metodológicas para a elucidação conclusiva a respeito da população microbiana presente no biorreator de sulfeto de zinco.

2.Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral identificar, através de métodos proteômicos, a comunidade microbiana envolvida no processo de biolixiviação de sulfeto de zinco em sistema contínuo. Além disso, constitui objetivo do presente trabalho a determinação dos níveis de expressão de genes envolvidos com vias centrais do metabolismo desses microrganismos. Com esse intuito, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

1. Realizar a extração das proteínas do biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco;
2. Analisar o perfil protéico do biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco;
3. Identificar as proteínas indicadoras da população microbiana do biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco;
4. Realizar ensaios de biolixiviação de sulfeto de zinco;
5. Analisar o nível de expressão de genes do metabolismo bacteriano por qPCR.

3. Materiais e Métodos

3.1- Reator de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Sistema Contínuo

Para o presente estudo, foram utilizadas amostras do reator de biolixiviação de sulfeto de zinco em sistema contínuo do Laboratório de Bio&Hidrometalurgia da UFOP. O sistema de biolixiviação era composto por dois biorreatores dispostos em série e com capacidade de 19 L cada, denominados R1 e R2, e por um tanque pulmão (R0), responsável pela alimentação do sistema e pelo acondicionamento da polpa, com capacidade de 15 L. A figura 10 apresenta o esquema do biorreator em sistema contínuo. Os reatores foram agitados mecanicamente, a temperatura mantida em 35°C e o pH entre 1,5 e 2,0. Nestes ensaios de biolixiviação foram empregados microrganismos isolados na mina de sulfetos de Morro Agudo da Votorantim Metais e cultivados em meio seletivo, contendo o concentrado sulfetado de zinco e ferro ferroso como fontes de energia, durante três anos (Pina e cols., 2005). O meio de cultura empregado no processo continha 0,2 g/L de K_2HPO_4 , 0,4 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,8 g/L de $MgSO_4 \cdot H_2O$ e 4,0 g/L de íon ferroso.

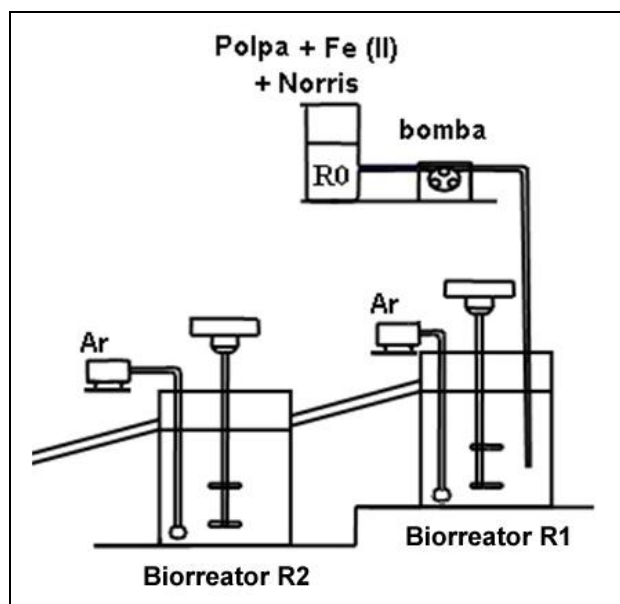


Figura 10: Esquema da montagem experimental do sistema de biolixiviação em sistema contínuo.

3.2- Coleta das Amostras do Biorreator

Inicialmente foram retiradas alíquotas de 1L de solução do biorreator R2 que foram submetidas a uma série de filtrações, utilizando primeiramente, o papel de filtro com 28 μm , em seguida o papel de filtro com 8 μm e finalmente o papel de filtro 0,22 μm (*Millex, Millipore*). A figura 11 ilustra uma membrana *Millipore* após a filtração da amostra do biorreator. A fim de retirar qualquer traço de metais existente no meio, os filtros foram lavados com H_2SO_4 1M e, em seguida, com água destilada até que o pH da membrana ficasse em torno de 6,0.

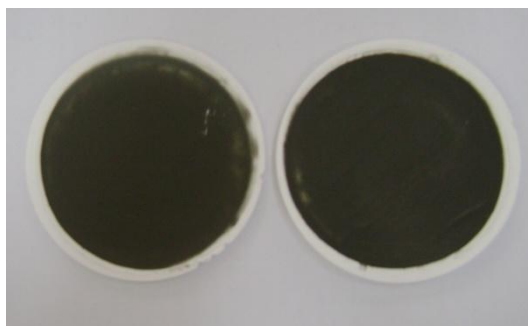


Figura 11: Membranas *Millipore* após a filtração de 1L da amostra do biorreator de lixiviação de

A cultura *A. ferrooxidans* ATCC 23270 foi utilizada como cepa referência. Esta cepa foi gentilmente cedida pelo Professor Edgardo Donati do Centro de Investigação e Desenvolvimento em Fermentação Industrial (CINDEFI) CONICET-UNLP da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata, Argentina.

Com o propósito de se obter uma grande quantidade da amostra da cepa referência *A. ferrooxidans*, realizou-se o enriquecimento em meio de cultura 9K (0,1 g/L de KCl; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,01 g/L de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 3,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 44,2 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). O pH do meio foi ajustado para 1,8 e a solução esterilizada em autoclave. A solução de sulfato de ferro foi filtrada mantendo as condições de esterilidade e, a seguir, adicionada à solução de sais.

Alíquotas de 10 mL da amostra referência foram transferidas para frascos *erlenmeyer* contendo 150 mL de meio de cultura estéril. Os frascos foram incubados a

34°C, sob agitação constante a 100 xg durante aproximadamente três dias. Após crescimento satisfatório, com Eh da solução igual ou superior a 600 mV, as amostras foram filtradas como descrito anteriormente.

3.3- Preparação das Amostras

Após a filtração das amostras, os filtros secos contendo as bactérias do biorreator foram cortados em pequenos pedaços e transferidos para um tubo tipo *falcon* com 2 mL de água Milli-Q. Para a recuperação das bactérias estes tubos foram homogeneizados com auxílio de um vortex e a fase aquosa resultante foi transferida para um tubo *ependorf* e centrifugada a 11.000 xg durante 15 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano sonicado (*Sonifier 250 - BRANSON*) em 300µL de solução de reidratação (Uréia 7 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2%; *IPG Buffer* 1%; azul de bromofenol 0,002%; DTT 65 mM) para a eletroforese bidimensional ou em 300µL de tampão de extração (Tris-HCl 5 mM pH 7,5; DTT 1 mM; Triton X100 0,5%; SDS 0,5%) para eletroforese SDS PAGE. A sonicação adotada foi de 30 pulsos de 0,1 segundos com intervalo de 30 segundos de repouso em banho de gelo por 5 vezes. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 11.000 xg durante 20 minutos. O conteúdo protéico das frações foi estimado por densitometria após separação por SDS-PAGE.

3.4- Eletroforese SDS PAGE

O extrato de proteína foi analisado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilssulfato de sódio (SDS). Cerca de 10 µL de amostra juntamente com 10 µL de tampão de amostra para proteínas e 3 µL de DTT 1 mM foram incubados a 100°C durante 5 minutos e em seguida, aplicados em gel de poliacrilamida 12% (Gel de Separação: 6,0 mL de Acrilamida/Bis 30:0,8; 3,75 mL de 4x Tris-HCl/SDS pH8,8; 5,75 mL de água, persulfato de amônio 10%, 10 µL de TEMED e Gel de Concentração: 0,65 mL de Acrilamida/Bis 30:0,8; 1,25 mL de 4x Tris-HCl/SDS pH6,8; 3,05 mL de água, persulfato de amônio 10%, 5 µL de TEMED). A corrida ocorreu a 200 V e 20 mA durante aproximadamente 1,5 h. Para posterior análise o gel foi corado com solução de *Coomassie Blue* (*Coomassie Brilliant Blue*

R250 2%; etanol absoluto 25%; ácido acético glacial 8%) durante 2 h. Para a visualização das bandas o gel foi descorado em solução de etanol absoluto 25% e ácido acético glacial 8%.

3.5- Eletroforese Bidimensional

Cerca de 125 µL da preparação contendo aproximadamente 100 µg de proteínas foram acondicionadas no sarcófago (*Strip Holder* 7cm, GE) e incorporados ao gel da primeira dimensão utilizado para a focalização isoeletrica (*Immobiline DryStrip Gels* 7cm; pH 3-10, Linear, GE). O processo de isoeletrofocalização ocorreu à temperatura de 20°C à 50 µA/gel no sistema de isoeletrofocalização *Ettan IPGphor* III (GE) de acordo com o seguinte programa: 1- Reidratação durante 12 horas; 2- 300 V durante 30 minutos; 3- Gradiente até 1.000 V por 30 minutos; 4- Gradiente até 5.000 V durante 1:20h e 5- 5.000 V por 25 minutos adicionais. Após a focalização das proteínas de acordo com o ponto isoeletrico na primeira dimensão, o gel foi submetido aos processos de redução e alquilação em solução de equilíbrio (Uréia 6 M; Tris-HCl 75 mM pH 8,8; glicerol 29,3%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,002%). A etapa de redução das proteínas ocorreu na presença de 5 mL de DTT a 1% durante 20 minutos, seguida do processo de alquilação na presença de 5 mL de iodoacetamida (IAA) a 4% durante 20 minutos adicionais.

Após as etapas de redução e alquilação, o gel foi submetido à separação de acordo com a massa molecular em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (6,0 mL de 30:0,8 Acrilamida/Bis; 3,75 mL de 4x Tris-HCl/SDS pH8,8; 5,75 mL de água, persulfato de amônio 10%, 10 µL de TEMED) segundo Laemmli, 1970. A eletroforese ocorreu a 200 V e 20 mA durante aproximadamente 1,5 h. Após a corrida, o gel foi fixado em solução de metanol 50% e ácido acético glacial 12% durante 30 minutos. Em seguida, o gel foi corado em solução de *Coomassie Blue* durante 2 h. Para a visualização das bandas o gel foi descorado em solução de etanol absoluto 25% e ácido acético glacial 8%. Posteriormente o gel foi fotografado a 300 dpi pelo scanner *Amersham Bioscience*.

3.6- Digestão de Proteínas em Gel para Sequenciamento

Inicialmente os spots foram cortados e transferidos para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL com 1,0 mL de solução descorante (etanol absoluto 25%; ácido acético glacial 8%) e mantidos a 37°C durante 24 h. Em seguida, foram realizadas as etapas de redução e alquilação das proteínas. Primeiramente foram adicionados 500 µL de DTT 50 mM e a preparação incubada a 65°C durante 30 minutos. A solução de DTT foi removida e foram adicionados 300 µL de IAA 100 mM. O tubo foi então mantido no escuro a temperatura ambiente durante 1 h. A solução de IAA foi descartada e os pedaços de gel foram lavados 3 vezes durante 20 minutos com 500 µL de NH_4HCO_3 20 mM /acetonitrila (ACN) 50%. Em seguida, os spots foram secos em *speed vac*. Para efetuar a digestão 20 µL de solução de tripsina *stock* (0,1 µg/µL) e NH_4HCO_3 20 mM foram adicionados e mantidos a temperatura ambiente. Após 20 minutos o excesso de tripsina foi retirado e foram adicionados 20 µL de NH_4HCO_3 20 mM. Os tubos foram incubados a 37°C durante a noite. Em seguida, o sobrenadante contendo os peptídeos foi transferido para um novo tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Aos pedaços de gel restantes foram adicionados TFA 0,1%/ACN 50% para a recuperação dos peptídeos ainda presentes no interior dos géis. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente durante 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado, combinado com o anterior, seco em *speed vac* e ressuspendido em 20 µL de 0,1% TFA.

3.7- Espectrometria de massas por ionização do tipo *Electrospray* - Nano-LC-ESI-MS/MS

Uma alíquota contendo 5 µL dos peptídeos trípticos foram acidificados com TFA 0.1% e injetados em sistema de nanocromatografia líquida (Dionex) equipado com uma pré-coluna PepMap C₁₈ (300 µm x 0.5 cm, Dionex) seguida por uma coluna capilar monolítica de sílica (Onyx C18, 100 µm x 15 cm, Phenomenex). A pré-coluna foi previamente equilibrada e lavada com ácido fórmico 0,1% (v/v). A amostra peptídica foi injetada e extensivamente lavada na pré-coluna antes de ser direcionada para a coluna de separação. Empregou-se gradiente para separação dos peptídeos durante 20 min com fluxo de 1,2 µL/min e temperatura da coluna fixada para 60° C. Durante este

procedimento a concentração de acetonitrila variou de 2 a 50% em ácido fórmico 0.1%. O sistema de nanocromatografia líquida operou em modo *online* com um espectrômetro de massas do tipo *electrospray ion-trap* (HCT ultra ETD II ion-trap system, Bruker Daltonics). Espectros MS e MS/MS foram adquiridos no modo de ionização positiva. O controle do instrumento, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados pelo software Compass 1.3 SP1 (Esquire control, Hystar and DataAnalysis, Bruker Daltonics). Os parâmetros utilizados para a espectrometria de massas do tipo foram: voltagem capilar – 4400 V; gás de secagem a 6 L/min; temperatura 300° C e faixa de aquisição 300 - 1800 *m/z*. As listas dos picos provenientes dos espectros MS e MS/MS foram submetidas à busca de identidade no programa Mascot (Matrix Science Ltd., versão 2.1) através da interface ProteinScape (Bruker Daltonics). Os critérios de busca incluíram: enzima, Tripsina; modificações fixas, Carbamidometilação de cisteínas; modificações variáveis, Oxidação de metionina; tolerância para íon precursor, 500 ppm; tolerância para íons fragmentos (MS/MS), 0,8 Da e NCBI nr como banco de dados.

3.8- Ensaio de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Garrafas

Com o propósito de simular as condições do biorreator foram realizados ensaios de biolixiviação em garrafas por meio do sistema ‘rolling bottle’ desenvolvido no Laboratório de Bio&Hidrometalurgia. A figura 12 ilustra o sistema de biolixiviação em garrafas adotado. A amostra proveniente do biorreator e a amostra cepa referência *A. ferrooxidans* foram cultivadas em quatro condições distintas: 1- Sem minério; 2- Com minério; 3- Sem minério e com carbonato de cálcio; 4- Com minério e com carbonato de cálcio. O carbonato de cálcio foi adicionado no meio com a finalidade de gerar uma fonte exógena do íon bicarbonato, o qual terá seu papel para os microrganismos analisado através da expressão gênica por qPCR.

