



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**ESTUDO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS EM SISTEMA DE
LIXIVIAÇÃO DE CALCOPIRITA A 70°C E NA PRESENÇA DE CLORETO
UTILIZANDO PCR CONVENCIONAL**

Bruna Pereira Neves

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

Ouro Branco
Dezembro/2015

**ESTUDO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS EM SISTEMA DE
LIXIVIAÇÃO DE CALCOPIRITA A 70°C E NA PRESENÇA DE CLORETO
UTILIZANDO PCR CONVENCIONAL**

Bruna Pereira Neves

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientadora: Isabel Cristina Braga Rodrigues

**Ouro Branco
Dezembro/2015**

RESUMO

A recuperação de metais por meio de biolixiviação tem sido alvo de inúmeras pesquisas e, atualmente, é uma tecnologia consolidada. A técnica utiliza micro-organismos como catalisadores do processo, atuando sobre os sulfetos minerais e efluentes de mineradoras com baixos teores de metal. A calcopirita é um sulfeto mineral rico em cobre, porém apresenta-se refratário à lixiviação química e microbiana. Dentre os micro-organismos que podem ser utilizados na biolixiviação, as espécies contidas no domínio *Archaea* apresentam peculiaridades em suas características que lhes conferem vantagens em relação aos demais. A espécie *Sulfolobus acidocaldarius* é oxidante de enxofre e consegue desenvolver-se a altas temperaturas e na presença de íons cloreto, fazendo com que seja uma candidata à biolixiviação da calcopirita, pois, tais condições favorecem a sua solubilização. É interessante que as espécies que atuam nestas matrizes minerais sejam caracterizadas de forma eficiente, para que o conhecimento dos micro-organismos envolvidos possa auxiliar em um melhor controle do processo. As técnicas moleculares, como o sequenciamento e a reação de polimerização em cadeia (PCR), são as mais utilizadas para caracterizar micro-organismos presentes em sistemas de lixiviação. Neste trabalho, extrações de DNA genômico, seguidas de PCR, foram utilizadas para efeito de amplificação de gene rDNA 16S e produção de bibliotecas deste gene, para posterior sequenciamento. Os *amplicons* obtidos indicaram a semelhança com o gene de *Sulfolobus acidocaldarius* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Tais resultados demonstram a necessidade de sequenciamento do gene amplificado e posterior análise de bioinformática, utilizando comparações com sequências depositadas em bancos de dados, para determinação das espécies responsáveis pelo processo de biolixiviação da calcopirita em temperatura de 70°C e na presença de íons cloreto.

Palavras Chave: Biolixiviação, Calcopirita, 16S rRNA, *Sulfolobus acidocaldarius*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 – Objetivo Geral	9
2.2 – Objetivos Específicos	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 Biolixiviação de Sulfetos Minerais.....	10
3.2 Mecanismos da Biolixiviação.....	13
3.3 Biolixiviação da Calcopirita	15
3.4 Micro-organismos responsáveis pelos processos de biolixiviação.....	17
3.4.1 Domínio <i>Bacteria</i>	18
3.4.2 Domínio <i>Archaea</i>	22
3.4.3 Formação de Biofilmes em Sistemas de Biolixiviação	25
3.5 Métodos moleculares para estudo dos micro-organismos envolvidos em processos de Biolixiviação.....	27
3.5.1 Bibliotecas de 16S rRNA.....	28
3.5.2 Extração de DNA.....	29
3.5.3 Reação de polimerização em cadeia – PCR	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Preparo das amostras de biolixiviação para extração de DNA.....	34
4.2 Métodos de extração de DNA das membranas.....	35
4.2.1 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio.....	36
4.2.2 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por <i>kit</i> Wizard [®] Promega e tampão de lise enzimático.....	36
4.2.3 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio com pérolas de vidro	37
4.2.4 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio, pérolas de vidro e tampão de lise enzimática.....	37
4.3 Determinação da concentração de DNA e da pureza da amostra	38
4.4 Eletroforese em gel de agarose	38
4.5 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

5.1 Amostras de DNA obtidas através dos protocolos de extração utilizados neste trabalho	41
5.2 Avaliação da concentração e da pureza do DNA obtido	42
5.3 Análise dos <i>amplicons</i> resultantes da reação de polimerização em cadeia (PCR).....	45
6. CONCLUSÃO	48
ANEXO I.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Um dos setores industriais de maior relevância econômica no país é o mineral. Os minerais são utilizados há séculos no desenvolvimento tecnológico da humanidade. Com isso, há uma crescente demanda pelos diversos tipos de metais e a indústria mineradora se encontra diante de um possível esgotamento das reservas que contêm altos teores de metal. Outro problema associado à exploração mineral é a formação de grande quantidade de resíduos que são liberados no ambiente. Tais resíduos podem causar impactos ambientais negativos, como a drenagem ácida de mina (DAM), contaminando águas superficiais com metais e causando um desequilíbrio local. Por outro lado, existe a possibilidade de realizar a extração de metais que sejam provenientes de minérios ou rejeitos da mineração que apresentem um baixo teor do metal em sua composição, a partir de processos economicamente viáveis. Uma das alternativas é a rota biohidrometalúrgica, ou denominada especificamente como biolixiviação, que possibilita a extração de metais com baixo custo operacional (BATISTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; FIRMINO, 2013).

Através da biolixiviação, diversos metais podem ser recuperados com facilidade. Os micro-organismos são os catalisadores do processo e atuam sobre uma diversidade de substâncias podendo auxiliar na recuperação destes. O cobre é um dos metais cuja extração é bastante pronunciada no mercado minero-metalúrgico, utilizando biolixiviação, a partir de calcocita (Cu_2S) e covelita (CuS), sulfetos mais reativos a este processo. A calcopirita é o mineral de cobre mais abundante na crosta terrestre, porém apresenta grande resistência à dissolução, com o auxílio do cloreto e de altas temperaturas essa resistência diminui facilitando o processo (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Devido às condições necessárias ao desenvolvimento deste tipo de processo, apenas alguns micro-organismos são capazes de sobreviver nos sistemas de biolixiviação de calcopirita, pois o cloro é tóxico para a maioria das espécies microbianas e apenas micro-organismos extremófilos são capazes de suportar altas temperaturas de cultivo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O domínio bactéria apresenta micro-organismos que se destacam no processo de biolixiviação. O gênero *Acidithiobacillus* representa uma das classes mais eficientes no processo (BATISTA, 2009), porém espécies deste gênero são mesófilas, suportando temperaturas de crescimento entre 30°C e 40°C. Neste domínio também são encontradas espécies termófilas, como *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, que apresenta temperatura ótima de crescimento entre 50°C e 55°C. Dessa forma, os micro-organismos termófilos

extremos apresentam uma opção para o tratamento da calcopirita. Os micro-organismos amplamente associados aos de biolixiviação pertencem ao domínio *Archaea* e alguns exemplos em destaque pertencem ao gênero *Sulfolobus*, como *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus rivotincti* e *Sulfolobus acidocaldarius* (VELOSO, 2011). Pode-se, por exemplo, destacar a espécie *Sulfolobus acidocaldarius* que tem condições ótimas de crescimento na faixa de 75 a 80°C e pH entre 2 e 3, que foi a primeira a ser caracterizada como hipertermoacidofílica com capacidade de se desenvolver em ambientes ricos em enxofre (CHEN *et al.*, 2005).

Devido às condições adversas de um sistema de biolixiviação, os micro-organismos podem se ligar à superfície dos sulfetos minerais liberando exopolissacarídeos e outros compostos que resultam na formação de biofilmes. Alguns micro-organismos expressam uma variedade de estruturas de superfícies que estão envolvidas na mobilidade e agregação celular às superfícies. A espécie *Sulfolobus acidocaldarius* pode representar tais micro-organismos, desenvolvendo-se aderida em biofilmes, principalmente em altas temperaturas e meios ácidos (KOERDT *et al.*, 2010).

A biolixiviação é um processo vantajoso e apresenta limitações quanto ao desenvolvimento de micro-organismos, como reduzidos valores de pH e altas concentrações de metais no meio de cultivo, por isso, as espécies que se desenvolvem neste tipo de cultivo devem receber atenção especial, principalmente devido à possibilidade de otimização do processo de extração de metais. Uma das formas de entender as características das espécies é a identificação molecular dos micro-organismos, pois, fornece informações características e particulares de cada espécie sem a necessidade de cultivo, de forma rápida e eficiente (JUNIOR *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2012).

O gene que codifica o RNA ribossomal (rRNA) 16S é o principal fator de identificação molecular microbiana, pois apresenta as vantagens de ter regiões conservadas e estar presente em todas as espécies. A caracterização da espécie pode ser realizada por meio de clonagem dos produtos de PCR e sequenciamento direto ou pela hibridização do DNA com sondas específicas (WETLER-TONINI *et al.*, 2011; RODRIGUES, 2012).

Neste trabalho a técnica da PCR convencional foi utilizada para determinação de espécies presentes no sistema de lixiviação da calcopirita, a 70°C, com adição de cloreto de sódio.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O trabalho teve por objetivo avaliar a comunidade de procariotos em um sistema de biolixiviação de calcopirita a 70°C na presença de cloreto, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.2 – Objetivos Específicos

i. Avaliar metodologias de extração de DNA das células recuperadas do sistema de biolixiviação por filtração em membrana 0,22 μm

ii. Avaliar a concentração e a qualidade do DNA na amostra obtida por meio das relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}

iii. Executar PCR utilizando *primer* universais para o gene rDNA 16S

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biolixiviação de Sulfetos Minerais

A recuperação de metais provenientes de compostos insolúveis, os sulfetos metálicos, é possível através de processos pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos. A pirometalurgia recupera metais apenas de minerais com altas concentrações de forma viável, uma vez que demanda maior quantidade de energia. Os minerais com baixos teores de metal não apresentam bons rendimentos econômicos com este processo.

A pirometalurgia consiste em uma série de processos que visam recuperar metais, a partir de seus minerais, por reações em altas temperaturas. Dentre tais processos encontram-se técnicas de alto custo como fundição, eletrorefino e ustulação, que geram um gasto elevado de recuperação de metais. Assim, para minerais ou rejeitos minerais, com baixos teores de metal, a pirometalurgia demonstra-se inviável (FIRMINO, 2013). Além disso, a atividade pirometalúrgica de sulfetos metálicos é essencialmente poluidora, devido à liberação de SO_2 para a atmosfera, um dos gases responsáveis pela chuva ácida, e também devido à grande quantidade de outros efluentes gerados (HENAO, 2010).

Por outro lado, a hidrometalurgia utiliza soluções básicas ou ácidas para solubilização do conteúdo metálico a partir de seus minerais, num processo denominado lixiviação (COLLING, 2010). Várias técnicas são utilizadas para o processamento de óxidos metálicos (CuO , Cu_2O), carbonatos e silicatos, além de sulfetos como a calcopirita e vários minerais de zinco, níquel, urânio, dentre outros (FIRMINO, 2013). A lixiviação química ainda apresenta custo elevado, mas o valor agregado ao metal recuperado consegue viabilizar sua obtenção. Além disso, existe uma vantagem da hidrometalurgia sobre a pirometalurgia que é o menor gasto energético do processo (COLLING, 2010).

Na hidrometalurgia os sulfetos metálicos são dissolvidos em solução aquosa (lixiviados) e a recuperação do metal, de interesse econômico, ocorre com o uso de soluções ácidas ou básicas, em tanques agitados ou estáticos. As desvantagens do processo são os altos consumos de reagentes, necessidade de pressão e temperatura elevadas e geração de resíduos líquidos que, posteriormente, podem contaminar recursos hídricos resultando em impactos ambientais negativos (FIRMINO, 2013).

Uma tecnologia alternativa para o tratamento de minérios, principalmente aqueles que contêm baixos teores do metal de interesse, é a biohidrometalurgia, que apresenta vantagens econômicas e ambientais frente aos demais processos (FIRMINO, 2013). A biohidrometalurgia, também nomeada como biolixiviação, pode ser definida como um processo onde um grupo de micro-organismos age sobre minérios, por ação direta ou indireta, dissolvendo e possibilitando a recuperação de metais (HENAO, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Esta técnica tornou-se uma alternativa promissora para a recuperação de metais, presentes em baixas concentrações, a partir de sulfetos minerais. Algumas vantagens dos processos biohidrometalúrgicos são citadas por Oliveira *et al* (2010) e Firmino (2013):

- Os micro-organismos produzem compostos que solubilizam sulfetos metálico, reduzindo a quantidade de insumos, ácidos ou alcalinos, utilizados no processo hidrometalúrgico clássico (lixiviação química);
- Há uma menor demanda de energia, quando comparado aos dois outros processos (pirometalurgia e lixiviação química);
- Demanda baixo investimento de capital inicial, baixo custo operacional e;
- Utiliza rejeitos minerais e ocorrências minerais complexas, tornando-se uma alternativa ao esgotamento mineral e ao impacto ambiental gerado pela disposição destes rejeitos.

Considerando que os agentes responsáveis pelo processo de biolixiviação são micro-organismos, é possível prever que alguns fatores influenciem o rendimento do processo. Sendo que alguns destes fatores atingem a biolixiviação de forma mais acentuada, como a temperatura, o pH, o potencial redox, a disponibilidade de dióxido de carbono (CO_2), oxigênio (O_2) e nutrientes e o tamanho de partícula (HENAO, 2010).

A concentração de CO_2 afeta o crescimento dos micro-organismos que realizam a biolixiviação, pois a ausência desse gás restringe o crescimento daqueles que o utilizam como fonte de carbono, assimilado posteriormente via ciclo de Calvin (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O oxigênio é o aceptor final de elétrons da respiração celular dos micro-organismos que realizam a biolixiviação. Tais micro-organismos são aeróbios e dependem de certa quantidade de oxigênio dissolvido no meio para estabelecer-se. A variação deste gás

também afetará o desenvolvimento da cultura e o rendimento do processo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Alguns nutrientes inorgânicos são suficientes para suprir as necessidades dos micro-organismos envolvidos na biolixiviação. Tais micro-organismos são quimiotróficos e possuem necessidades nutricionais simples, que podem ser supridas apenas pela composição das amostras minerais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A temperatura deve ser controlada a fim de manter a cultura microbiana viável e controlar o rendimento do processo, uma vez que ela influencia diretamente a dissolução de sulfetos minerais. Esta temperatura não deve exceder os limites suportados pela cultura microbiana presente no processo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

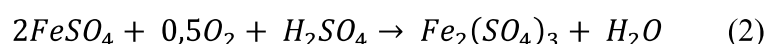
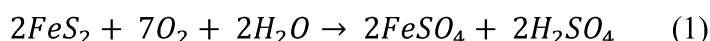
O tamanho da partícula mineral determina a área superficial específica que está em contato com a célula microbiana, ou seja, quanto menor a partícula, maior a área superficial e maior a disponibilidade de substrato energético ao ataque, tanto químico quanto microbiano. Quanto mais finamente dividida estiver a amostra mineral, mais eficiente será a extração de metais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O pH interfere em dois pontos do processo, na solubilização de compostos metálicos e na sobrevivência dos micro-organismos. Os micro-organismos que participam da biolixiviação são acidófilos, dependem de ambientes ácidos para se desenvolverem. Um exemplo deste fato é o caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* que transportam os prótons (H^+) através de enzimas transmembranares (ATPases). No final da cadeia respiratória da célula, os prótons transportados são consumidos na redução do aceptor final de elétrons, O_2 , formando moléculas de água e produzindo ATP (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

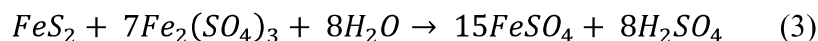
A biolixiviação depende da capacidade oxidante e redutora das espécies iônicas que solubilizam os metais dos sulfetos minerais. O potencial de oxirredução (Eh) quantifica a capacidade de tais elementos doarem ou receberem elétrons. Na maioria dos casos, os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} determinam o potencial de oxirredução no processo de biolixiviação (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

3.2 Mecanismos da Biolixiviação

Os sulfetos minerais podem, por meio de um fenômeno natural, se dissolver nas áreas de mineração. O mecanismo, por muito tempo, foi considerado unicamente químico e decorrente de reações químicas oxidantes, mediadas por água e oxigênio atmosférico (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A pirita (FeS_2), com grande frequência, encontra-se associada a outros sulfetos minerais e pode ser oxidada gerando sulfato férrico em águas de drenagem aeradas, produzindo a chamada drenagem ácida de mina (DAM), conforme demonstrado nas equações 1 e 2 (OLIVEIRA *et al.*, 2010).



O sulfato férrico gerado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) é capaz de promover a dissolução de sulfetos, como a calcocita, a covelita e a pirita devido ao fato de ser um eficiente agente oxidante. A dissolução promove o retorno do sulfato férrico ao seu estado ferroso, conforme indicado na equação 3 (OLIVEIRA *et al.*, 2010).