Inicialmente, para promover a adaptação das células bacterianas ao minério concentrado, as amostras foram repicadas em concentrações crescentes de esfarelita: 1%, 5%, 7,5% e 10%. O pH nas garrafas foi mantido entre 1,5 e 2,0 pela adição de H₂SO₄ concentrado ou solução 6 mol/L de NaOH às garrafas. O meio de cultura empregado continha 0,2 g/L de K₂HPO₄, 0,4 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,8 g/L de MgSO₄.H₂O e 4,0 g/L de íon ferroso. A porcentagem de sólido foi mantida constante em 10% (p/v).

Portanto, foram adicionadas 300 g de esfarelita, previamente moída e tamisada em peneira de malha de 75 µm de abertura e 200 *mesh*. Nas condições 3- Sem minério e com carbonato de cálcio; e 4- Com minério e com carbonato de cálcio foram adicionados 2 g/L de CaCO₃.



Figura 12: Esquema do sistema ‘rolling bottle’ de biolixiviação em garrafas.

O ensaio de biolixiviação foi monitorado a partir dos seguintes fatores: concentração de zinco; população bacteriana; potencial de oxidação da polpa (Eh) e pH. As análises de zinco foram realizadas por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP/OES, *Varian*). A população bacteriana foi determinada por contagem direta em câmara de *Neubauer* com auxílio de um microscópio ótico (*Leica*). O Eh, relativo ao eletrodo referência Ag/AgCl, e pH foram medidos, respectivamente, em Ehmetro e pHmetro (*Digimed*).

O percentual de extração de zinco (% Extr Zn) foi determinado a partir da concentração de zinco na fase aquosa de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Extr Zn} = \left[\frac{[\text{Zn}] \times d \times v}{m \times a} \right] \times 100$$

Onde:

[Zn]: concentração de zinco em g/L;

d: fator de diluição;

v: volume total da garrafa em L;

m: massa de esfarelita adicionada em g;

a: porcentagem de zinco no minério

3.9- Análise da expressão gênica por *Quantitative Real Time* – PCR (qPCR)

3.9-1- Extração do RNA total

As membranas contendo a população bacteriana obtidas após a filtração das amostras do biorreator de lixiviação e a cepa pura *A. ferrooxidans* foram utilizadas para extração de RNA total. Inicialmente as membranas foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™]) com auxílio de vortex durante 1 minuto na velocidade máxima com intervalo de 30 segundos de repouso em banho de gelo por 3 vezes. O homogeneizado foi transferido para tubos *ependorf* de 1,5 mL e incubado durante 40 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma - St. Louis, MO, USA) para cada 1 mL de TRIzol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente com auxílio de um vortex. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 xg a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo seguido da adição de volume equivalente de etanol 70% (preparado com água livre de RNAses) e homogeneizado suavemente por inversão do tubo, por três vezes, para a precipitação do RNA. A seguir o RNA total foi purificado com o kit *NucleoSpin* (Macherey-Nagel) conforme as instruções do fabricante. A integridade da preparação foi avaliada em gel de agarose/formaldeído. O grau de pureza e a quantificação dos RNAs foram determinadas utilizando o aparelho NanoDrop (GE). A pureza da preparação foi determinada através da razão entre os comprimentos de onda 260/280 nm e 260/230 nm. As concentrações de RNA foram estimadas a partir da medida de absorbância a 260 nm. Uma unidade de absorbância a 260 nm corresponde aproximadamente a 40 µg/mL para RNA.

3.9-2- Oligonucleotídeos Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes em estudo, foram baseados nas sequências de mRNA depositadas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e idealizados através da utilização do programa *Gene Runner* (Version 3.05), conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores referentes aos genes avaliados

Gene ID	Gene	Sigla	Primer	Tamanho (pb)
6877355	microcompartment protein	<i>mcomp1</i>	5' CGGGCGTCTTCGGTAGTATG3' 5' GATGCGTGTGAGCGTGTTG 3'	94
6877356	microcompartment protein	<i>mcomp2</i>	5' GCGATGATATGGGCGGCTAC 3' 5' TCGTGGGCGGTGGGTATGTC 3'	129
6877358	carboxysome peptide B	<i>carboxyB</i>	5' CTTTCGCATCGGTGAGTAC 3' 5' GCGTCGTCTCTGATCTCG 3'	81
6877359	carboxysome peptide A	<i>carboxyA</i>	5' GTAAGATCGCTCGGAAAGTC3' 5' CCGTGGGATGTGTTTCTG 3'	94
6877360	carboxysome shell carbonic anhydrase	<i>can</i>	5' ATCTGCGACAGGTTGTTG3' 5' CACGACTCAAGGTGTATCAG 3'	130
6877361	carboxysome structural protein	<i>csoS2</i>	5' CAGGTGCCATGTTTCATCTC 3' 5' CCCGCTAAGGTGAATGTAG3'	101
6877362	ribulose-bisphosphate carboxylase (short)	<i>rbcS</i>	5' CTGGCTCTGCGAGTAGTTG 3' 5' GTCAGTGGACACCGTTATTG 3'	100
6877363	ribulose bisphosphate carboxylase (long)	<i>rbcL</i>	5' GGCACGGTGGATGTGTAG 3' 5' GTATGAGCGGGCAGAGTTC3'	139
6878747	rusticyanin	<i>rtn</i>	5' GTCACCACTGACTTTCCC 3' 5' ACTCTGGATACCACATGG 3'	84
6878755	cytochrome c	<i>citc</i>	5' GGCAAGACGAACATAAGG 3' 5' AGGGCAAACCTGGCTCTAC 3'	135
NC_011761	16S ribossomal	<i>16Saferr</i>	5' TAGGCGGTACGTTAGGTC 3' 5' CCACCCTCTCCCATACTC 3'	130

3.9-3- Síntese de cDNAs

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando 1 µg de RNA total extraído e o Kit *High Capacity RT-PCR System* (*Applied Biosystems*), seguindo as recomendações dadas pelo fabricante. Para cada 1 µg de RNA total de cada uma das amostras, foram utilizados 2 µL de iniciadores randômicos (10x RT *Random primer*), 0,8 µL de dNTPs [25x dNTP Mix (100 mM)], 1 µL de transcriptase reversa (*Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) e água livre de RNase para um volume final de 10 µL.

A mistura foi incubada a 25°C durante 10 minutos, seguidos de 120 minutos a 37°C e 85° por 5 minutos, no termociclador (*Biocycler*, version 3.2). As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

3.9-4- Reação da PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Para análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações foram realizadas pelo kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em placas de 96 poços (MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate – Applied Biosystems) e seladas com adesivo óptico (MicroAmp[™] Optical Adhesive Film – Applied Biosystems) ao final do procedimento. Foram pipetados 3 µL dos iniciadores (na concentração de 2,5 µM) em triplicata e 7 µL de um mix de reação contendo 2 µL de cDNA diluído 5 vezes (com água livre de DNase) e 5 µL de SYBR[®] Green Master Mix, totalizando um volume de 10 µL reação em cada poço. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados, com o gene referência presente em todas as placas. Os valores de *baseline*, ciclos iniciais em que há pequenas alterações na fluorescência e que não são considerados, foram ajustados para a faixa de 3 a 15 ciclos. O valor de repórter normalizado (Rn) refere-se à relação entre a intensidade de fluorescência emitida pelo corante repórter (SYBR[®] Green) e a intensidade de fluorescência emitida pelo corante da referência passiva (ROX). O *threshold*, desvio padrão médio do repórter normalizado (Rn) para os ciclos iniciais da PCR, foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto da PCR e, portanto, fixado em 0,2 para todas as amostras, uma vez que se comparou o mesmo gene em diferentes grupos.

As análises foram realizadas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (ΔC_Q), o qual permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes analisados foi normalizada tomando como referência a expressão do gene referência. A reação de qPCR foi conduzida conforme programação padrão no aparelho ABI 7300, Applied Biosystems.

3.9-5- Curva de Eficiência dos Iniciadores

Para determinar as eficiências relativas da amplificação dos genes em estudo e do gene referência foram construídas curvas padrão para cada *amplicon* a partir de uma mesma amostra. O ensaio foi realizado em triplicata e a concentração dos iniciadores foi de 2,5 μ M. A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-log do valor de C_Q (eixo Y) em comparação ao *log* da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X). Foi utilizado o cDNA da amostra referência de *A. ferrooxidans* em cinco diluições seriadas até 1:1024.

O *slope* da curva padrão foi utilizado para estimar a eficiência de amplificação. O cálculo da estimativa da eficiência (E) foi obtido pela fórmula: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Os iniciadores foram considerados apropriados para avaliar a expressão gênica pelo sistema SYBR[®] Green quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%. Os valores de *baseline* foram ajustados para a faixa de 3 a 15 ciclos e o *threshold* fixado em 0,2 para todas as amostras.

3.9-6- Curva de Dissociação dos *Amplicons*

Para avaliar a possibilidade de formação de produtos inespecíficos durante os ciclos de amplificação determinou-se a curva de dissociação dos *amplicons*. Ao final dos 40 ciclos da qPCR, a temperatura foi elevada gradualmente de 60 à 95°C, mantendo-se por 15 segundos a cada 1°C de aumento. Na medida em que os *amplicons* desnaturaram, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR[®] Green foi reduzido e a temperatura em que metade do produto da PCR estava dissociada foi registrada. O gráfico resultante permitiu verificar se houve um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de temperatura de *melting* (T_m), específicas e dependentes do tamanho do fragmento e do conteúdo de GC (%GC). O T_m considerado foi acima de 80°C.

3.9-7- Análise estatística

A expressão relativa das proteínas envolvidas no operon do carboxissoma e da oxidação do ferro das quatro condições consideradas foi comparada pela análise da variância (ANOVA) por TWO-WAY e pós-teste de *Bonferroni*. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo programa PRISMA (*GraphPad Prism 5*).

4.Resultados e Discussão

4.1- Extração e Análise do Perfil Protéico do Biorreator de Lixiviação de Sulfeto de Zinco.

As amostras do biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco foram retiradas por filtração e as bactérias recuperadas por filtração conforme descrito em Materiais e Métodos seção 3.2. Após a recuperação das bactérias da membrana e subsequente preparo das amostras, descrito na seção 3.3, a amostra contendo aproximadamente 100 µg de proteínas foi submetida à análise em gel 1D com intuito de avaliar a integridade da preparação através do perfil eletroforético da amostra do biorreator de lixiviação. A figura 13 ilustra o perfil das proteínas em gel 1D da amostra biorreator. As proteínas mais abundantes da preparação estão indicadas por setas.

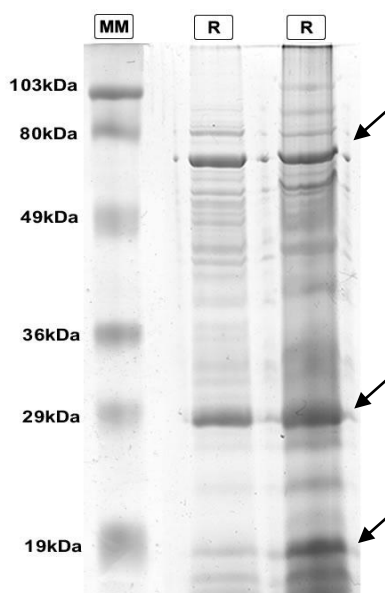


Figura 13: Perfil eletroforético da amostra biorreator. Eletroforese SDS-PAGE 12% da amostra biorreator, gel corado por *Coomassie Blue*. As setas indicam as proteínas mais abundantes da preparação. R: Amostra Biorreator. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

Após a observação do perfil das proteínas em gel 1D, as amostras foram submetidas à separação bidimensional a qual leva em consideração a diferença do ponto isoelétrico e a massa molecular das proteínas, fornecendo, portanto, maior capacidade de resolução em comparação ao perfil unidirecional. A figura 14 mostra o perfil eletroforético em gel bidimensional da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* (A) e da amostra biorreator (B). Podemos considerar que a metodologia de extração de proteínas e de separação bidimensional adotada foram eficientes, devido à presença de proteínas

distribuídas por toda a faixa de gradiente do gel da primeira dimensão (pH 3-10) apresentando ampla variedade de massa molecular.

Na literatura existem discussões a respeito do gradiente do gel da primeira dimensão para a eletroforese bidimensional de *A. ferrooxidans*. Segundo Bouchal e cols. (2006), a maioria das proteínas envolvidas no metabolismo energético e transporte de elétrons estão localizadas na porção básica do gel ($pI > 7$), contudo para a observação geral da grande maioria das proteínas relacionadas ao metabolismo de *A. ferrooxidans* são utilizados os géis de faixa de gradiente pH 3-10. Recentemente, Felício e cols. (2011) empregaram géis bidimensionais com faixa de pI variando entre 4 e 7, e obtiveram uma melhor separação das proteínas que apresentam pI nesta faixa.

Segundo Lacerda e Reardon (2009), existem vários desafios para serem superados no campo da proteômica relacionada aos microrganismos de áreas de tratamento de efluentes, o primeiro deles encontra-se na padronização de metodologias para a extração de proteínas destes microrganismos. Como descrito em Materiais e Métodos na seção 3.3, a extração das proteínas foi realizada através da utilização de dois tampões distintos, um contendo SDS para a análise do perfil protéico em eletroforese 1D e o outro contendo agentes caotrópicos (uréia/tiouréia) e detergente não iônico para separação por eletroforese bidimensional. Podemos observar bandas de mesma massa molecular nos dois géis, as bandas mais abundantes marcadas no gel 1D (figura 13) correspondem aos *spots* de número 1, conjunto 11, 12 e 13, e conjunto 19, 20 e 21, comprovando o mesmo perfil de proteínas da amostra.

Através da análise dos dois géis representados na figura 14, pode-se observar a semelhança do padrão de separação das proteínas entre a amostra cepa referência *A. ferrooxidans* e da amostra biorreator. Nesta figura as setas e os números indicam os *spots* semelhantes nos dois géis. Através deste resultado podemos inferir a presença da espécie bacteriana *A. ferrooxidans* no biorreator de lixiviação de sulfeto de zinco em estudo.