As reações químicas consideradas responsáveis pela dissolução de sulfetos minerais ocorrem lentamente, na ausência de um catalisador, devido a estabilidade do íon ferroso em meio ácido. Com isso, leva-se muito tempo para alcançar a quantidade necessária de íons férricos, contradizendo a realidade do processo. Com a descoberta de bactérias capazes de oxidar compostos inorgânicos que contêm ferro e enxofre, o conceito de lixiviação natural dos sulfetos minerais foi redefinido para um processo microbiológico, o que explica a oxidação acelerada destes sulfetos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A biolixiviação pode ser considerada um processo oxidante indireto, devido a formação do íon férrico, demonstrada pela equação 2. Há evidências também, da interação direta entre o micro-organismo e a superfície do sulfeto mineral. Alguns micro-organismos podem produzir substâncias poliméricas extracelulares que favorecem a adesão da célula à superfície do mineral (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Dessa forma, os mecanismos de biolixiviação recebem diferentes classificações, sendo elas (i) mecanismo de contato

direto; (ii) mecanismo de contato indireto e; (iii) mecanismo indireto de não contato, como ilustra a figura 3.1 (SOUZA, 2005; HORTA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

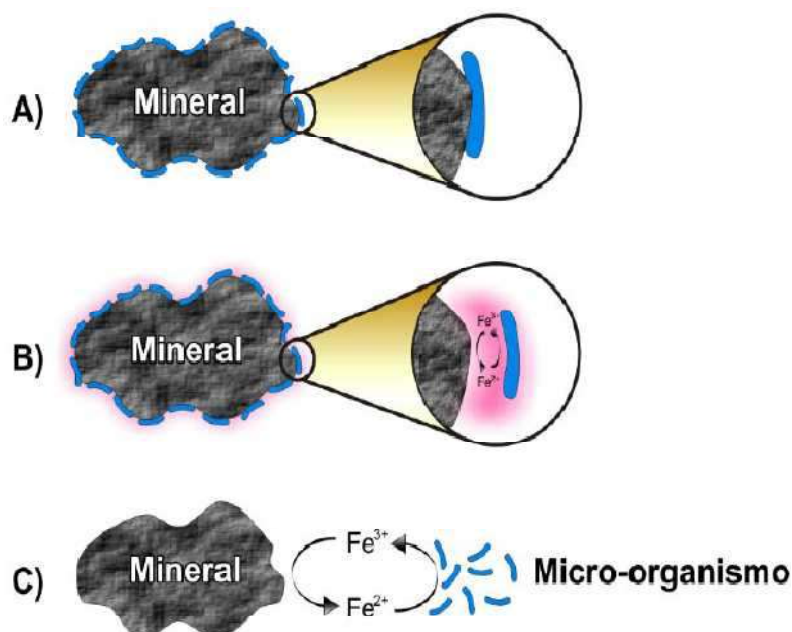
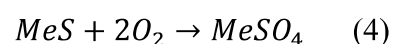


Figura 3.1 - Mecanismos de interação entre micro-organismos e sulfetos minerais. A) Mecanismo de contato direto – micro-organismo diretamente associado ao mineral. B) Mecanismo de contato indireto – substância polimérica faz interface entre sulfeto e micro-organismo. C) Mecanismo indireto de não contato – substâncias oxidadas por micro-organismos atuam como agentes oxidantes dos sulfetos (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

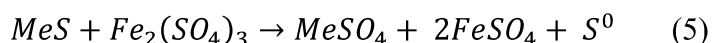
O mecanismo de contato direto se deve à interação direta do micro-organismo com a superfície mineral. As reações de oxidação são realizadas através da atividade enzimática do micro-organismo sobre os componentes do mineral susceptíveis a oxidação, ou seja, é necessário que o micro-organismo esteja aderido à superfície deste mineral para que o processo de solubilização aconteça. O micro-organismo associado à superfície do sulfeto mineral extrai os elétrons diretamente desta superfície e os mesmos são transferidos ao oxigênio (o aceptor final) (SOUZA 2005; HORTA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A equação 4 exemplifica o mecanismo direto para os sulfetos minerais, representado por “MeS”.



No mecanismo de contato indireto, o micro-organismo excreta uma substância polimérica extracelular (EPS) que permite a adesão microbiana e subsequente dissolução do mineral. O ferro contido no material polimérico confere carga positiva à célula. Como

alguns minerais possuem superfície negativamente carregada, uma interação eletrostática é estabelecida com a célula e a oxidação ocorre na interfase polimérica, sendo o Fe^{3+} , produzido nesta interface pela oxidação microbiana do Fe^{2+} , o principal responsável pela oxidação dos sulfetos metálicos (HORTA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O mecanismo indireto independe da interação entre o micro-organismo e a superfície do mineral. A célula microbiana oxida íons Fe^{2+} a Fe^{3+} na solução lixiviante, e este último, por sua vez, oxida os sulfetos (SOUZA, 2005; HORTA, 2008). Caso ocorra a formação de enxofre elementar, o micro-organismo também é capaz de oxidá-lo produzindo sulfato (SOUZA, 2005). A equação 5 descreve o mecanismo de contato indireto e também o mecanismo indireto de não contato para sulfetos minerais.



Há indícios que todos os mecanismos ocorram simultaneamente na prática, envolvendo uma série de reações químicas, porém existe divergência sobre qual dos mecanismos é o dominante para o processo de lixiviação bacteriana (HENAO, 2010).

3.3 Biolixiviação da Calcopirita

A crescente demanda mundial de cobre vem acompanhada da necessidade de desenvolver novas tecnologias que sejam capazes de recuperar o metal de minérios de baixo teor (sulfetos de cobre) e que diminua os danos ambientais causados pela mineração. Essas tecnologias exigem um processo de baixo custo para garantir a sua viabilidade (WATLING, 2006).

O cobre é encontrado em diversos sulfetos metálicos, como a calcopirita (CuFeS_2), bornita (Cu_5FeS_4), calcocita (Cu_2S) e covelita (CuS) e também na forma de minerais oxidados como cuprita (Cu_2O), tenorita (CuO) e maloquita ($\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$). Além de ser um dos sulfetos mais abundantes na natureza, a calcopirita (CuFeS_2) detém cerca de 70% do cobre existente no planeta, o que faz com que seja o mineral mais explorado para extração (HORTA, 2008). No entanto, a calcopirita apresenta grande resistência tanto ao ataque químico quanto ao bacteriano, fazendo com que o processo biohidrometalúrgico para recuperação de cobre se torne inviável (FIRMINO, 2013).

A grande dificuldade de empregar a calcopirita na biolixiviação é a sua baixa reatividade tanto aos ataques químicos quanto microbiológicos. Esta baixa reatividade tem sido atribuída à formação de um filme de passivação que limita sua dissolução com o meio lixiviante (HENAO, 2010; FIRMINO, 2013). Este filme de passivação possui estrutura química ainda não definida, no entanto, ocorre redução na condutividade da superfície mineral impedindo a dissolução do sulfeto nas camadas mais internas. Dessa forma, os processos hidrometalúrgicos da calcopirita, não são frequentemente adotados pela indústria devido à baixa extração e cinética lenta. Entretanto, tais rotas vêm sendo estudadas, principalmente para os minérios de baixo teor e concentrados contendo impurezas como arsênio, cloro e flúor, no sentido de aumentar a utilização das reservas de cobre, reduzindo a quantidade de rejeitos originados da impossibilidade de extração de cobre deste tipo de mineral pelos métodos clássicos de piro e hidrometalurgia (MARTINS, 2015).

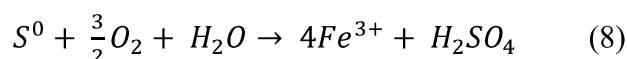
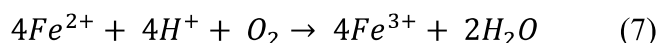
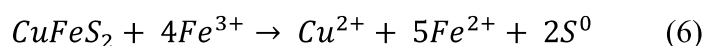
As dificuldades encontradas no processo de biolixiviação da calcopirita podem ser contornadas com a elevação da temperatura e a presença de cloreto. Desta forma, de acordo com os relatos da literatura, para que estas condições possam ser aplicadas, micro-organismos termófilos extremos podem ser utilizados como alternativa, desde que as condições favoráveis ao seu crescimento sejam mantidas (VELOSO, 2011; MARTINS, 2015). Da mesma forma, os micro-organismos mesófilos não promovem a biolixiviação da calcopirita com sucesso, devido à ocorrência de passivação após extração parcial do cobre (MARTINS, 2015). Os micro-organismos termófilos extremos apresentam outras vantagens na dissolução da calcopirita, melhorando a biolixiviação de duas maneiras (VELOSO, 2011; MARTINS, 2015):

- A velocidade de reação é elevada com o aumento da temperatura e;
- A extração do metal se eleva com o aumento da temperatura.