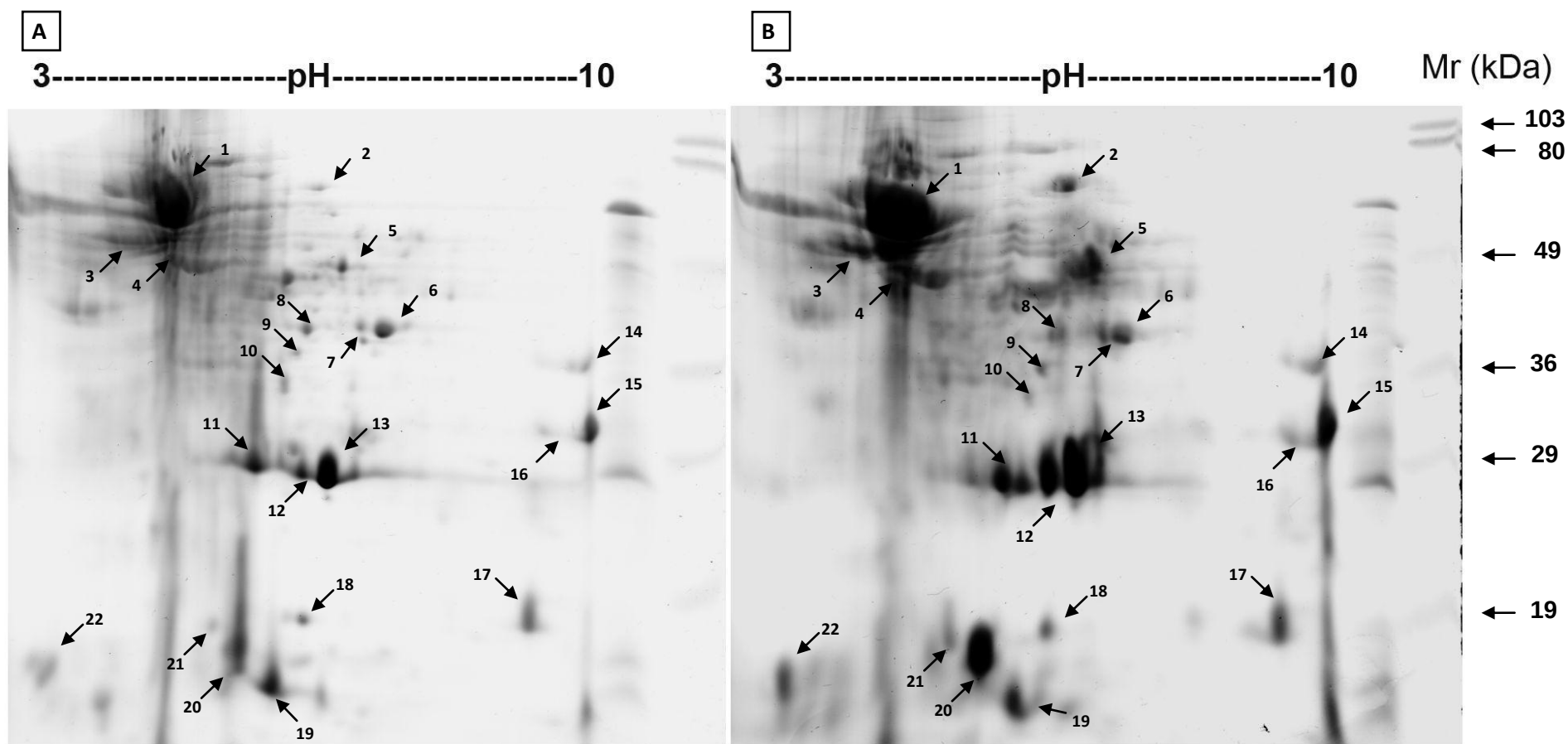


Figura 14: Eletroforese bidimensional da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* (A) e da amostra biorreator (B). Aproximadamente 100 µg dos extratos protéicos foram submetidos à isoeletrofocalização em gel pH 3-10, seguido da separação de acordo com a massa molecular, géis corados por *Coomassie Blue*. As setas e os números indicam spots que apresentaram mesmo ponto isoeletrico e mesma massa molecular nos dois géis. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

4.2- Identificação das proteínas indicadoras da população microbiana do reator de biolixiviação de sulfeto de zinco.

Com o objetivo de identificar as proteínas indicadoras da população microbiana presente no reator de biolixiviação de zinco, os *spots* mais abundantes do gel bidimensional foram submetidos ao protocolo de digestão em gel, descrito anteriormente na seção 3.6. Em seguida, os peptídeos foram analisados em espectrômetro de massas, porém espectros de boa qualidade necessários para a identificação das proteínas por *Peptide Mass Fingerprinting* não foram obtidos. Portanto, uma metodologia alternativa foi adotada para a identificação das proteínas mais abundantes da preparação. Após a recuperação das bactérias do filtro, o pellet bacteriano foi sonificado em tampão de extração e o extrato protéico obtido foi submetido à eletroforese SDS-PAGE. Com o intuito de concentrar as proteínas a corrida eletroforética ocorreu durante 5 minutos, permitindo que as proteínas penetrassem por apenas 1 cm no gel, como observado na figura 15.

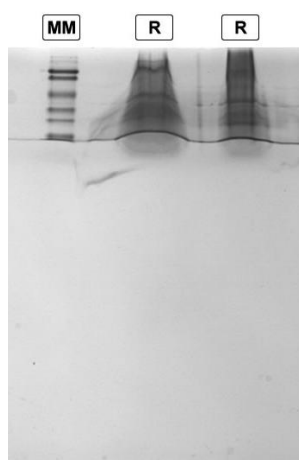


Figura 15: Perfil eletroforético da amostra do biorreator. A amostra do biorreator (R) foi submetida à eletroforese SDS-PAGE, a corrida ocorreu por durante 5 minutos com objetivo de concentrar as proteínas. MM: Marcador de massa molecular (BIORAD).

Após digestão em gel, os peptídeos foram identificados por espectrometria de massas por nano *electrospray* e a busca por similaridades realizada pelo programa Mascot. A tabela 3 apresenta o resultado do sequenciamento de 13 proteínas. Doze proteínas identificadas apresentaram homologia com proteínas de *A. ferrooxidans* e somente a proteína do carboxissoma (CsoS1) demonstrou identidade com a proteína da espécie *Prochlorococcus marinus* subsp. *marinus* str. CCMP1375. Esta espécie corresponde a uma cianobactéria unicelular marinha.

Tabela 3: Proteínas identificadas por espectrometria de massas para o reator de biolixiviação

Nº de Acesso (NCBIInr)	Identidade	Massa (kDa)	Homologia BLAST	Score
YP_002219156	Chaperonina GroEL	58,651	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	1.190
YP_002219548	Hidroperoxiredutase	22,534	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	80
YP_002220770	Porina fosfato seletiva (O e P)	42,225	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	251
BAC66780	Proteína de Membrana Externa OmpA-like	23,085	<i>A. ferrooxidans</i>	185
CAA07034	Citocromo Oxidase (subunidade II)	28,525	<i>A. ferrooxidans</i>	171
CAA07031	Citocromo C	52,889	<i>A. ferrooxidans</i>	86
CAA07038	Rusticianina	16,597	<i>A. ferrooxidans</i>	85
NP_874943	Proteína do Carboxissoma (CsoS1)	10,634	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> str. CCMP1375	216
YP_002219822	Proteína de Microcompartimento	9,988	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	416
YP_002219823	Proteína de Microcompartimento	9,974	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	383
YP_002219821	Proteína de Microcompartimento	11,345	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	249
YP_002219828	Ribulose Bifosfato Carboxilase (RuBisCO)	12,916	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	130
YP_002220640	Proteína Hipotética Lferr_2230	22,830	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	80

No intuito de confirmar, através de dados proteômicos, a presença de *P. marinus* na amostra do biorreator, a sequência da proteína do carboxissoma (CsoS1) foi submetida a alinhamento global via BLASTp. A sequência da proteína de microcompartimento de *A. ferrooxidans* apresentou identidade de 92% e *e-value* de $2e^{-36}$ com a sequência da proteína do carboxissoma (CsoS1) de *P. marinus*. O alinhamento obtido através do programa CLUSTALW2, observado na figura 16, também comprova a semelhança entre estas sequências. Entretanto, a sequência de aminoácidos identificados que difere a sequência da proteína do carboxissoma (CsoS1), indicado na figura 16 por um retângulo, não apresentou um *e-value* confiável (8,8) e portanto, a presença da espécie *P. marinus* no biorreator de lixiviação de zinco não foi considerada.

```

Microcompartimento(2)  MANVS-GVALGMIETRGLVPAIEAADAMTKAAEVRLVGRQFVGGGYVTVLVRGETGAVNA 59
Microcompartimento(3)  MANVS-GVALGMIETRGLVPAVEAADAMTKAAEVRLVGRQFVGGGYVTVLVRGETGAVNA 59
Microcompartimento(1)  MINVS-GVALGMIETRGLVPAIEAADAMTKAAEVRLVGRQFVGGGYVTVLVRGETGAVNA 59
Ptna Carboxissoma(CsoS2) MANETMGIALGMIETRGLVPAIEAADAMTKAAEVRLIGEFVGGGYVTVLVRGETGAVNA 60
                        * * : *:*****:*****:***:*****
Microcompartimento(2)  AVRAGADACERVGDGLVAAHIIARVHSEVENILPSSPVE----- 98
Microcompartimento(3)  AVRAGADACERVGDGLVAAHIIARVHSEVENILPSSPVE----- 98
Microcompartimento(1)  AVRAGADACERVGDGLVAAHIIARVHSEVENILPKTPDAGDSGLDGVVSQSLS 112
Ptna Carboxissoma(CsoS2) AVRAGADACERVGDGLVAAHIIARPHREVEPALGNGNFLGQKD----- 103
                        ***** * *** * .

```

Figura 16: Alinhamento entre as sequências das proteínas de microcompartimentos e da proteína do carboxissoma (CsoS2) de *Prochlorococcus marinus*. Os peptídeos tripticos indicados em vermelho foram identificados por MS. O peptídeo no retângulo é específico da proteína do carboxissoma (CsoS2) de *P. marinus*.

A identificação de uma única espécie no biorreator pode ser explicada pelo tipo de biolixiviação. Os tanques de biolixiviação contínuos possuem condições de crescimento homogêneas, já que são operados com faixas de pH e temperatura fixas e com aeração controlada. Porém, condições como a concentração de metais e o pH, variam de acordo com a oxidação mineral, gerando um impacto significativo na diversidade e no número de espécies (Okibe e cols., 2003). Sendo assim, a homogeneidade dos biorreatores contínuos resulta num nicho ecológico limitado, que tende a ser dominado por poucas espécies (Rawlings e Johnson, 2007).

De acordo com a anotação do *Gene Ontology* as proteínas identificadas foram divididas em 7 categorias de processos celulares. A tabela 4 mostra os processos celulares nos quais as proteínas identificadas estão envolvidas e o número de acesso no *Gene Ontology* (GO).

Tabela 4: Classificação de acordo com a anotação do *Gene Ontology* das proteínas identificadas por MS

Proteína	Processo Celular	GO
Proteína de Microcompartimento	Processo Metabólico	0008152
Proteína de Microcompartimento		
Proteína de Microcompartimento		
Proteína do Carboxissoma (CsoS1)		
Ribulose Bifosfato Carboxilase (RuBisCO)	Fixação de Carbono	0015977
Citocromo Oxidase (subunidade II)	Cadeia de Transporte de Elétrons	0022900
Citocromo C		
Rusticianina		
Proteína de Membrana Externa OmpA-like	Proteínas de Transporte	0006810
Chaperonina GroEL	Enovelamento de Proteínas	0006457
Hidroperoxiredutase	Remoção de Radicais Superóxido	0019430
Proteína Hipotética Lferr_2230	Processo Celular	0008150
Porina fosfato seletiva (O e P)		

As chaperoninas são conhecidas por mediar reações de enovelamento através do bloqueio da associação de proteínas desnaturadas. Segundo Segal e Ron (1998), a síntese de groEL é induzida por estresse, como o choque térmico ou a presença de metais pesados. Matuszewska e cols. (2008) demonstraram que certas chaperoninas podem proteger células de *Escherichia coli* de danos oxidativos causados pelo cobre. A presença de alto número de genes de reparo de DNA e proteínas evidentes nas sequências gênicas dos acidófilos extremos tem sido relacionada a problemas associados a homeostase em pH ácido, já que as biomoléculas danificadas pelo pH ácido necessitam de um reparo rápido e eficiente (Baker-Austin e Dopson, 2007).

As proteínas de membrana externa da família OmpA apresentam papel na manutenção da integridade da superfície bacteriana de *A. ferrooxidans* (Chi e cols., 2007). Amaro e cols. (1991) observaram o aumento da expressão das proteínas da família Omp quando o ambiente fica mais ácido e há maior seletividade dos íons que entram na célula.

A proteína antioxidante identificada pertence à família de peroxidases, altamente conservadas de procariotos a eucariotos (Felício e cols., 2011). A enzima

hidroperoxidoreductase é considerada a proteína antioxidante mais abundante em *Helicobacter pylori*, e sua função é proteger a célula contra o ambiente hiperoxidativo por meio da redução dos hidroperóxidos orgânicos tóxicos (Chuang e cols., 2006).

A espécie *A. ferrooxidans* obtém energia através da oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} ou de compostos de enxofre a sulfato. Este metabolismo quimiolitotrófico, que permite a solubilização dos minerais, é o que torna este microrganismo tão importante industrialmente (Rawlings, 2001). Portanto, a identificação, o isolamento e a regulação dos genes essenciais aos sistemas de oxidação de ferro e enxofre têm levantado interesse de muitos pesquisadores (He e cols., 2006). A cadeia de transporte de elétrons durante a oxidação do ferro tem sido bem estudada e a maioria dos componentes já foi identificada, como pode ser observado na figura 6. Com relação à oxidação do enxofre ainda são necessários estudos para a identificação completa de todos os componentes da via (He e cols., 2006).

A maioria dos estudos das proteínas envolvidas com o transporte de elétrons avalia os níveis de expressão destas proteínas em meio de cultura diferenciais (Felício e cols., 2003; Ramírez e cols., 2004; Bruscella e cols., 2006; Carlos e cols., 2008; Felício e cols., 2011). Ramírez e cols. (2004) analisaram a expressão de proteínas durante o crescimento de *A. ferrooxidans* em ferro, compostos de enxofre ou sulfetos metálicos e concluíram que a síntese de rusticianina é alterada quando a bactéria é cultivada com calcopirita. Carlos e cols. (2008) observaram o decréscimo da expressão dos genes do operon *rus* quando as células são expostas a calcopirita por 24 horas. A literatura não traz estudos relacionando estes genes à presença de zinco.

Quatro proteínas identificadas estão diretamente envolvidas com a formação de uma estrutura protéica bacteriana denominada carboxissoma. Os carboxissomas são complexos multiproteicos icosaédricos, que contém em seu interior as enzimas anidrase carbônica (CA) e a ribulose 1,5-bifosfato carboxilase monooxigenase (RuBisCO) e portanto, estão relacionados à fixação do CO_2 . Desta forma, acredita-se que os carboxissomas representam uma estrutura primitiva para segregação e compartimentalização de atividade enzimática no contexto da célula procariota (Cheng e cols., 2008).

O mecanismo proposto para a concentração de carbono pelos carboxissomas, ilustrado na figura 17, inicia-se com a concentração de íon bicarbonato dentro da célula por transportadores na membrana celular. Acredita-se que o íon bicarbonato entra no carboxissoma através de poros, que possuem potencial eletrostático positivo devido à

presença de resíduos de lisina e arginina, característicos das proteínas que compõe a estrutura do carboxissoma. No interior do carboxissoma, a anidrase carbônica converte íon bicarbonato a CO_2 , o qual é então utilizado pela RuBisCO, juntamente com ribulose 1,5-bifosfato, para a formação de duas moléculas de 3-fosfoglicerato (Yeates e cols., 2008).

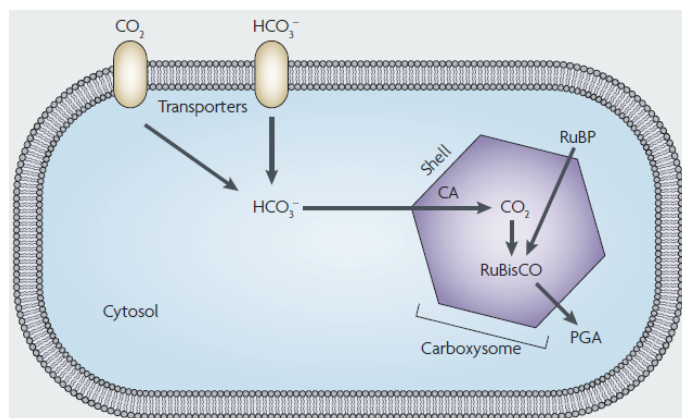


Figura 17: Esquema do mecanismo proposto para a concentração de carbono pelos carboxissomas . Observar a estrutura icosaédrica do carboxissoma em roxo (Yeates e cols., 2008).

Existem duas classes de carboxissomas, α e β , que diferem pouco e estão relacionadas a grupos filogenéticos de RuBisCO distintos. Os carboxissomas α estão associados com a RuBisCO 1A, que é encontrada em microrganismos quimioautotróficos e α cianobactérias, enquanto que os carboxissomas β estão associados com a RuBisCO 1B, que é encontrada em β cianobactérias (Badger e Price, 2003). Os carboxissomas α de *Halothiobacillus neopolitanus* já foram bem estudados e seus componentes foram purificados e identificados (Cannon e Shively, 2002). Cerca de 15 polipeptídeos foram identificados, incluindo CbbL, CbbS, CsoS2A, CsoS2B, CsoS3, CsoS1A, CsoS1B, CsoS1C, CsoS4A e CsoS4A. CbbL e CbbS correspondem às subunidades maior e menor da RuBisCO. CsoS1A, CsoS1B, CsoS1C apresentam seqüências relacionadas e estão envolvidas com a formação da estrutura icosaédrica. CsoS2A e CsoS2B também estão relacionados com a estrutura da partícula sendo codificadas pelo mesmo gene, porém diferem no grau de glicosilação. So e cols. (2002) identificaram a proteína CsoS3 como uma nova variante de anidrase carbônica. Em *A. ferrooxidans* ATCC23270, a regulação da expressão de RuBisCO e dos genes do

carboxissoma através de experimentos de q-PCR demonstraram que todos estes genes são transcritos como uma unidade única e pode ser considerado um operon (Esparza e cols., 2010)

A figura 18 ilustra a sequência do genoma de *A. ferrooxidans*, na qual os genes codificadores das proteínas identificadas por MS estão inseridos. As proteínas de microcompartimento estão representadas como Lferr_1381, Lferr_1382 e Lferr_1383; e a proteína estrutural do carboxissoma – CsoS2 como Lferr_1387. Após a análise desta região do genoma de *A. ferrooxidans* observamos outros genes que também estão relacionados ao carboxissoma, e a partir deles foram confeccionados oito pares de *primers*, descritos em Materiais e Métodos na seção 3.9.2, para a quantificação dos níveis de expressão por qPCR.

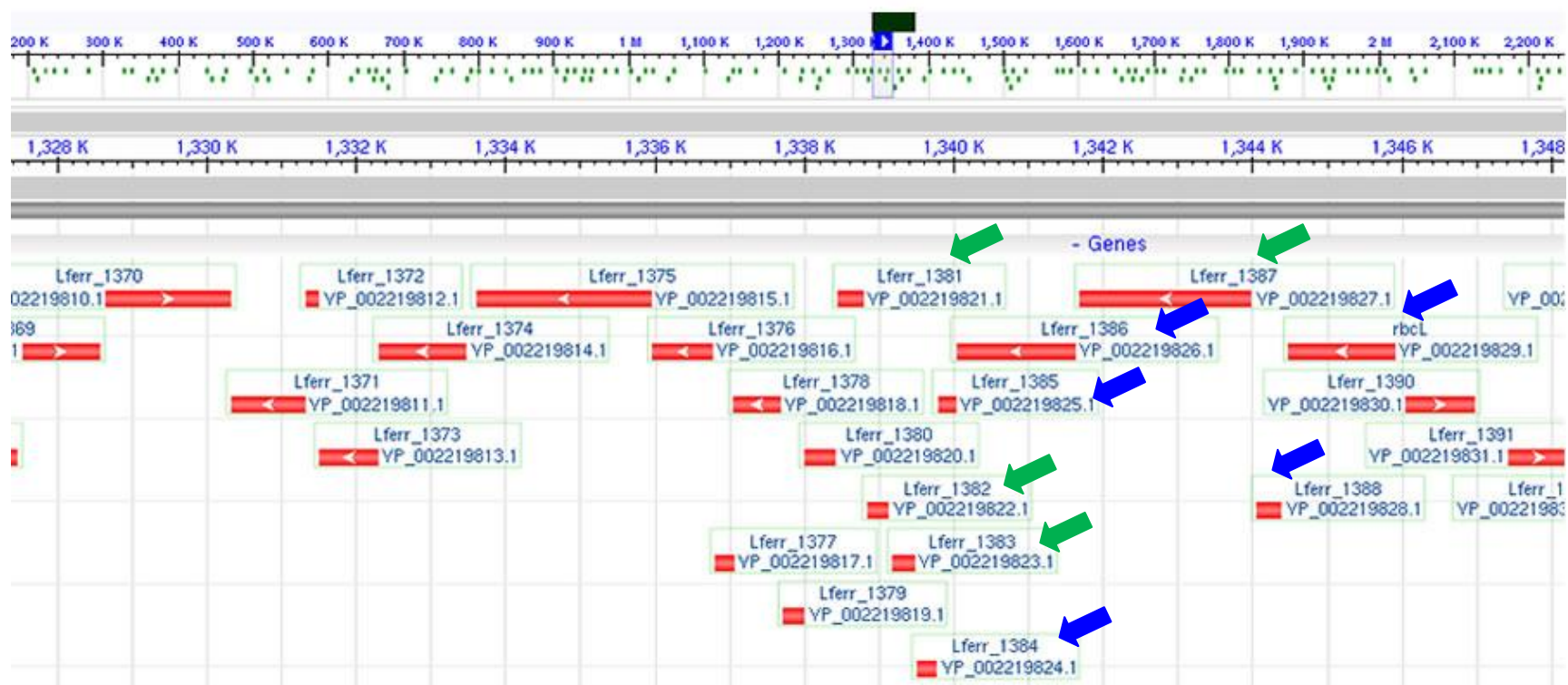


Figura 18: Representação de Sequência Genômica de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (NC_011206). As setas verdes indicam as proteínas que foram identificadas por MS: proteínas de microcompartimento (Lferr_1381, Lferr_1382 e Lferr_1383) e proteína estrutural do carboxissoma – CsoS2 (Lferr_1387), e as azuis, os genes utilizados para a confecção dos primers: *carboxyB* (Lferr_1384), *carboxyA* (Lferr_1385), anidrase carbônica (Lferr_1386), e RuBisCO (Lferr_1388, Lferr_1389).

4.3- Ensaio de Biolixiviação de Sulfeto de Zinco em Garrafas

A abordagem mais comum empregada para adaptação de células de *A. ferrooxidans* a altas concentrações de íons metálicos são os repiques seriados, no qual as bactérias são cultivadas em meio contendo concentrações crescentes dos íons metálicos. Portanto, inicialmente as amostras cepa referência *A. ferrooxidans* e biorreator foram repicadas em concentrações crescentes de esfarelita (1%, 5%, 7,5% e 10%) para promover a adaptação das células bacterianas ao minério concentrado. Após o período de adaptação as amostras foram cultivadas no sistema em garrafas para avaliar o potencial de extração de zinco.

Os ensaios de biolixiviação em garrafas foram conduzidos em sistema ‘rolling bottle’ sob quatro condições de cultivo: 1- Sem minério; 2- Com minério (esfarelita 10%); 3- Sem minério e com carbonato de cálcio; 4- Com minério (esfarelita 10%) e com carbonato de cálcio. O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente através do potencial de oxidação (Eh) do meio e considerado satisfatório no valor de Eh igual a 600 mV. A figura 19 mostra a evolução do Eh das amostras cultivadas em meio com e sem minério. Nas amostras cultivadas em meio sem o minério foi observado crescimento bacteriano em no máximo quatro dias após o inóculo (figura 19-A), enquanto que nas amostras cultivadas na presença de esfarelita o crescimento foi obtido somente 50 dias após o inóculo (figura 19-B).

Segundo Haghshenas e cols. (2009) existem quatro possíveis razões para a inatividade ou retardo da atividade bacteriana observada em polpas com alta concentração de sulfetos metálicos: (i) a presença de metais pesados tóxicos em solução; (ii) a transferência insuficiente de oxigênio e dióxido de carbono; (iii) a redução da população bacteriana em suspensão, devido à ligação das células às partículas minerais; (iv) os danos às células bacterianas devido ao atrito da membrana bacteriana às partículas sólidas. Kondratyeva e cols. (1995) consideraram que o fator mais importante causador do retardo de atividade microbiana é a toxicidade causada pela alta concentração de Zn^{2+} existente durante a biolixiviação de esfarelita.

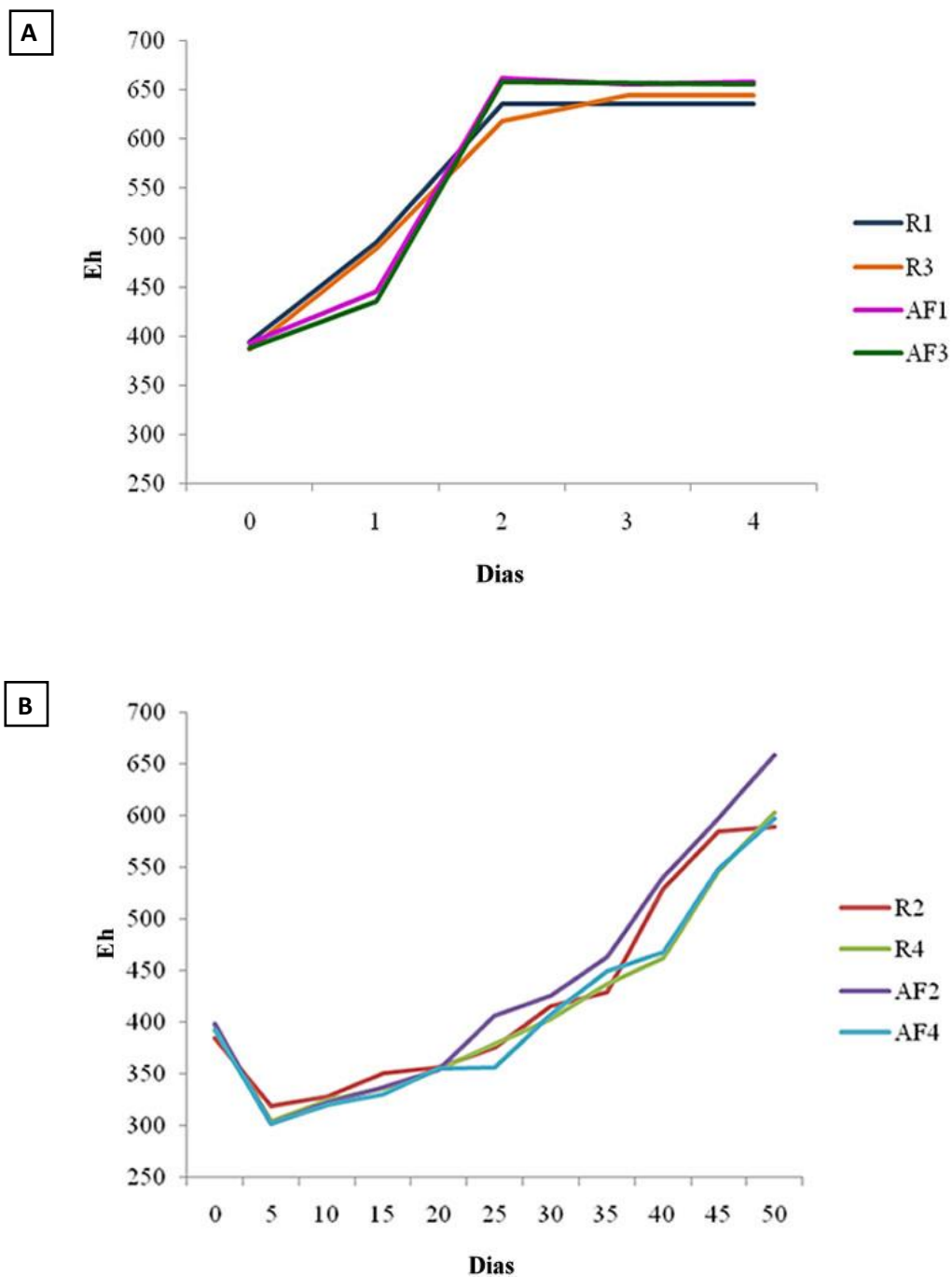


Figura 19: Potencial de oxidação (Eh) das amostras cultivadas em (A) meio sem minério durante 4 dias e (B) meio com minério durante 50 dias. R1: biorreator sem minério. R3: biorreator sem minério e com carbonato de cálcio. AF1: *A. ferrooxidans* sem minério. AF3: *A. ferrooxidans* sem minério e com carbonato de cálcio. R2: biorreator com minério. R4: biorreator com minério e com carbonato de cálcio. AF2: *A. ferrooxidans* com minério. AF4: *A. ferrooxidans* com minério e com carbonato de cálcio.