Os micro-organismos termófilos extremos, frequentemente associados ao processo de biolixiviação, pertencem ao domínio *Archaea* com temperaturas ótimas de crescimento entre 60 e 80°C, que suportam valores muito baixos de pH (1 a 2). Alguns micro-organismos se destacam: *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula*, *Metallosphaera hakonensis*, *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus rivotincti* e *Sulfolobus acidocaldarius*. Além destes, há micro-organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* que são capazes de

crescer em condições de temperatura elevada e baixo pH, um exemplo clássico é a espécie *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (VELOSO, 2011).

Martins (2015) afirma que a oxidação da calcopirita tem início com o ataque do Fe^{3+} ao mineral (Equação 6), recebendo os elétrons do enxofre que faz parte da composição da calcopirita ($CuFeS_2$). O micro-organismo tem a função de reoxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} (Equação 7) e o enxofre elementar (S^0) a SO_4^{2-} (Equação 8), regenerando o poder oxidante do meio e impedindo a deposição de enxofre elementar que reduziria ainda mais a capacidade de solubilização do mineral.



A extração de cobre da calcopirita também é facilitada com a adição de cloreto de sódio, uma vez que o cloreto impede a formação da camada de passivação. Entretanto, a presença de íons cloreto é prejudicial ao crescimento microbiano devido à elevação da pressão osmótica do meio. Esta pressão interfere no transporte de água através da membrana citoplasmática, indo do meio aquoso para o interior da célula. A adição de íons cloreto também interfere no potencial transmembrana, relacionado ao transporte de prótons (MARTINS, 2015). Assim, a presença de cloreto facilita a entrada de prótons (H^+) para o meio intra-celular, o que pode resultar em morte celular. Os micro-organismos acidófilos possuem um potencial de membrana interno positivo, que permite um fluxo de íons cloreto para o exterior da célula e com isso têm possível aplicação em processos de biolixiviação que utilizem tais íons (MARTINS, 2015).

3.4 Micro-organismos responsáveis pelos processos de biolixiviação

Existem diversos micro-organismos que apresentam potencial para aplicação nos processos de biolixiviação. A maioria destes micro-organismos foi isolada de áreas vulcânicas ou drenagens ácidas (Figura 3.2). Os micro-organismos encontrados nestes locais fazem parte do processo de lixiviação natural e, hoje, são estudados e utilizados com o objetivo de viabilizar economicamente processos industriais para recuperação de metais, de alto valor agregado, em minerais de baixo teor (BATISTA, 2009).



Figura 3.2 – Drenagem Ácida de Mina no Rio Tinto, na Península de Huelva, resultante da exploração de cobre do século XIX (JAMES, 2015).

Vários tipos de micro-organismos podem ser encontrados nos depósitos minerais, pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea* (COLLING, 2010). A característica geral dos micro-organismos que podem ser empregados em processos biohidrometalúrgicos é a capacidade de oxidar ferro ferroso, enxofre elementar e compostos reduzidos de enxofre, catalisando a dissolução de sulfetos metálicos (PINA, 2006).

Os gêneros microbianos comumente encontrados nos processos de oxidação de sulfetos metálicos são *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfolobus*, *Sulfobacillus* e *Acidianus* (PINA, 2006). Para que o processo de biolixiviação seja bem sucedido, é necessário conhecer as características dos micro-organismos que limitam o processo. Os limitantes de notável relevância estão ligados à capacidade de desenvolvimento do micro-organismo em condições agressivas. De acordo com Oliveira *et al.* (2010) os micro-organismos envolvidos na biolixiviação são, em geral acidófilos, quimiotróficos, autotróficos e desenvolvem-se em diferentes temperaturas. Os mesófilos se desenvolvem de 20 a 40°C, os termófilos moderados apresentam desenvolvimento no intervalo de 40 a 60°C, e os termófilos extremos, têm temperaturas ótimas de desenvolvimento acima de 60°C (HORTA, 2008; BATISTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

3.4.1 Domínio *Bacteria*

Este domínio apresenta micro-organismos de morfologia e genética bastante variadas. São células procarióticas, classificadas como gram positivas ou negativas, de acordo com a presença ou ausência de peptídeoglicano em sua parede celular,

respectivamente (MADIGAN *et al.*, 2006). Alguns micro-organismos pertencentes ao domínio *Bacteria* relacionam-se intimamente à biogeoquímica dos metais, de forma a interferir em sua mobilidade ou até mesmo na sua disponibilidade. Tais micro-organismos podem ser utilizados nos processos de biolixiviação para remover metais de matrizes insolúveis, para remediação de áreas contaminadas e extração de metais de rejeitos industriais. Os maiores destaques nos processos de biolixiviação pertencem aos gêneros *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* e *Sulfobacillus* (BATISTA, 2009).

O gênero *Acidithiobacillus* engloba quatro espécies pertencentes à divisão Proteobactéria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* e *Acidithiobacillus albertensis*, ilustrados pela figura 3.3. A porcentagem de guanina e citosina dentro do gênero varia de 52 a 64% (BATISTA, 2009).

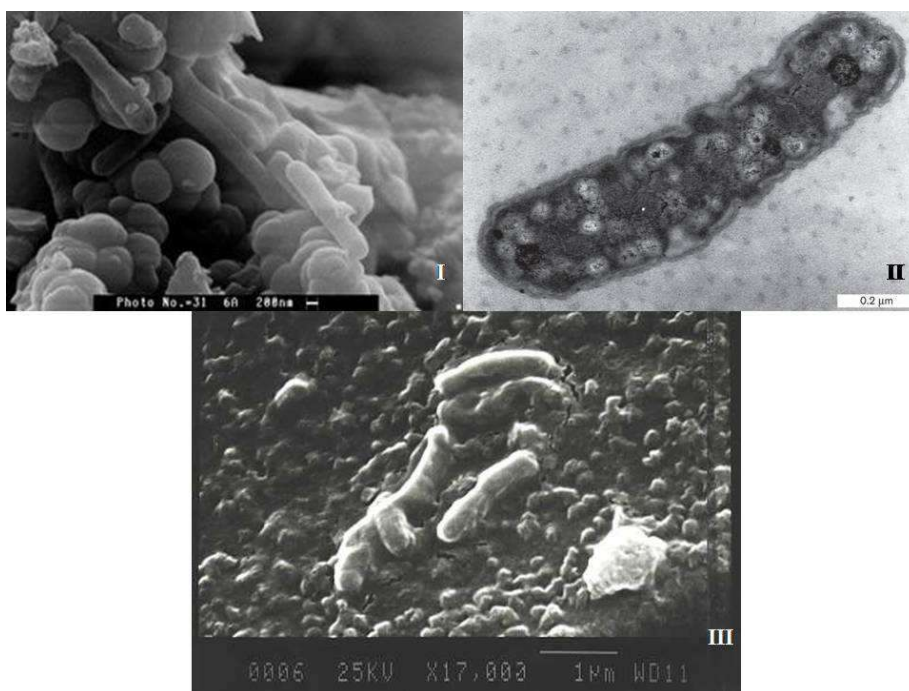


Figura 3.3 – Representação de bactérias acidófilas. I: *Acidithiobacillus caldus*; II: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, III: *Acidithiobacillus thiooxidans* (PATEL, 2014; SLONCZEWSKI e FOSTER, 2014; BACMAP, 2015).

Acidithiobacillus ferrooxidans

Esta espécie é considerada a principal bactéria envolvida no processo de biolixiviação. Entre os anos de 1951 e 1952 a bactéria foi descoberta e considerada

responsável pelo processo de biolixiviação de metais e da dissolução oxidativa de sulfetos minerais em geral (BATISTA, 2009; LIMA, *et al* 2013).

At. ferrooxidans possui forma de bastonetes gram negativos e é considerado não patogênico. As dimensões celulares médias variam de 0,5 a 0,8 μm de largura por 0,9 a 1,5 μm de comprimento. Seu crescimento pode acontecer na faixa de temperatura de 5 a 40°C, recebendo a classificação de mesófilo (LIMA, *et al* 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A espécie é aeróbia e acidófila, com faixa ótima de pH próxima de 2. A energia utilizada pela célula é obtida através da oxidação de Fe^{2+} ou formas reduzidas de enxofre (incluindo sulfetos metálicos), classificando-a como quimiotrófica (LIMA, *et al* 2013; HORTA, 2008).

A capacidade deste micro-organismo em oxidar sulfetos metálicos é grande, incluindo arsenopirita (FeAsS), bornita (Cu_5FeS_4), calcocita (Cu_2S), esfarelita (ZnS), galena (PbS), pirita (FeS_2), além de outros, reforçando a importância de utilizá-lo em tais processos. Mais relevante ainda é a resistência de *At. ferrooxidans* a concentrações de metais potencialmente tóxicos como cobre (Cu^{2+}), cromo (Cr^{3+}), cádmio (Cd^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e níquel (Ni^{2+}) (FIRMINO, 2013).