Após o crescimento em presença de esfarelita as amostras foram submetidas à análise do percentual de extração de zinco e a contagem de células bacterianas em câmara de *Neubauer*. A tabela 5 resume os resultados destas análises. Podemos observar que não houve grande diferença no percentual de extração de zinco das amostras *A. ferrooxidans* e biorreator crescidas em meio com ou sem carbonato de cálcio. Portanto, podemos considerar que estas amostras apresentaram potenciais de biolixiviação equivalentes. Com relação ao número de células bacterianas, a amostra *A. ferrooxidans* apresentou um número de células, aproximadamente, 100x maior do que a amostra biorreator. Entretanto a amostra *A. ferrooxidans* apresentou mesmo potencial de extração de zinco que a amostra biorreator, o que pode ser atribuído à adaptação parcial desta amostra ao zinco. A figura 20 mostra a imagem obtida pelo microscópio óptico com aumento de 100x das amostras cepa referência e biorreator, nas quais podemos observar a forma de bastonetes, característicos de *A. ferrooxidans*, na maioria das células bacterianas.

Tabela 5: Número de células bacterianas por mL e percentual de extração de zinco após 50 dias de cultivo. R2: amostra biorreator com minério. R4: amostra biorreator com minério e carbonato de cálcio. AF2: cepa referência *A. ferrooxidans* com minério. AF4: cepa referência *A. ferrooxidans* com minério e carbonato de cálcio.

Amostra	Nº de células /mL	Extração de Zinco (%)
R2	$2,23 \times 10^7$	49,93
R4	$2,7 \times 10^7$	51,2
AF2	$2,58 \times 10^9$	50,73
AF4	$3,2 \times 10^9$	52,78

Outro ponto crucial para o monitoramento da atividade bacteriana é o critério adotado para definir quando a célula está realmente adaptada à alta concentração do minério. Xia e cols. (2008) ponderaram que as células de *A. ferrooxidans* estão adaptadas à calcopirita quando a concentração de células alcança o valor de 10^7 células/mL. O critério de adaptação utilizado no estudo de Astudillo e Acevedo (2008) foi a quantidade de ferro e cobre em solução e a razão $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ menor que 1,0, indicando eficiente biooxidação do Fe^{2+} . Neste trabalho consideramos as células

adaptadas à presença de esfarelita 10% no meio quando o Eh da solução alcançava 600 mV, indicando assim o crescimento bacteriano satisfatório.

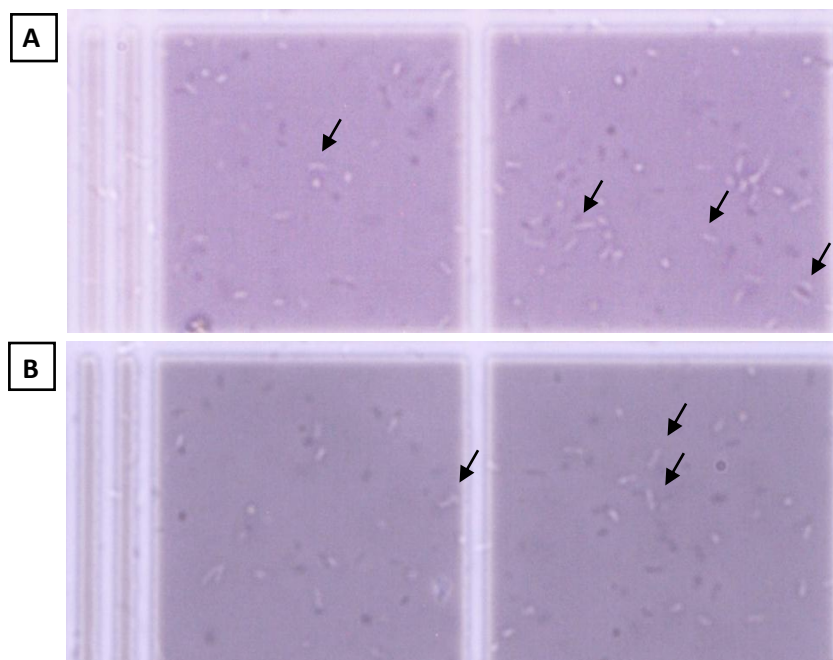


Figura 20: Foto de microscopia ótica com aumento de 1000x da amostra *A. ferrooxidans* (A) e da amostra biorreator (B). As setas indicam células bacterianas na forma de bastonetes.

4.4- Análise da Expressão dos Genes do Carboxissoma e do Metabolismo Energético por qPCR

A extração do RNA total foi realizada com auxílio do kit *NucleoSpin* e a integridade da preparação foi analisada em gel agarose/formaldeído, como mostrado na figura 21. Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados 1µg do RNA total.

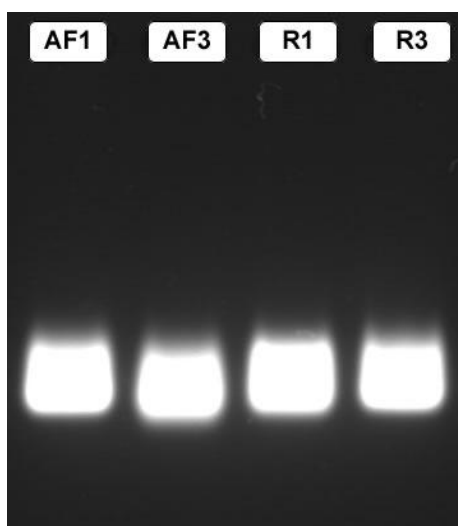


Figura 21: Extração de RNA total. Gel de agarose/formaldeído contendo 5µg de RNA total. AF1: *A. ferrooxidans* sem minério. AF3: *A. ferrooxidans* sem minério e com carbonato de cálcio. R1: biorreator sem minério. R3: biorreator sem minério e com carbonato de cálcio.

O perfil de expressão dos genes relacionados ao carboxissoma e ao metabolismo energético foi realizado utilizando a técnica de qPCR, conforme descrito em Materiais e Métodos. O RNA total da amostra do biorreator e da cepa referência *A. ferrooxidans* em quatro condições de cultivo foi utilizado para determinar os níveis de mRNA referentes aos genes do carboxissoma e do metabolismo energético, sendo avaliados em triplicata biológica e triplicata técnica. Os resultados dos níveis de RNA foram determinados em relação ao gene 16S ribossomal de *A. ferrooxidans*, utilizado como gene referência através do método do ΔC_q .

A figura 22 mostra o nível de expressão dos genes rusticianina (fig. 22-A) e citocromo c (fig. 22-B) para as amostras *A. ferrooxidans* e biorreator sob as condições 1 (sem minério) e 2 (com minério). Podemos observar que para a amostra cepa referência *A. ferrooxidans* em presença de esfarelita, a expressão de rusticianina diminuiu cerca de seis vezes. Nestas mesmas condições, a expressão de rusticianina na amostra biorreator aumentou seis vezes. Se compararmos a expressão de rusticianina sob a condição 1 entre as amostras, podemos considerar uma expressão 5 vezes menor na amostra biorreator, e sob a condição 2 uma expressão 7 vezes maior. Sendo assim, podemos considerar que as duas amostras respondem de forma diferente à presença de zinco.

Como pode ser observado na figura 22-B, o perfil de expressão do citocromo c é similar entre as amostras *A. ferrooxidans* e biorreator em presença de esfarelita. A expressão de citocromo c diminui nas duas amostras, aproximadamente três vezes na amostra *A. ferrooxidans* e cerca de 22 vezes na amostra biorreator. Entretanto, há diferença estatística entre a expressão de citocromo c sob a condição 1 da amostra cepa

referência e biorreator. Vale ressaltar que o número de células bacterianas obtido na amostra cepa referência é cerca de 100 vezes maior que o número de células do biorreator e esta diferença pode afetar o repertório de RNA, e consequentemente comprometer os níveis de expressão gênica.

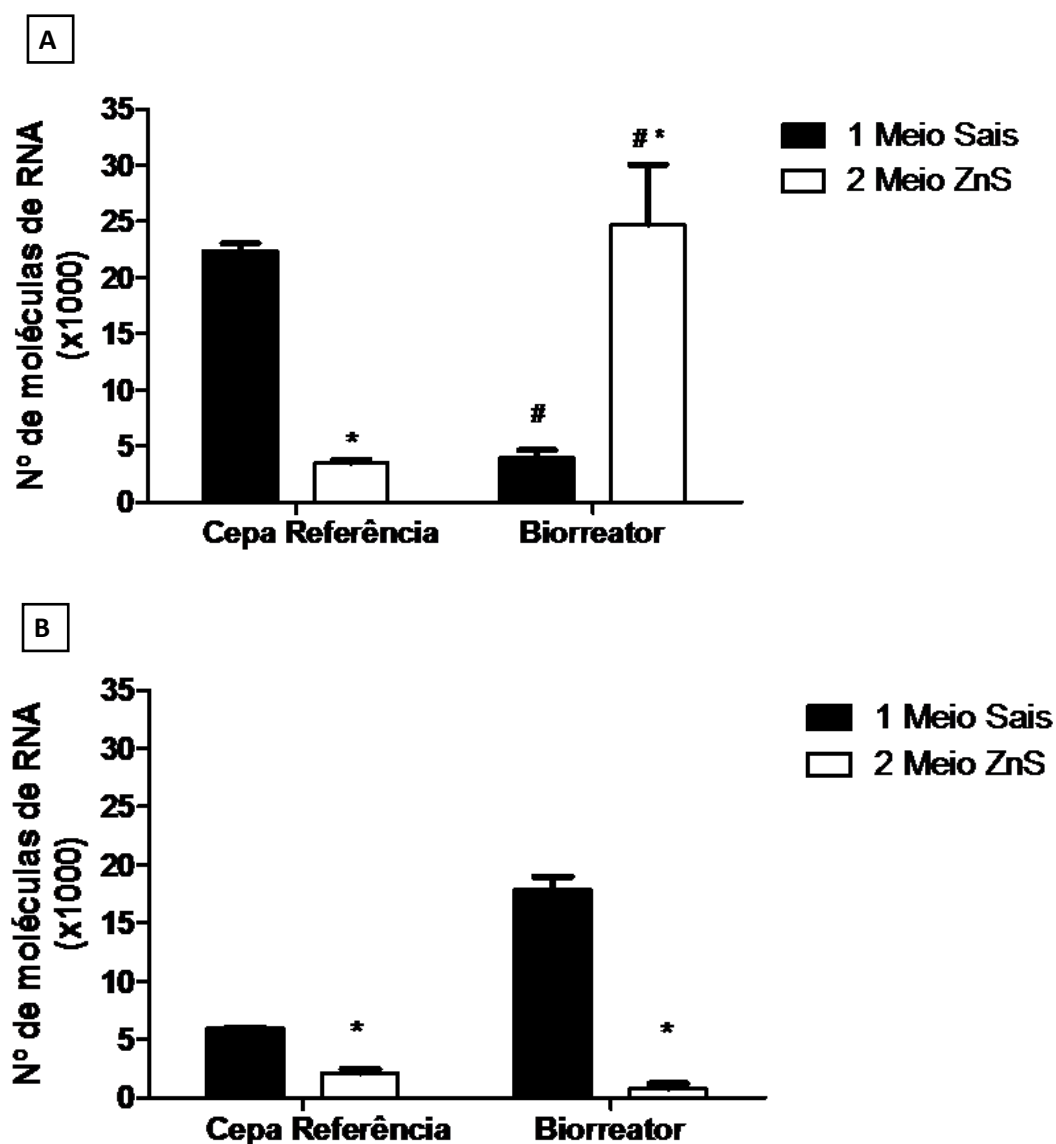


Figura 22: Número de moléculas de RNA dos genes rusticianina (A) e citocromo C (B) da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* e amostra reator nas condições 1 (sem minério) e 2 (com minério). O gene 16S ribossomal de *A. ferrooxidans* foi utilizado como gene referência e o número de moléculas determinado pelo método do ΔCq . Os resultados foram multiplicados por 1000. A análise estatística foi realizada utilizando o pós teste de Bonferroni no programa Prisma com $P < 0,05$. As diferenças estatísticas foram representadas pelos sinais: *: diferença estatística em relação à condição 1. #: diferença estatística sob mesma condição em relação a amostras cepa referência.

Para as análises do nível de expressão dos genes relacionados ao carboxissoma foram consideradas apenas as amostras cepa referência *A. ferrooxidans*, visto que não obtivemos uma preparação de RNA da amostra biorreator qualitativa e quantitativamente viável. Segundo o guia MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) a qualidade do RNA é essencial para o desenvolvimento de reações de alta reprodutibilidade.

A figura 23 mostra o nível de expressão dos genes relacionados à estrutura do carboxissoma (fig. 23-A) e das enzimas presentes no carboxissoma (fig. 23-B) sob as quatro condições avaliadas neste trabalho. Somente o gene que codifica a proteína estrutural carboxyB não obteve nenhuma diferença estatística nas quatro condições avaliadas. Quando se compara a condição 1, sem minério, e a condição 2, com esfarelita (figura 23), observa-se o aumento na expressão dos genes que codificam as proteínas de microcompartimento (*mcomp1*, *mcomp2*), a proteína estrutural do carboxissoma (*csoS2*) e a diminuição da expressão do gene *carboxyA*. A presença de carbonato de cálcio (condição 3) determinou a diminuição de cerca de oito vezes da expressão de *carboxyA* e aumentou duas vezes a expressão da proteína estrutural do carboxissoma (*csoS2*) comparado com a condição 1, sem minério. Os microrganismos cultivados em presença do minério e de carbonato de cálcio (condição 4) apresentaram redução significativa dos níveis de expressão da maioria dos genes estudados (*mcomp1*, *mcomp2*, *carboxyA*, *csoS2*).

Com relação às enzimas relacionadas ao carboxissoma (Fig. 23-B), não houve nenhuma variação significativa na expressão da enzima anidrase carbônica (*can*) nas condições avaliadas. A presença da esfarelita (condição 2) determinou o aumento da expressão dos genes que codificam a cadeia menor (*rbcS*) e a cadeia maior de rusticianina (*rbcL*). Como nos genes relacionados à estrutura do carboxissoma, a presença de carbonato de cálcio e esfarelita reduziram significativamente a expressão dos genes da rusticianina.

Segundo Esparza e cols. (2010), o regulador de transcrição CbbR pode regular a expressão de RuBisCO e dos genes da estrutura do carboxissoma, já que são transcritos como uma unidade única. Sendo assim, era esperado que todos os genes avaliados apresentassem o mesmo perfil de expressão gênica, porque estão sob a regulamentação de um único promotor. Entretanto, observamos certa variação na expressão destes genes.

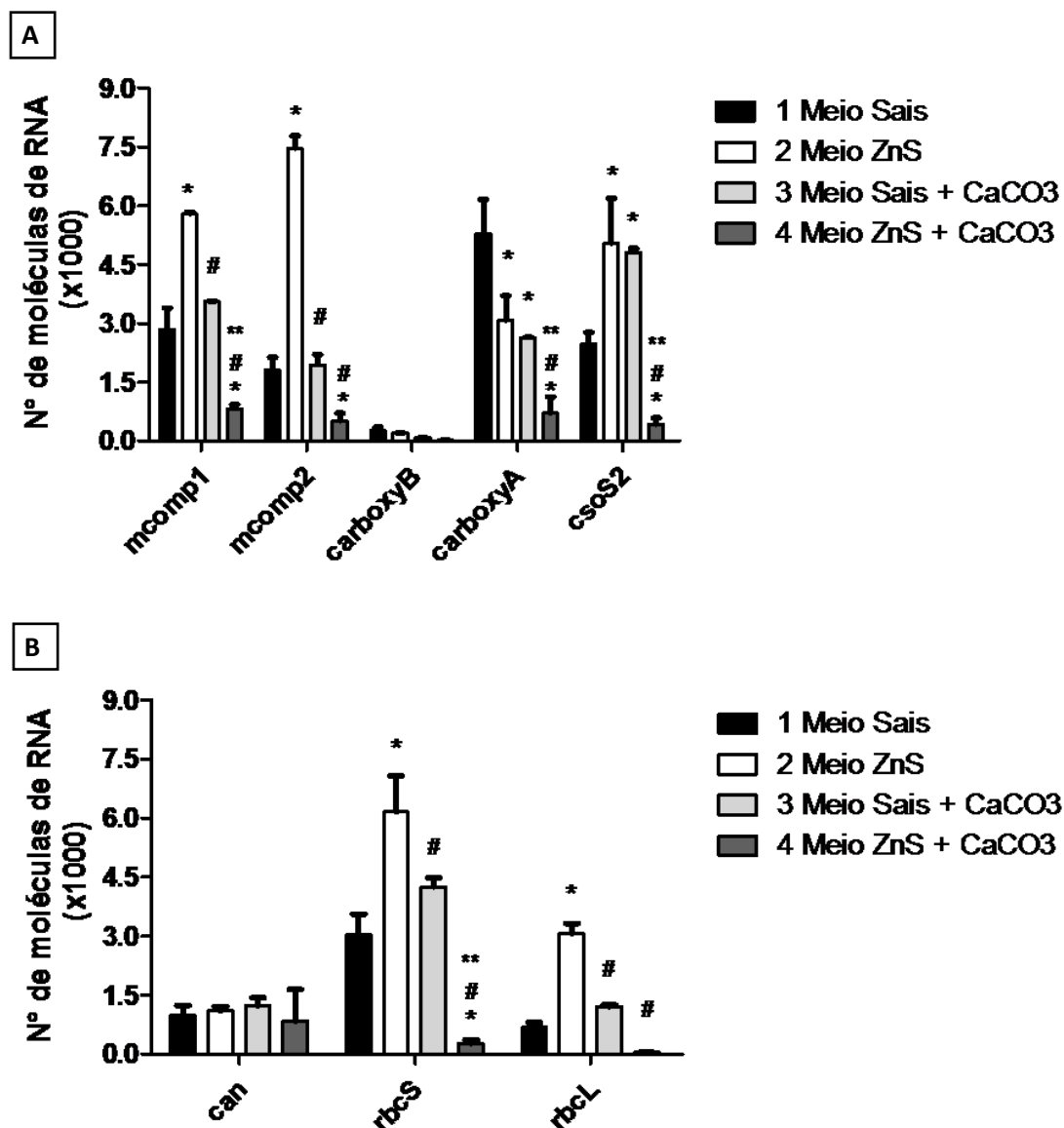


Figura 23: Número de moléculas de RNA dos genes estruturais do carboxissoma (A) e das enzimas anidrase carbônica (can) e RuBisCO (B) da amostra cepa referência *A. ferrooxidans* nas condições 1 (sem minério), 2 (com minério), 3 (sem minério e com carbonato de cálcio) e 4 (com minério e com carbonato de cálcio). O gene 16S ribossomal de *A. ferrooxidans* foi utilizado como gene referência e o número de moléculas determinado pelo método do ΔCq . Os resultados foram multiplicados por 1000. A análise estatística foi realizada utilizando o pós teste de Bonferroni no programa Prisma com $P < 0,05$. As diferenças estatísticas foram representadas pelos sinais: *: diferença estatística em relação à condição 1. #: diferença estatística em relação à condição 2 e **: diferença estatística em relação à condição 3.

5. Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- O biorreator de lixiviação de zinco em sistema contínuo possui população microbiana dominante composta pela espécie *A. ferrooxidans* confirmada pela análise comparativa dos géis bidimensionais e pela identificação das proteínas por espectrometria de massas.
- A alta concentração de zinco levou à queda de expressão de citocromo c.
- A presença de zinco e carbonato de cálcio no meio diminuiu a expressão dos genes estruturais dos carboxissoma e das enzimas presentes nestas estruturas.
- Resumidamente, a alta concentração de zinco alterou o metabolismo microbiano, diminuindo a expressão de componentes de vias importantes para fixação de CO₂ e transferência de elétrons durante a oxidação do ferro.

6.Referências Bibliográficas

- Amaro, A.M.; Chamorro D.; Seeger, M.; Arredondo, R.; Peirano, I.; Jerez, C.A. (1991). Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, v. 173 (2), p. 910-915.
- Appia-Ayme, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.L. (1999). Characterization of an operon encoding two c-types cytochromes, an aa₃-type cytochrome oxidase, an rusticianina in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Applied Environmental Microbiology*, v. 65, p. 4781-4787.
- Azevedo, R.D. (2008). Diversidade Microbiana de Biorreatores de Lixiviação de Sulfeto de Zinco em Sistema Contínuo (autor). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Badger, M.R. e Price, G.D. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Bot*, v. 54, p. 609-622.
- Baker-Austin, C. e Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiology*, v. 15, p. 165-171.
- Baker, B.J.; Banfield, J.F. (2003). Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Environmental Microbiology Ecology*, v. 44, p. 139-152.
- Bond, P. L., Druschel, G. K.; Banfield, J. F. (2000). Comparison of acid mineral drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4962-4971.
- Boon, M. (1996). Theoretical and experimental methods in the modelling of bio-oxidation kinetics of sulphide minerals. PhD, Delft University of Technology.
- Boon, M. (2001). The mechanism of 'direct' and 'indirect' bacterial oxidation of sulphide minerals. *Hydrometallurgy*, v. 62 (1), p. 67-70.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Review*, v. 20, p. 591–604.
- Bouchal, P.; Zdráhal, Z.; Helánová, S.; Janiczek, O.; Hallberg, K.B.; Mandl, M. (2006). Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur- oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics*, v. 6, p. 4278-4285.
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Review*, v. 20, p. 591–604.
- Bruscella, P.; Appia-Ayme, C.; Levicán, G.; Ratouchniak, J.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S.; Bonnefoy, V. (2007). Differential expression of two *bc1* complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. *Microbiology*, v. 153, p. 102-110.
- Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T. (2009).

- The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, v.55:4, p. 611-622.
- Cannon, G.C.; Baker, S.H.; Soyer, F.; Johnson, D.R.; Bradburne, C.E.; Mehlman, J.L.; Davies, P.S.; Jiang, Q.L.; Heinhorst, S.; Shively, J.M. (2003). Organization of carboxysome genes in the thiobacilli. *Current Microbiology*, v. 46, p. 115-119.
- Cannon, G.C.; Bradburne, C.E.; Aldrich, H.C.; Baker, S.H.; Heinhorst, S.; Shively, J.M. (2001). Microcompartments in prokaryotes: carboxysomes and related polyhedra. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, p. 5351-5361.
- Cannon, G.C. e Shively, J.M. (1983). Characterization of a homogenous preparation of carboxysomes from *Thiobacillus neopolitanus*. *Arch Microbiology*, v. 134, p. 52-59.
- Cárdenas, J.P.; Valdés, J.; Quatrini, R.; Duarte, F.; Holmes, D.S. (2010). Lessons from the genome of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.88, p. 605-620.
- Carlos, C.; Reis F.C.; Vicentini, R.; Madureira, D.J.; Ottoboni, L.M. (2008). The *rus* operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. *Current Microbiology*, v. 57, p. 375-380.
- Chartier, M.; Mercier, G.; Blais, J. F. Partitioning of trace metals before and after biological removal of metals from sediments. *Water Research*, v. 35, p. 1435-1444, 2001.
- Cheng, S.; Liu, Y.; Crowley, C.S.; Yeates, T.O.; Bobik, T.A. (2008). Bacterial microcompartments: their properties and paradoxes. *Bioessays*, v. 30, p. 1084-1095.
- Chi, A.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Mackey, A.J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Jerez, C.A. (2009). Periplasmic Proteins of the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 6.12, p. 2239-2251.
- Chuang, M.H.; Wu, M.S.; Lo, W.L.; Lin, J.T.; Wong, C.H.; Chiou, S.H. (2006). The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 2552-2557.
- Colmer, A.R.; Hinkle, M.E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. *Science*, v. 106, p. 253-256.
- De, G.C.; Oliver, D.J.; Pesic, B.M. (1997). Effect of heavy metals on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, v. 44, p. 53-63.
- Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Ram Kopponeedi, P.; Bond, P. (2003). Growth in sulfidic mineral environments metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*, v. 149, p. 1959-1970.

- Dresher, W.H. (2004). Producing Copper *Nature's Way*: Bioleaching. Copper Applications in Mining & Extraction. Disponível em http://www.copper.org/publications/newsletters/innovations/2004/05/producing_copper_natures_way_bioleaching.html. Acesso em 06 de fevereiro de 2011.
- Ehrlich, H.L. (2002). Geomicrobiology, 4. ed. Dekker, New York.
- Esparza, M.; Cardenas, J.P.; Bowien, B.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S. (2010). Genes and pathways for CO₂ fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, carbon fixation in *A. ferrooxidans*. BMC Microbiology, v. 10, p. 229
- Felício, A.P.; Garcia Jr., O.; Bertolini, M.C.; Ottoboni, L.M.M.; Novo, M.T.M. (2003). The effects of copper ions on the synthesis of periplasmatic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analysed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. Hydrometallurgy, v. 71, p. 165-171.
- Ferguson, S.J.; Ingledew, W.J. (2008). Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1777, p. 1471-1479.
- Fowler, T.A.; Crundwell, F.K. (1998). Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism. Applied and Environmental Microbiology, v. 64(10), p. 3570-3575.
- Fowler, T.A.; Crundwell, F.K. (1999a). Leaching of zinc sulphide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism. Applied and environmental microbiology, v. 64, p. 3570-3575.
- Fowler, T.A.; Crundwell, F.K. (1999b). Leaching of zinc sulphide by *Thiobacillus ferrooxidans*: Bacterial oxidation of the sulphur product layer increases the rate of zinc sulphide dissolution at high concentrations of ferrous iron. Applied and environmental microbiology, v. 65, p. 5285-5292.
- Fowler, T.A.; Crundwell, F.K. (1999c). The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in the bacterial leaching of zinc sulphide. Biohydrometallurgy and environmental towards the mine of the 21st Century, v. 01, p. 273-281.
- Gowrishankar, J. e Harinarayanan, R. (2004). Why is transcription coupled to translation in bacteria? Molecular Microbiology, v. 54, p. 598-603.
- Haferburg, G.; Kothe, E. (2010). Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. Applied Microbiology Biotechnology, v. 87, p. 1271-1280.
- Haghshenas, D.F.; Alamdari, E.K.; Torkmahalleh, M.A.; Bonakdarpour, B.; Nasernejad, B. (2009). Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade spharelite concentrate. Minerals Engineering, v.22, p. 1299-1306.

- Hallberg, K.B.; Johnson, D.B. (1994). Biodiversity of acidophilic prokariotes. *Advances in Applied Microbiology*, v.49, p. 37-84.
- Hallberg, K.B.; Lindström, E.B. (1994). Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*, v. 140, p. 3451–3456.
- Hansford, G.S.; Vargas, T. (2001). Chemical and eletrochemical basis of bioleaching processes. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 135-145.
- He, Z.; Zhong, H.; Hu, Y.; Xiao, S.; Xu, J. (2006). Analysis of differential protein expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under different energy resources respectively using SELDI-ProteinChip technologies. *Journal of Microbiological Methods*, v. 65, p. 10-20.
- Jensen, A.B.; Webb, C. (1995). Ferrous sulfate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. *Process Biochemistry*, v. 30 (3), p. 225-236.
- Jerez, C.A. (2008). The use of genomics, proteomics and other OMICS techonologies for the global understanding of biomining microorganisms. *Hydrometallurgy*, v. 94, p. 162-169.
- Johnson, D.B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganism. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 27, p. 307-317.
- Johnson, D.B. (2001). Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 147-157.
- Keller, M. e Hettich, R. (2009). Environmental Proteomics: a Paradigm Shift in Characterizing Microbial Activities at the Molecular Level. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 73 (1), p. 62-70.
- Kelly, D.P.; Wood, A.P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov., and *Thermithiobacillus* gen. nov. Int [International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology](#), v. 50, p. 511-516.
- Kondratyeva, T.F.; Muntyan, L.N.; Karavaiko, G.I. (1995). Zinc and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. *Microbiology*, v. 141, p.1157-1162
- Kusano, T.; Takeshima, T.; Inoue, C.; Sugawara, K. (1991). Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 7313-7323.
- Lacerda, C.M.R.; Reardon, K.F. (2009). Environmental proteomics: applications of proteome profiling in environmental microbiology and biotechnology. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, v. 8, p. 75-87.