Acidithiobacillus thiooxidans

As características morfológicas e algumas fisiológicas desta espécie são semelhantes à *At. ferrooxidans*. O *At. thiooxidans*, ao contrário do *At. ferrooxidans*, é incapaz de oxidar Fe^{2+} , e se restringe ao uso de compostos de enxofre como doadores de elétrons. A faixa de pH varia de 0,5 a 5,5 e a espécie consegue suportar maiores concentrações de ácido sulfúrico (BATISTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Segundo Oliveira *et al.* (2010), a espécie *At. thiooxidans* é capaz de atuar na oxidação de covelita (CuS), galena (PbS) e esfalerita (ZnS), embora seja incapaz de oxidar a pirita (FeS_2). A espécie *At. thiooxidans* executa uma função importante nos sistemas de biolixiviação por ser capaz de oxidar enxofre elementar (S^0) e, como consequência, produzir ácido sulfúrico, que contribui para manutenção do sistema reacional na faixa ácida de interesse (BATISTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Leptospirillum ferrooxidans

No gênero *Leptospirillum*, apenas uma espécie apresenta efeito considerável para a biolixiviação, *Leptospirillum ferrooxidans*. Apresenta semelhanças metabólicas em relação ao gênero *Acidithiobacillus*. Tais semelhanças se resumem a tolerarem ambientes extremamente ácidos, com pH ótimo entre 1,5 a 1,8, serem gram negativas e quimioautotróficas (BATISTA, 2009). As diferenças se baseiam na sequência do gene rDNA 16S que classifica o gênero *Leptospirillum* à divisão *Nitrospira*, e na morforlogia celular, sendo estas bactérias espiraladas (BATISTA, 2009).

As dimensões celulares variam de 0,2 a 0,4 μm por 0,9 a 1,1 μm (BATISTA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). O *L. ferrooxidans* consegue suportar temperaturas próximas a 45°C e com isso é classificado como termófilo moderado. A capacidade de oxidação da bactéria se restringe ao íon ferroso em baixos e altos valores de potencial de redução, indicando alta afinidade por estes íons (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Sulfobacillus thermosulfidooxidans

A espécie bacteriana *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* é gram positiva, formadora de esporos e é considerada uma bactéria termófila moderada, com temperatura ótima de crescimento de 45°C. A bactéria também é acidofílica, apresentando faixa ótima de crescimento em pH de 2 a 2,5 (KARAVAJKO, 1990; TRAVISANI *et al.*, 2015). O gênero *Sulbacillus*, de forma geral, apresenta células na forma de bastão e não se encontram individualmente, apresentando-se em pares ou pequenas cadeias de células (RODRIGUES, 2012). O genoma da espécie possui 49,3% de conteúdo C-G (KARAVAJKO, 1990; TRAVISANI *et al.*, 2015).

O micro-organismo pode fixar carbono proveniente de dióxido de carbono ou utilizar compostos orgânicos para síntese de nutrientes necessários para a célula. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* também recebeu este nome devido à capacidade de oxidar ferro e enxofre do ambiente (KARAVAJKO, 1990; TRAVISANI *et al.*, 2015).

3.4.2 Domínio *Archaea*

No domínio *Archaea* existem micro-organismos potenciais para os processos de biolixiviação. O que determina este potencial é a sua capacidade de desenvolvimento em ambientes extremos, desde locais com temperaturas elevadas, até ambientes extremamente ácidos (BATISTA, 2009).

O domínio foi subdividido em quatro, de acordo com as sequências dos genes rDNA 16S dos micro-organismos: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* e *Nanoarchaeota* (ALQUÉRES *et al.*, 2007). Os micro-organismos são procariotos, na maioria dos casos, quimiolitotróficos, capazes de viver em condições extremas de pH e temperatura, ou seja, são classificados com termófilos extremos. Em geral, conseguem se desenvolver na presença ou ausência de oxigênio, com melhor desenvolvimento na presença de oxigênio, e podem colonizar as DAM, onde ferro e enxofre, nas formas reduzidas, estão presentes (BATISTA, 2009).

As características exclusivas das *Archaeas* se referem ao seu fenótipo, principalmente aos lipídeos de membrana. Os principais lipídeos que compõe a membrana de *Archaea* são os diéteres e tetraéteres de glicerol. Estas membranas em questão, são formadas por quatro unidades repetitivas de isopreno, formando cadeias laterais que se unem por meio ligações do tipo éter com as moléculas de glicerol. Esta estrutura produz uma monocamada lipídica, que é bastante resistente e estável à degradação, principalmente em altas temperaturas (MADIGAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2013).

A parede celular de *Archaeas* contém polissacarídeos similares ao peptideoglicano, glicoproteínas e proteínas. Algumas *Archaea* possuem pseudomureína, que é composta por ácido N-acetilalosaminurônico e apresenta ligações do tipo β -1,3, no lugar de ligações β -1,4 que ocorrem no peptideoglicano entre os açúcares da cadeia e não há D-aminoácidos na porção peptídica da molécula. Outro composto, que pode estar presente na parede celular é a metanocondroitina, um polímero de quatro açúcares, constituído de sulfato de condroitina (OLIVEIRA, 2013). Outro tipo de parede celular, e o mais comum entre *Archaeas*, é a camada superficial paracristalina, denominada camada S, composta por glicoproteínas ou proteínas. Estas proteínas usualmente estão ancoradas à membrana plasmática e conferem à camada a habilidade de se agrupar em arranjos cristalinos bidimensionais. A proteína pode assumir seis arranjos diferentes, indicados na figura

3.4.A. A organização estrutural das células de diferentes gêneros de *Archea* está representada na Figura 3.4.B (MADIGAN *et al.*, 2006; KLINGL, 2014).