- Lane, D.J.; Harrison Jr., A.P.; Stahl, D.; Pace, B.; Giovannoni, S.J.; Olsen, G.J.; Pace, N.R. (1992). Evolutionary relationships among sulfur- and iron- oxidizing eubacteria. *The Journal of Bacteriology*, v. 174, p. 269–278.
- Macko, V.; Stegemann, H.; Hoppe Seylers, Z.; (1969). Two-dimensional separation of human body fluid protein. *Physiol.Chem.*, v. 350, p. 917-919.
- MacRae, J.D. e Smit, J. (1991). Characterization of caulobacters isolated from wastewater treatment systems. *Applied Environmental Microbiology*, v. 57, p. 751-758.
- Matuszewska, E.; Kwiatkowska, J.; Kuczynska-Wisnik, D.; Laskowska, E. (2008). *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology*, v. 154, p. 1739-1747.
- Mercier, G.; Chartier, M. (1999). Decontamination of fly ash and used lime from municipal wast incinerator using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Environmental Microbiology*. v. 24, p. 517-528.
- Mousavi, S.M.; Yaghmaei, S.; Vossoughi, M.; Jafari, A.; Roostaazad, R.; Turunen, I. (2007). Bacterial leaching of low-grade ZnS concentrate using indigenous mesophilic and thermophilic strains. *Hydrometallurgy*, v.85, p. 59-65.
- Norris, P.R.; Burton, N.P.; Foulis, N.A.M. (2000). Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles*, v. 4, p. 71–76.
- Novo, M.T.M.; Souza, A.P.; Garcia Jr., O.; Ottoboni, L.M.M. (1996). RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *Systems Applied Microbiology*, v. 19; p. 91–95.
- Novo, M.T.M.; Garcia Jr., O.; Ottoboni, L.M.M. (2003). Protein Profile of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strains Exhibiting Different Levels of Tolerance to metal Sulfates. *Current Microbiology*, v.47, p. 492-496.
- Novo, M.T.M.; Silva, A.C.; Moreto, R.; Cabral, P.C.P.; Costacurta, A.; Garcia Jr., O.; Ottoboni, L.M.M. (2000). *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie van Leeuwenhoek*, v: 77, p. 187-195.
- O'Farrell, P.H. (1969). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal Biol. Chemistry*, v. 250, p. 4007-4021.
- Okibe, N., Gericke, M., Hallberg, K.B.; Johnson, D.B. (2003). Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 1936-1943.

- Olson, G.J.; Brierley, J.A., Brierley, C.L. (2003). Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, p. 249-257.
- Osorio, H.; Martínez, V.; Nieto, P.A.; Holmes, D.S.; Quatrini, R. (2008). Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiology*, v. 8(203).
- Pathak, A.; Dastidar, M.G.; Sreekrishnan, T.R. (2009). Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 90, p. 2343-2353.
- Peng, H.; Yang, Y.; Li, X.; Qiu, G.; Liu, X.; Huang, J.; Hu, Y (2006). Structure Analysis of 16S rDNA Sequences from Strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39:2, p.178-182.
- Persidis, A (1998). Proteomics. *Nat. Biotechnology*, v. 16, p. 393-394.
- Picard, F.; Dressaire, C.; Girbal, L.; Coccagn-Bousquet, M. (2009). Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *C R Biol*, v. 332, p. 958-973.
- Pina, P.S.; Leão, V.A.; Silva, C.A., Daman, D.; Frenay, J. (2005). The effect of ferrous and ferric iron on sphalerite bioleaching. *Minerals Engineering*, v. 18, p. 549-551.
- Pizarro, J.; Jedlicki, E.; Orellana, O.; Romero, J.; Espejo, R.T. (1996). Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 1323–1328.
- Quatrini, R.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S. (2005). Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 606–614.
- Ram, R. J.; N. C. VerBerkmoes; M. P. Thelen; G. W. Tyson; B. J. Baker; R. C. Blake; M. Shah; R. L. Hettich; J. F. Banfield (2005). Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, v. 308, p. 1915–1920.
- Ramírez, P.; Guilian, N.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Jerez, C.A. (2004). Differential Protein expression during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on Ferrous Iron, Sulfur Compounds, or Metal Sulfides. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70(8), p. 4491-4498.
- Rawlings, D.E. (1997) *Biomining: theory, microbes and industrial process*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Rawlings, D. E.; Tributsch, H; Hansford, G.S. (1999). Reasons why *Leptospirillum* -like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology*, v. 145, p. 5-13.

- Rawlings, D.E. (2001). The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron or sulfur oxidizing bacteria. Hydrometallurgy, v. 59, p. 187-201.
- Rawlings, D.E. (2002). Heavy metal mining using microbes. Annual Review of Microbiology, v. 56, p. 65-91.
- Rawlings, D.E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur- oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from metals and their concentrates. Microbial Cell Factories, v. 4(13).
- Rawlings, D. E.; Johnson, D. B. (2007). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. Microbiology, v. 153, p. 315-324.
- Rawlings, D.E. (2005). The evolution of pTF-FC2 and pTC-F14, two related plasmids of the IncQ-family. Plasmid, v. 53(2), p. 137-147.
- Rohwerder, T.; Jozsa, P-G.; Gehrke T.; Sand, W. (2002). Bioleaching. In: Bitton, G. (ed) c, v. 2, p. 632-641. Wiley, New York.
- Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Applied Microbiology Biotechnology, v. 63(3), p. 239-248.
- Sand, W.; Gehrke, T.; Hallmann, R.; Schippers, A. (1995). Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism – a critical evaluation of bacterial leaching. Applied and Microbiology Biotechnology, v. 43, p. 961-966.
- Sand, W.; Gehrke, T.; Jozsa, P-G; Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs indirect bioleaching. Hidrometallurgy, v. 59, p. 159-175.
- Seeger, M.; Jerez, C.A. (1993). Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. FEMS Microbiology Review, v. 14, p. 303-310.
- Segal, G.; Ron, E.Z. (1998). Regulation of heat-shock response in bacteria. Ann N Y Acad Science, v. 851, p. 147-151.
- Selenska-Pobell, S.; Otto, A.; Kutschke, S. (1998). Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and REP-APD. Journal of Applied Microbiology, v. 84, p. 1085–1091.
- Silver, M.; lundgren, D.G. (1970). The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can Journal Bacteriology, v. 46, p. 457-461.
- So, A.K.; Espie, G.S.; Williams, E.B.; Shively, J.M.; Heinhorst, S.; Cannon, G.C. (2004). A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. Journal of Bacteriology, v. 186, p. 623-630.

- Soulere, L.; Guiliani, N.; Queneau, Y.; Jerez, C.A.; Doutheau, A. (2008). Molecular insights into quorum sensing in *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria via molecular modelling of the transcriptional regulator AfeR and of the binding mode of long-chain acyl homoserine lactones. *J Mol Model*, v. 14, p. 599-606.
- Souza, A.D. (2005). Processo Integrado: biolixiviação química na indústria de zinco. Ouro Preto, Brasil. Universidade Federal de Ouro Preto. Master Thesis. Department of Materials Engineering. 98pp.
- Siezen, R.J.; Wilson, G. (2009). Bioleaching Genomics. *Microbial Biotechnology*, v. 2, p. 297-303.
- Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, v. 59, p. 177-185.
- Tringe, S. G., C. von Mering, A. Kobayashi, A. A. Salamov, K. Chen, H. W. Chang, M. Podar, J. M. Short, E. J. Mathur, J. C. Detter, P. Bork, P. Hugenholtz, and E. M. Rubin (2005). Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308, p. 554-557.
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R.J.; Tettelin, H.; Blake II, R.; Eisen, J.A; Holmes, D.S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome to sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, v. 9(597).
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Holmes, D.S. (2008). Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy*, v. 94, p. 180-184.
- Valenzuela, L.; Chi, A.; Beard, S.; Orell, A.; Guiliani, N.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Jerez, C.A. (2005). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 197-211.
- Varela, P. e Jerez, C.A. (1992). Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett*, v. 77, p. 149-153.
- Vera, M.; Guiliani, N.; Jerez, C.A. (2003). Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, v. 71, p. 125-132.
- VerBerkmoes, N.C.; Denef, V.J.; Hettich, R.L.; Banfield, J.F. (2009). Systems biology: Functional analysis of natural microbial consortia using community proteomics. *Nat Rev Microbiol*, v. 7, p. 196-205.
- Wilmes, P. e Bond, P.L. (2004). The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environmental Microbiology*, v. 6, p. 911-920.
- Wilmes, P. e Bond, P.L. (2006). Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *TRENDS in Microbiology*, v. 14, p. 92-97.

- Woese, C.R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiology Review*. v. 51, p. 221-271.
- Yarzabal, A.; Brasseur, G.; Ratouchniak, J.; Lund, K.; Lemesle-Meunier, D., DeMoss, J.A.; Bonnefoy, V. (2002). The high-molecular-weight cytochrome c C_{yc2} of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in an outer membrane protein. *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 313-317.
- Yeates, T.O.; Kerfeld, C.A.; Heinhorst, S.; Cannon, G.C.; Shively, J.M. (2008). Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments. *Nature Reviews: Microbiology*, v. 6, p. 681-691.
- Zimmerly, S.R.; Wilson, D.G.; Prater, J.D. (1958). Cycling leaching process employing iron oxidizing bacteria. US Patent 2.829.964.

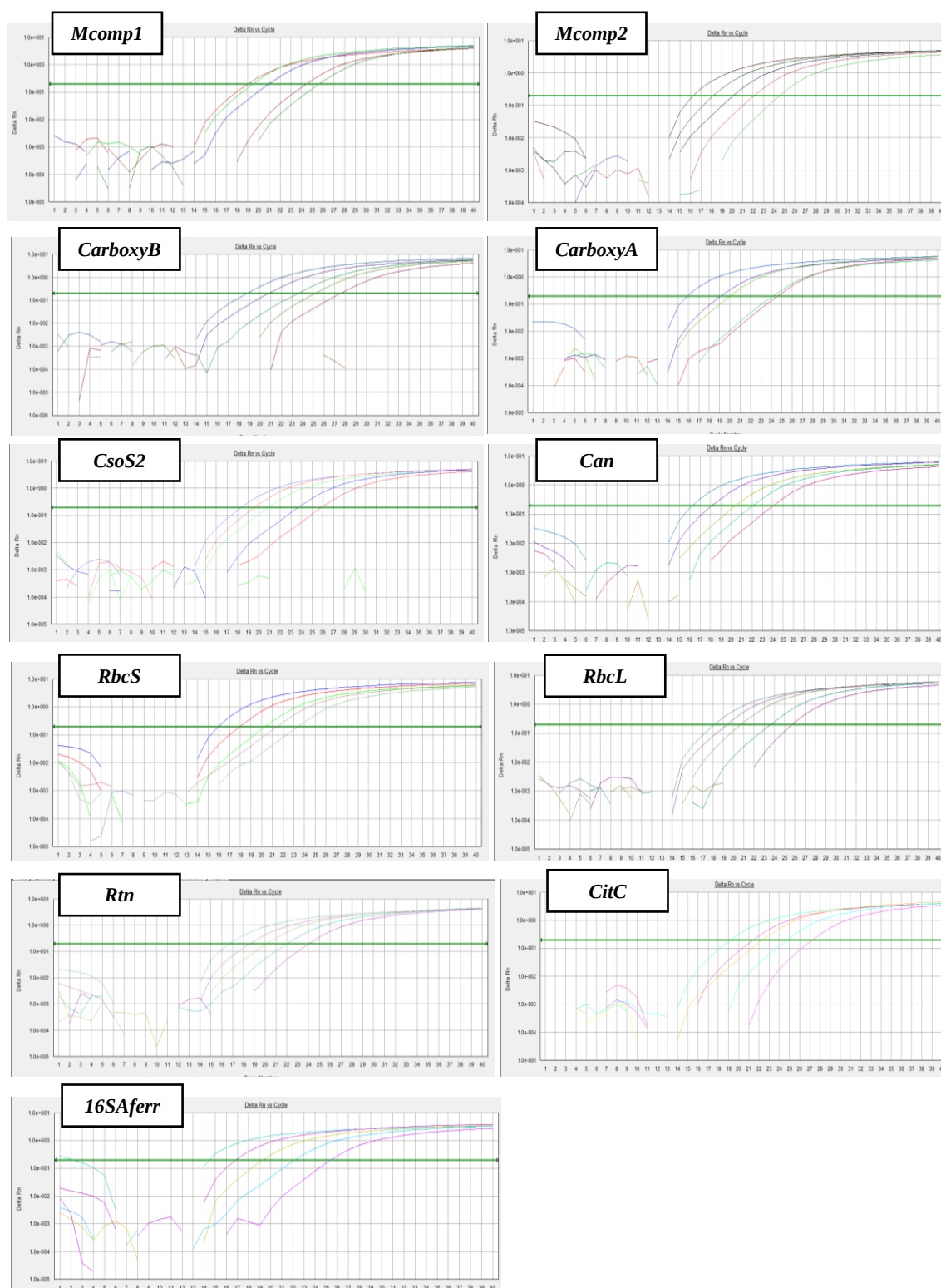
7. Anexos

Anexo 1: Tabela dos peptídeos identificados por espectrometria de massas da amostra biorreator

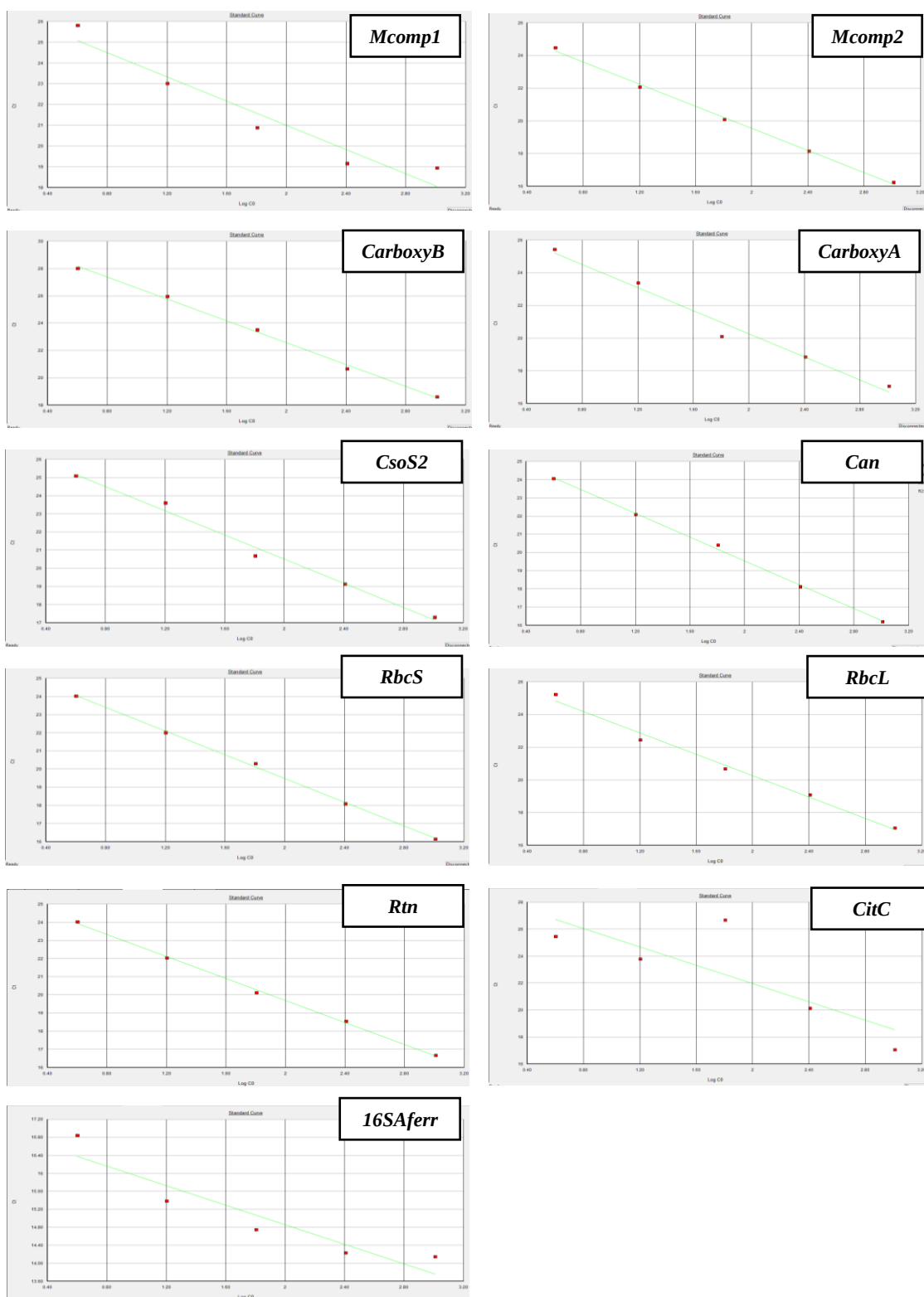
Identidade	Nº de Acesso (NCBI nr)	Observado	Mr (esperado)	Mr (calculado)	ppm	Miss	Score	Expect	Sequência Peptídeos
Chaperonina GroEL	YP_002219156	720.4010	719.3917	718.3398	1498	0	6	1.1e+04	K.APGFGDR.R
		493.8090	985.6034	984.5604	1059	0	56	0.081	R.GVNVLADAVK.V
		519.7460	1037.4774	1037.4521	24.3	0	34	13	K.VGAGSEMEMK.E
		628.8560	1255.6975	1255.6846	10.3	0	65	0.0082	R.DMLPILEQVAK.S
		630.4060	1258.7975	1258.6413	124	0	56	0.072	K.AVIAGMNPMDLK.R
		638.3270	1274.6395	1274.6363	2.54	0	(24)	1.3e+02	K.AVIAGMNPMDLK.R
		673.8780	1345.7414	1345.7089	24.2	0	84	0.00011	K.LESTTLADLGQAK.K
		689.3900	1376.7655	1376.6792	62.7	0	81	0.00022	K.AMLEDMAILTGGR.V
		772.8750	1543.7354	1543.7307	3.08	0	53	0.12	R.GYLSPYFVNNQDK.M
		778.9730	1555.9315	1554.8366	704	0	54	0.1	R.QIVANAGGEGSVVLNK.V
		797.4750	1592.9354	1592.8886	29.4	0	76	0.00074	R.AAVEEGIVPGGGVALVR.A
		797.4750	1783.9462	1783.9178	15.9	0	27	48	K.MVAELENPYILLHDK.K
		895.8850	1789.7555	1789.8694	-63.65	0	103	1.7e-06	K.EVAQVGTISANSDDSIGK.I
		976.9840	1951.9535	1951.9383	7.77	1	68	0.013	K.EIELADKFENMGAQMVK.E
		1032.0450	2062.0755	2062.0690	3.18	0	91	2.2e-05	K.ASSIAGLMITTEAMVTELPK.K
		859.4420	2575.3042	2574.2773	399	0	61	0.021	K.EVASQASDEAGDGTATTATVLAQ AIIR.E
Porina fosfato seletiva (O e P)	YP_002220770	1022.4580	3064.3522	3062.4503	621	0	109	3.1e-07	K.VGNEGVTVEEGSGLANELDVVE GMQFDR.G
		565.2810	1128.5475	1128.5710	-20.82	0	58	0.047	R.NMNQSLLPGR.S
		739.0430	2214.1073	2213.0092	496	0	38	5.8	K.YSMGPLLTAEVSGSMGTENNR.G
		755.0580	2262.1521	2261.0674	480	0	25	1.2e+02	K.TPEGLEYTG TAGNELMFIYR.N
		846.7440	2537.2102	2536.2308	386	1	77	0.00067	K.FKTPEGLEYTG TAGNELMFIYR.N
Proteína de Membrana Externa OmpA-like	BAC66780	996.1320	2985.3742	2984.4556	308	0	54	0.087	K.GEAVPGVTYYIQGAYDEAGLGN ANALFPK.T
		445.2840	888.5534	888.4916	69.6	0	27	89	R.VEINSSIK.V
		539.7930	1077.5715	1077.5706	0.83	0	71	0.0028	R.VLDEVASFAN.N
		595.6370	1783.8892	1783.8238	36.7	0	59	0.032	K.GHSYDNPVATNATPQGR.F
Proteína Hipotética Lferr_2230	YP_002220640	604.3340	1809.9801	1808.8918	602	0	79	1.5e+02	R.AQSVAQYLAHHGVASDR.M
		724.3670	1446.7195	1445.7184	692	0	60	0.025	R.MAGLASDGLDLLDR.V

Continuação Anexo 1: Tabela dos peptídeos identificados por espectrometria de massas da amostra biorreator. A sequência de peptídeos em negrito também foram identificadas para as proteínas de microcompartimento (YP_002219822 e YP_002219823) e para a proteína do carboxissoma (CsoS1).

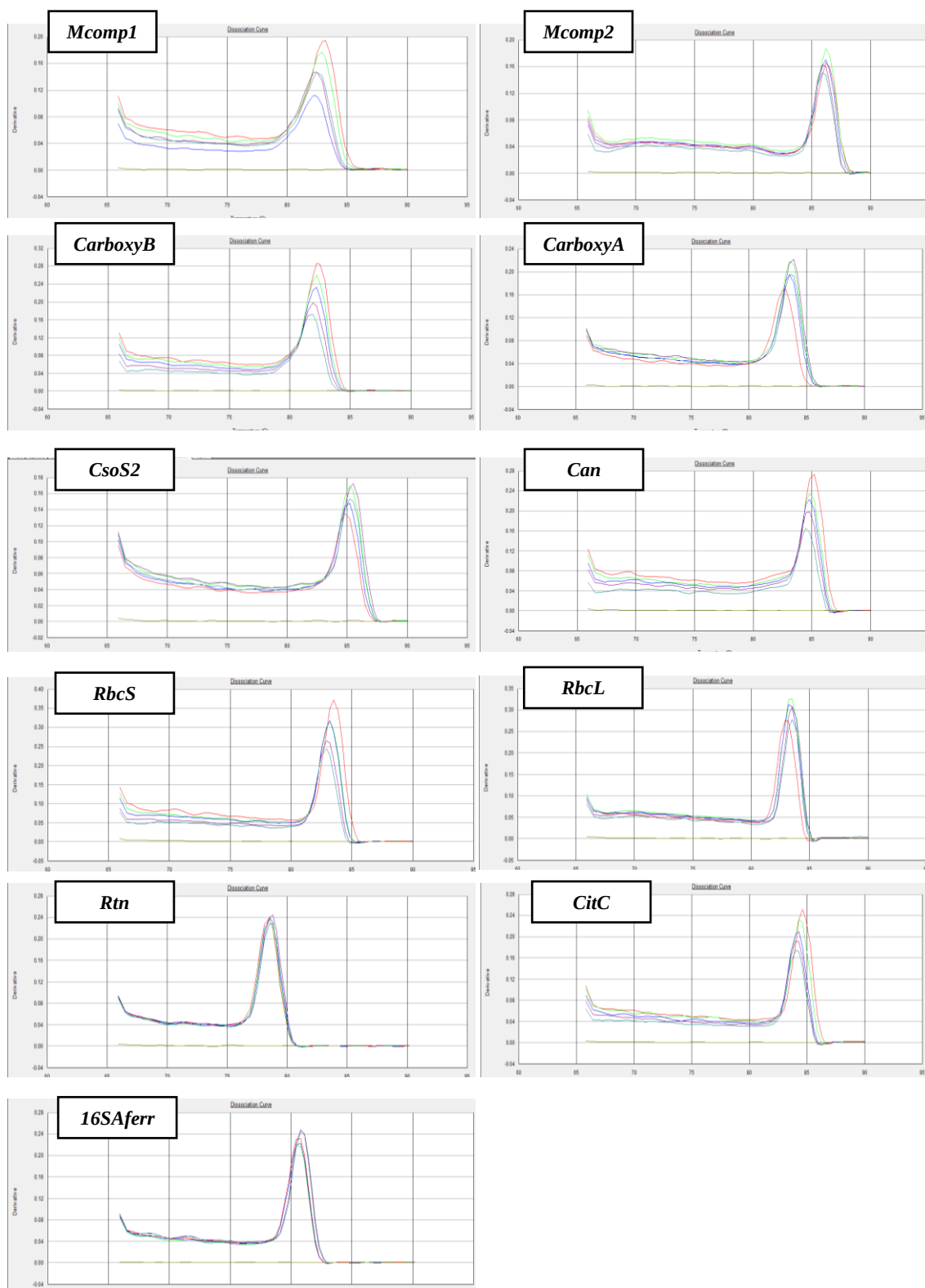
Identidade	Nº de Acesso (NCBI nr)	Observado	Mr (esperado)	Mr (calculado)	ppm	Miss	Score	Expect	Sequência Peptídeos
Proteína de Microcompartimento	YP_002219821	522.7920	1043.5694	1043.5360	32,1	0	91	2.5e-05	R.GETGAVNAAVR.A
		431.3040	1290.8901	1290.7408	116	0	61	0.024	R.VGDGLVAHHIAR.V
		693.9140	1385.8135	1385.7224	65,7	0	89	3.3e-05	R.GLVPAIEAADAMTK.A
		697.9370	1393.8595	1393.7718	62,9	0	28	40	R.QFVGGGYVTVLVR.G
		709.3660	1416.7175	1416.7395	-15,52	0	78	0.00046	M.ANVSGVALGMIETR.G
		818.4090	1634.8034	1634.8152	-7,16	0	61	0.0032	R.VHSEVENILPSSPVE.-
Proteína de Microcompartimento	YP_002219822	686.8780	1371.7414	1371.7068	25.3	0	56	0.066	R.GLVPAVEAADAMTK.A
Proteína de Microcompartimento	YP_002219823	795.5800	1589.1455	1589.8269	-428.62	0	17	8.5e+02	-.MINVSGVALGMIETR.G
Proteína do Carboxissoma (CsoS1)	NP_874943	698.8640	1395.7135	1394.7558	687	0	36	8.8	R.EFVGGGYVTVLVR.G
Proteína Hipotética Lferr_2230	YP_002220640	724.3670	1446.7195	1445.7184	692	0	60	0.025	R.MAGLASDGLDLLDR.V
Citocromo Oxidase (subunidade II)	CAA07034	792.4220	1582.8294	1582.8315	-1.31	0	69	0.0029	K.QGVTDVSQLVVPEGR.T
		1058.5530	2115.0914	2114.1017	468	0	82	0.00023	R.HLFITPTMLGTTATNPMLR.V
Ribulose Bifosfato Carboxilase (RuBisCO)	YP_002219828	801.7540	2402.2403	2401.1406	458	0	91	2.5e-05	K.LPMFGEQSVDTVIAELEACHR.A
		807.1270	2418.3592	2417.1355	5 06	0	(69)	0.0038	K.LPMFGEQSVDTVIAELEACHR.A
		817.4200	2449.2381	2448.2186	416	0	39	3.7	R.QIAYLVNQGWNPGEHVEPER.A
Citocromo C	CAA07031	460.7690	919.5235	918.4923	1123	0	41	3.2	R.LSGGAPYVR.L
		632.8850	1263.7555	1262.6983	837	0	46	0.86	K.LLGFTTTNLQR.Q
Rusticianina	CAA07038	557.2520	1112.4895	1112.5350	-40.91	0	55	0.084	K.VSGDVTYSGK.T
		846.8030	2537.3871	2536.3764	398	1	(27)	62	K.KGPPYAVMPVIDPIVAGTGFSVPV K.D
		852.1370	2553.3892	2552.3713	399	1	29	38	K.KGPPYAVMPVIDPIVAGTGFSVPV K.D
Hidroperoxidase	YP_002219548	767.3860	1532.7574	1532.7834	-16.98	0	49	0.3	R.NYDVLLNDEVALR.G
		545.9650	1634.8733	1634.8814	-4.99	0	31	22	K.GGIGHIQLPMVADLSK.S



Anexo 2: Figura mostrando os *plots* de amplificação referente à curva de eficiência para os genes *mcomp1*, *mcomp2*, *carboxyB*, *carboxyA*, *csoS2*, *can*, *rbcS*, *rbcL*, *rtn*, *citc*, *16SAferr*, utilizando diluição seriada 1:1024 de cDNA da amostra cepa referência *A. ferrooxidans*. No eixo X está demonstrado o valor dos ciclos de PCR e no eixo Y o valor de ΔRn . As intercessões da linha verde com as curvas indicam o CT da curva de amplificação. A sobreposição dos diversos *plots* de amplificação mostra que há grande sobreposição entre corridas diferentes para o mesmo mRNA analisado.



Anexo 3: Figura mostrando as curvas padrão referentes genes *mcomp1*, *mcomp2*, *carboxyB*, *carboxyA*, *csoS2*, *can*, *rbcS*, *rbcL*, *rtn*, *citc*, *16SAferr* da amostra cepa referência *A. ferrooxidans*. No eixo X estão demonstrados os valores de Log da concentração de cDNA e no eixo Y os valores de C_T correspondes a cada diluição. À direita do gráfico estão representado os valores de *slope* e de coeficiente de linearidade.



Anexo 4: Figura mostrando as curvas de dissociação dos iniciadores específicos para os *mcomp1*, *mcomp2*, *carboxyB*, *carboxyA*, *csoS2*, *can*, *rbcS*, *rbcL*, *rtn*, *citc*, *16SAferr* da amostra cepa referência *A. ferrooxidans*. No eixo x está representado a temperatura de dissociação do amplicon gerado pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência. A presença de um único pico mostra que provavelmente não há formação de dímeros durante os ciclos de amplificação.