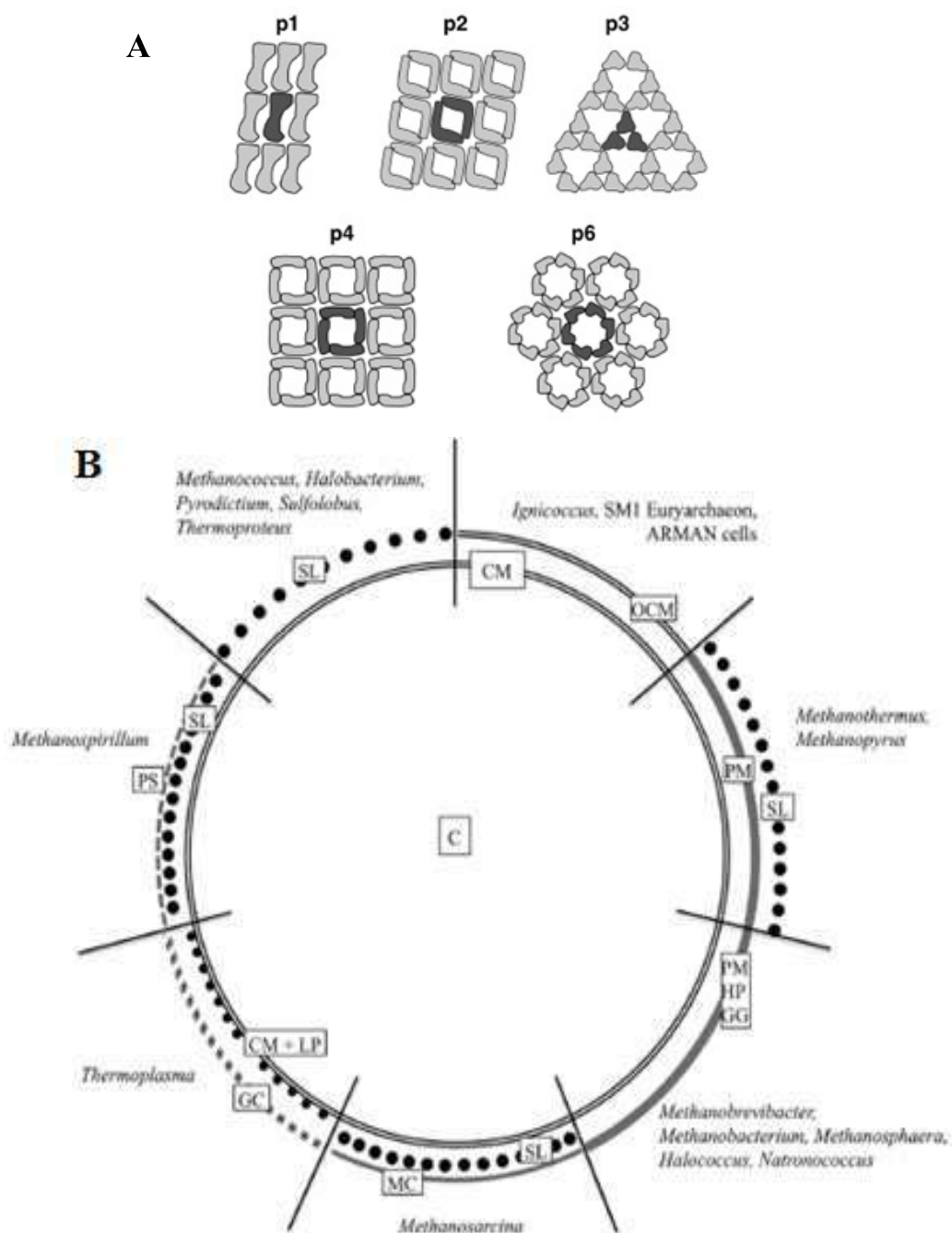


Figura 3.4 – A. Arranjos das subunidades da camada S em tipos de simetrias p1, p2, p3, p4, e p6. **B.** Organização estrutural da célula de *Archea* com representação dos gêneros mais comuns e relevantes e suas características morfológicas. Sendo C – citoplasma; CM – membrana citoplasmática; GC – glicocálice; GG - glutaminoglicano; HP - heteropolissacarídeo; LP - lipoglicano; MC - metanocondroitina; OCM – outra membrana; PM – pseudomureína; PS - invólucro de proteína; SL – camada S (KLINGL, 2014).

Devido à ausência de peptídeoglicano as *Archaeas* são resistentes a ação de lisozimas e penicilinas, agentes que o destroem ou inibem sua síntese (MADIGAN *et al.*, 2006).

Dentre os micro-organismos capazes de catalisar a lixiviação, as *Archaeas* termófilas dos gêneros *Sulfolobus* e *Acidianus* apresentam grande potencial biolixivante. Os micro-organismos termófilos são capazes de melhorar a cinética de extração do metal e a sua recuperação, principalmente quando se trata de sulfetos secundários. Alguns minérios como a molibdenita e a calcopirita, não são facilmente atacados por micro-organismos mesófilos. Em virtude destas características, a dissolução dos minerais por tais micro-organismos é facilitada, aumentando sua vantagem no processo (VELOSO, 2011; MARTINS, 2015).

Os gêneros de *Archaea* citados, *Sulfolobus* e *Acidianus*, foram isolados de fontes termais ácidas. O *Sulfolobus* apresenta células esféricas, lobuladas, com capacidade de se desenvolver em pH de 1 a 5 e também em ambientes ricos em enxofre, e em temperaturas de até 90°C. Podem ser considerados organismos mixotróficos, tanto quimiolitotrófico aeróbio quanto quimiorganotrófico. A forma mais comum de obtenção de energia da célula é por meio de oxidação de sulfetos ou enxofre elementar. Além destas oxidações *Sulfolobus* também realiza a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} em altas temperaturas, com velocidade específica reduzida se comparada aos demais substratos, o que permite sua aplicação em processos de lixiviação de minérios de cobre (VELOSO, 2011; MARTINS, 2015). O gênero *Acidianus* diferencia-se do *Sulfolobus* por sua capacidade de crescer anaeróbia e aerobicamente utilizando enxofre elementar (MARTINS, 2015).

Sulfolobus acidocaldarius

Sulfolobus acidocaldarius, de forma mais específica, representada pela figura 3.5, tem condições ótimas de crescimento na faixa de 75 a 80°C e pH entre 2 e 3, em condições estritamente aeróbias. A estirpe foi a primeira a ser caracterizada como hipertermoacidofílica e vem sendo utilizada como foco de estudos devido à similaridade de seus aparelhos de transcrição com o dos eucariotos. A espécie foi isolada de solos ácidos, fontes termais ácidas e em ambientes ricos em enxofre (CHEN *et al.*, 2005).

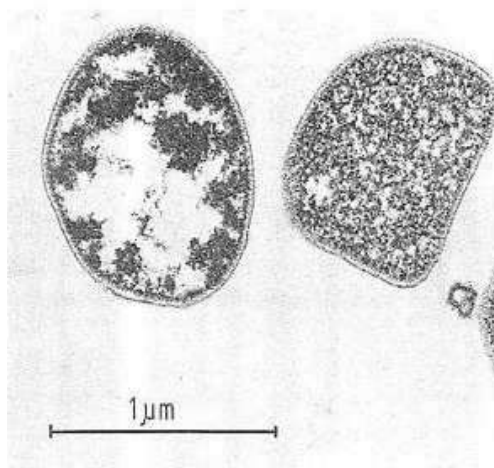


Figura 3.5 – *Sulfolobus acidocaldarius* (HANSKRAUSE, 2015).

Devido a baixas taxas de mutação apresentadas no desenvolvimento a altas temperaturas existe um grande interesse nos sistemas de reparo do micro-organismo. O genoma de *Sulfolobus acidocaldarius* é constituído por um cromossomo circular com 2.225.959 pares de bases e um conteúdo citosina-guanina de 36,7%. A espécie apresenta plasmídeos em sua constituição e um dos plasmídeos contidos na célula é responsável por facilitar a troca de DNA cromossômico com o meio intercelular, que é uma característica especial da espécie (CHEN *et al.*, 2005).

O desenvolvimento em altas temperaturas indica que a espécie *Sulfolobus acidocaldarius*, assim como as demais do gênero, tem mecanismos que estabilizam o DNA, mantendo-o intacto, e a camada lipídica, evitando seu rompimento (MADIGAN *et al.*, 2006). Madigan *et al.*, (2006) afirmam que devido a característica hipertermofílica, uma forma de DNA topoisomerase (*DNA girase reversa*) é produzida. A enzima introduz superenovelamentos positivos no DNA, de forma contrária à introduzida pela DNA girase convencional, o que estabiliza o DNA contra a desnaturação térmica.

3.4.3 Formação de Biofilmes em Sistemas de Biolixiviação

Os micro-organismos são frequentemente encontrados em superfícies, nos seus ambientes naturais, envolvidos por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) excretados pelas próprias células, formando a estrutura nomeada biofilme. Nesta estrutura as células formam uma comunidade e com isso têm múltiplos benefícios que envolvem o aumento da resistência contra as flutuações ambientais, como temperatura, pH e fornecimento de nutrientes (WATLING, 2006; KOERDT *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento do biofilme alguns fatores são de suma importância para este seja estabelecido. Os principais fatores envolvem a comunicação inter-celular, mecanismos de fixação celular e elementos genéticos relacionados à regulação do desenvolvimento do biofilme (KOERDT *et al.*, 2011).

A espécie *Sulfolobus acidocaldarius* expressa uma variedade de estruturas de superfície (flagelos e *pili*) que estão envolvidas na mobilidade e agregação celular a superfícies. As superfícies variam desde vidros a minerais sulfetados, como é o caso da pirita (KOERDT *et al.*, 2010). Estudos referentes à formação de biofilme de *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. tokodaii* e *S. solfataricus* demonstram que as condições do meio como pH e temperatura interferem na sua formação. Para valores de pH na faixa de 3 a 4 ocorre crescimento máximo das culturas no biofilme. Em temperatura elevada, *S. acidocaldarius* e *S. solfataricus* apresentam maior crescimento devido ao habitat natural, podendo ser verificado o aumento na formação do biofilme. Durante a maturação do biofilme é possível verificar a produção exopolissacarídeos, DNA extracelular e proteínas (KOERDT *et al.*, 2010).

A hipótese da ligação dos micro-organismos à superfície dos sulfetos minerais na biolixiviação, e as melhores taxas de dissolução destes sulfetos, foram utilizados como sugestão para o mecanismo direto de biolixiviação, discutido anteriormente. As interações entre o micro-organismo e o mineral resultam em alterações superficiais da célula, algumas delas podem ser citadas (WATLING, 2006):

- Em cultivo com enxofre, verificou-se a presença de lipopolissacarídeos de adesão no substrato sólido que inibem uma fase de baixo desenvolvimento dos micro-organismos, que é verificada em cultivo com enxofre solúvel.
- Células com camadas de exopolissacarídeos removidas não podem se conectar à covelita até que a camada seja regenerada.
- As células microbianas podem utilizar a composição química dos seus exopolissacarídeos para se adaptar ao seu substrato. Os EPS poderiam complexar o Fe^{3+} através de ácidos urônicos e outros resíduos presentes na superfície do mineral, que resultaria numa melhora da oxidação sobre os sulfetos.

- A redução dos íons Fe^{3+} pode envolver a camada de EPS na biolixiviação em condições aeróbias.

Existem relatos que a maioria dos micro-organismos cresce ligada à superfície dos sulfetos minerais em diversos processos de biolixiviação e que a formação e adesão microbiana ao biofilme podem fornecer um mecanismo no qual a fonte de energia se aproxima da célula e facilita o processo (WATLING, 2006).

3.5 Métodos moleculares para estudo dos micro-organismos envolvidos em processos de Biolixiviação

A identificação molecular dos micro-organismos fornece informações específicas e particulares de cada espécie. Por meio das técnicas empregadas é possível conhecer a diversidade do meio analisado, sem a necessidade de cultivo, e com isso determinar a existência de espécies não cultiváveis (JUNIOR *et al*, 2002).

O fundamento das técnicas moleculares de determinação da diversidade microbiana, neste tipo de ambiente, se baseia na sequência do DNA, principalmente no gene correspondente à subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA) (WETLER-TONINI *et al*, 2011). De acordo com Wetler-Tonini *et al*. (2011), a caracterização de uma espécie pode ser feita através da clonagem de fragmentos amplificados por PCR, utilizando iniciadores universais que amplificam as sequências-alvo comuns a diversos organismos, e posterior sequenciamento, bem como por hibridização do DNA da amostra com sondas de *Southern Blotting* ou de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) ou pelo sequenciamento direto dos produtos de PCR amplificados.

Como citado, o gene que codifica o 16S rRNA é o principal fator de identificação molecular microbiana. O gene em questão apresenta vantagens como estar presente em todos os micro-organismos, pois o rRNA faz parte da síntese protéica e o gene codificador é conservado em estrutura e funcionalidade nas células microbianas (RODRIGUES, 2012).

A identificação e a avaliação da diversidade dos micro-organismos associados ao processo de biolixiviação pode ser feita por uma variedade de métodos microbiológicos e bioquímicos. Alguns métodos podem ser citados como sequenciamento do gene 16S rDNA, análise dos fosfolipídeos da membrana, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), a

PCR (reação de polimerização em cadeia) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (WATLING, 2006; RODRIGUES, 2012). No caso da biolixiviação, a diversidade microbiana é pequena, tornando reduzido o número de técnicas moleculares empregadas na determinação da diversidade do meio. As mais comuns são o sequenciamento, a PCR e a DGGE (RODRIGUES, 2012). Neste trabalho a técnica da PCR convencional foi utilizada para determinação de espécies presentes no sistema de lixiviação da calcopirita com adição de cloreto de sódio.

3.5.1 Bibliotecas de 16S rRNA

O gene que codifica o 16S rRNA contém a sequência e funcionalidade bastante conservadas e apenas uma pequena parte apresenta uma variação interespecies. A sequência é bastante utilizada em análises moleculares, pois permite a identificação de organismos atingindo de gênero até espécies, possibilitando a correlação entre genótipo e ambiente (NAKANO, 2008).

Em média 1500 nucleotídeos estão presentes no gene 16S rDNA. A estrutura primária apresenta regiões alternadas de alta e baixa variabilidade (QUINTAES, 2012). Quintaes (2012) afirma que as regiões com sequências variáveis contêm informação de baixo nível filogenético, enquanto, as regiões com sequências conservadas contêm informação dos eventos evolutivos.

As relações filogenéticas podem ser reconstruídas quando o RNA ribossomal é utilizado como marcador molecular. As características relacionadas à molécula 16S rDNA, como tamanho e facilidade de manuseá-lo, apresentam vantagens em sua utilização nas técnicas moleculares (QUINTAES, 2012).

O gene codificador para 16S rRNA tem sido sequenciado para diversas espécies e depositados em bancos de dados de sequências. No *GenBank*, o maior destes bancos de dados, existem 90.000 sequências referentes ao gene 16S rDNA cadastradas, o que permite comparar a sequência das linhagens desconhecidas com as sequências disponíveis (QUINTAES, 2012).

3.5.2 Extração de DNA

As técnicas moleculares, sejam elas para quaisquer finalidades, dependem de uma característica em comum, que o material genético dos organismos em questão esteja purificado e com qualidade. As metodologias de extração de DNA visam obter um DNA de alta qualidade com quantidade suficiente (IORIS, 2008).

A escolha de um método de extração deve levar vários fatores em consideração. Um destes fatores, de significativa relevância, reside nas diferenças de composição das paredes celulares presentes nos diferentes micro-organismos. Assim, as extrações devem ser planejadas considerando as diferenças estruturais de cada espécie (BARATTO e MEGIOLARO, 2012).

Dentre as diversas tecnologias de extração existentes a extração orgânica é a mais utilizada. O método baseia-se na separação do DNA da célula a partir da lise celular com um detergente, sendo o mais utilizado o SDS (dodecil sulfato de sódio) e posterior purificação com fenol-clorofórmio, que têm a função de separar DNA e proteínas, garantindo a pureza do material genético extraído. O passo posterior utiliza o álcool para promover a precipitação do DNA e, em seguida, dissolvê-lo em água ultra-pura ou tampão para estocagem e posterior utilização (BARATTO e MEGIOLARO, 2012).

De forma geral, uma extração de material genético de boa qualidade depende de alguns pontos (i) quantidade de DNA extraído; (ii) pureza da preparação de DNA; (iii) integridade do DNA e (iv) representatividade da comunidade ambiental. A quantidade de DNA extraído depende dos métodos de extração utilizados. Métodos mais rigorosos, em geral, aumentam a quantidade de DNA e ao mesmo tempo interferem na sua pureza e integridade. A pureza do DNA depende da quantidade de contaminantes presentes na amostra. Para manter a integridade do DNA, métodos com menor rigor devem ser utilizados, de forma que a fragmentação excessiva do DNA não seja promovida. Os métodos de extração podem interferir também na representatividade da diversidade microbiana (IORIS, 2008).

Os protocolos que propiciam a extração de DNA apresentam algumas etapas em comum. A primeira etapa é a lise celular, seguida de remoção de componentes que não representam o material genético, como proteínas, lipídeos e polissacarídeos, e,

posteriormente, precipitação do DNA objetivando a concentração do mesmo (ROSA, 2006).

Para a lise ou rompimento celular existem diversas técnicas, que podem ser baseadas em princípios mecânicos, não mecânicos, químicos ou enzimáticos (ROSA, 2006).

O rompimento da célula por meio de forças de cisalhamento e cavitação, denominado lise mecânica, é efetivo e pode ser utilizado associado a outro método (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005; ROSA, 2006). Outros métodos físicos podem ser aplicados como choque osmótico e termólise. Em geral são realizadas etapas sequenciais de congelamento e descongelamento da amostra associadas a métodos químicos ou enzimáticos (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005).

No rompimento baseado em princípios químicos, reagentes atuam sobre a membrana ou parede celular promovendo sua lise. Os detergentes ou sais biliares são os mais usados neste tipo de rompimento. Tais reagentes atuam sobre a parte hidrofóbica da membrana ou parede celular, resultando na formação de poros ou removendo o envoltório de forma integral (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005; ROSA, 2006).

Enzimas também são empregadas para romper as membranas ou paredes por meio de hidrólise. As enzimas são aplicadas em casos de sensibilidade a vários fatores como temperatura, tensão de cisalhamento, agentes químicos ou fatores que impossibilitem o uso de outros métodos (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005). As principais enzimas empregadas são a proteinase K e a lisozima (ROSA, 2006). A lisozima promove a quebra das ligações glicosídicas $\beta 1,4$ presentes no peptídeoglicano entre os resíduos de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina (JOHNSON, 2005). Em relação à proteinase K, sua ação é realizada de forma direta sobre a queratina e na digestão de proteínas. O EDTA é frequentemente utilizado com a lisozima, com o intuito de remover íons Mg^{2+} , que ajudam a estabilizar as membranas ou paredes celulares, e também na inibição de enzimas que degradam o DNA (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005; NELSON E COX, 2011).

A purificação do DNA, proveniente da lise celular, pode ser realizada de diversas maneiras. Este processo visa remover os contaminantes presentes no meio, como restos celulares, proteínas e reagentes provenientes das etapas anteriores da extração. O método a

ser aplicado é específico para cada amostra, pois depende da composição do meio obtida (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005). As técnicas com uso de fenol-clorofórmio apresentam sucesso para remoção de proteínas do meio. Além de precipitar as proteínas garante-se, utilizando o pH adequado (aproximadamente 8,0), que o DNA permaneça em solução (BROWN, 2003; ROSA, 2006).

O grande número de etapas e reagentes utilizados para purificação do DNA gera uma solução muito diluída, o que não é interessante. Assim, métodos para concentrar o DNA na amostra são aplicados utilizando reagentes e equipamentos específicos para o procedimento. A precipitação com etanol ou isopropanol, seguida de centrifugação e reidratação em água é usualmente utilizada. Os sais sob temperatura controlada potencializam a ação precipitante do álcool sobre os ácidos nucleicos (BROWN, 2003).

Após aplicar qualquer método de extração é necessário avaliar sua eficiência quanto à integridade e qualidade do DNA obtido (PIRES e TEIXEIRA, 2004; ROSA, 2006). A quantidade de DNA obtida pode ser avaliada através do método de espectrofotometria de absorvância de ultravioleta (UV) de forma precisa. A radiação UV absorvida pela amostra é diretamente proporcional à quantidade de DNA presente. A concentração é determinada pela absorvância em um comprimento de onda de 260 nm. A relação da concentração com a absorvância pode ser dada pelos valores de referência 50 µg de DNA fita dupla por mL de solução para absorvância igual a 1 (BROWN, 2003).

A pureza da amostra é determinada pela razão das absorvâncias a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}). A relação A_{260}/A_{280} determina uma amostra com alto grau de pureza com valores superiores a 1,8 e leituras inferiores indicam contaminação por proteínas (BROWN, 2003). Outros contaminantes também podem ser identificados através da relação A_{260}/A_{230} (ROSA, 2006).

A avaliação da integridade do DNA é feita por eletroforese em gel de agarose e também pela técnica de PCR (ROSA, 2006; IORIS, 2008).

3.5.3 Reação de polimerização em cadeia – PCR

Esta técnica foi desenvolvida com a finalidade de amplificar segmentos de DNA de forma rápida e *in vitro*. Nesta reação as moléculas de DNA são multiplicadas bilhões de

vezes, e os fragmentos amplificados podem ser posteriormente usados em outros experimentos moleculares como a clonagem e o sequenciamento (MADIGAN *et al.*, 2006).

Para que a PCR seja realizada são necessárias duas sequências de nucleotídeos iniciadores (*primers*) que fazem hibridização com as fitas opostas, nas regiões que delimitam o segmento a ser amplificado (SCHAEFER, 2006). Uma enzima, DNA polimerase, também é requerida para a síntese das novas moléculas de DNA. Esta enzima sintetizará a nova fita de DNA a partir das sequências nucleotídicas iniciadoras (MADIGAN *et al.*, 2006).

A técnica consiste de três etapas básicas: (i) a primeira se refere à desnaturação do DNA fita dupla e ocorre a 92 a 96°C; (ii) na segunda etapa ocorre o resfriamento a determinada temperatura que permita o anelamento dos *primers* ao DNA, esta temperatura é específica para cada par de iniciadores e (iii) a terceira é a extensão dos iniciadores formando novas fitas de DNA, complementares à fita molde, através da ação da DNA polimerase, com temperatura ótima de atividade em torno de 72°C. Estas etapas formam o ciclo da PCR e são repetidas por cerca de vinte e cinco a trinta e cinco vezes, de acordo com as características de cada sequência ou espécie (BROWN, 2003; SCHAEFER, 2006).

Em cada ciclo formam-se novas moléculas que serão moldes para os ciclos posteriores. O DNA é duplicado a cada ciclo e, considerando o número de ciclos, ocorre um aumento de 10^6 a 10^9 vezes a quantidade da sequência alvo (BROWN, 2003).

Inicialmente a técnica de PCR empregava a DNA polimerase de *Escherichia coli*, porém a enzima sofria desnaturação a cada ciclo devido à elevação da temperatura, na primeira etapa do ciclo, e havia, então, a necessidade de repor a enzima a cada ciclo. A modernização da técnica ocorreu com o emprego de uma enzima proveniente de uma espécie termotolerante, *Thermus aquaticus*. A enzima, denominada *Taq* polimerase, é estável a 95°C e com isso não é afetada durante a etapa de desnaturação. Além disso, com a aplicação desta enzima houve um aumento da especificidade da reação, que pôde sintetizar as novas fitas de DNA a 72°C, impedindo anelamentos inespecíficos que ocorrem em baixas temperaturas (MADIGAN *et al.*, 2006).

Esta técnica, além de produzir uma quantidade muito grande de DNA alvo, necessita de um número muito pequeno de moléculas de DNA na amostra e com isso também possibilita identificar micro-organismos presentes em amostras mesmo que estejam em baixas concentrações celulares (BROWN, 2003).

O DNA obtido através da PCR pode ser empregado em outras técnicas como a clonagem e o sequenciamento de determinados genes. Considerando que os iniciadores utilizados na PCR não necessitam ser totalmente complementares, a técnica pode ser empregada para estudos comparativos ou evolutivos em organismos e ambientes (MADIGAN *et al.*, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo das amostras de biolixiviação para extração de DNA

A cultura de *Sulfolobus acidocaldarius* foi adquirida de coleções depositadas na *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ 639), mantida em *shaker* (New Brunswick Scientific) a 70°C e sob agitação de 150min⁻¹. Utilizou-se o meio de cultura DSMZ 88 modificado: 1,3g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,28g/L de KHPO₄, 0,25g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,07g/L de 8 CaCl₂·2H₂O, 0,02g/L de FeCl₃·6H₂O, 1,80mg/L de MnCl₂·4H₂O, 4,5mg/L de NaB₄O₇·10H₂O, 9 0,22mg/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,05mg/L de CuCl₂·2H₂O, 0,03mg/L de Na₂MoO₄·2H₂O, 0,03mg/L de VOSO₄·2H₂O, 0,01mg/L de CoSO₄ e 0,1g/L extrato de levedura. O concentrado calcopirítico foi adicionado ao meio e as culturas foram adaptadas a concentração de 1,0 mol L⁻¹ de cloreto utilizadas nos ensaios de biolixiviação em condições não estéreis (MARTINS, 2015).

As amostras utilizadas para extração de DNA foram obtidas em membranas de celulose de poro 0,22 µm, resultantes de processo de filtração do sistema de biolixiviação de calcopirita. O sistema de lixiviação também foi realizado na ausência de cloreto, como controle. Este cultivo era realizado no Laboratório de Bio&Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto e as amostras para extração de DNA genômico eram fornecidas já filtradas.

Um volume de 200 mL de solução lixiviada, contida em *erlenmeyer* (250 mL) e submetido às condições acima descritas, foi inicialmente filtrado em papel filtro quantitativo com poro de 7,5 µm (faixa preta), este meio foi novamente filtrado em papel de filtro com poro de 3,0 µm (faixa azul) e, neste caso, com o auxílio da bomba de vácuo. Estas duas etapas tinham o objetivo de remover os sólidos minerais presentes no meio lixiviante. Posteriormente, este meio líquido foi novamente filtrado em membrana de celulose 0,22 µm com o conjunto de filtração *Millipore*.

As membranas então obtidas foram lavadas com água ácida para remoção do excesso de metais e, posteriormente, com água destilada. Estas membranas foram armazenadas em placas de Petri na geladeira até o momento da extração de DNA genômico. A membrana obtida está ilustrada na figura 4.1.



Figura 4.1 – Membrana de celulose 0,22 μm , obtida após filtração do meio de biolixiviação de calcopirita, cultivado na presença de cloreto de potássio a 70°C.

4.2 Métodos de extração de DNA das membranas

Avaliaram-se quatro métodos de extração de DNA para o sistema de biolixiviação utilizado: (i) extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio; (ii) extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por *kit* Wizard[®] Promega e tampão de lise enzimático; (iii) extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio com pérolas de vidro; (iv) extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio, pérolas de vidro e tampão de lise enzimática. Estes métodos serão descritos a seguir.

4.2.1 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio

As membranas obtidas na filtração, descrita no item 4.1, foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas em tubos falcon. Adicionou-se NaCl 5 mol L⁻¹ e EDTA 0,5 mol L⁻¹ até que as tiras de membrana fossem cobertas, com um volume aproximado de 2 mL, e agitou-se em vórtex até que as células fossem transferidas da membrana para a solução. A solução resultante foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 rpm durante 10 minutos, descartando, em seguida, o sobrenadante. Foram adicionados 250 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ pH 7,5, EDTA 1 mmol L⁻¹ pH 7,5, SDS 2%). A solução foi suavemente agitada e incubada a 55°C por 15 minutos. Após o período da incubação, adicionou-se 50 µL de proteinase K e manteve-se a 55°C por mais 60 minutos. A solução foi resfriada à temperatura ambiente. Adicionou-se 325 µL de clorofórmio e 325 µL de fenol e a mistura foi homogeneizada no vórtex. Centrifugou-se, novamente, a 13.000 rpm por 10 minutos.

As etapas seguintes foram realizadas em baixas temperaturas. Transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo e adicionou-se 10 µL de NaCl 5 mol L⁻¹ e o dobro do volume obtido do sobrenadante transferido de etanol absoluto. Homogeneizou-se o microtubo suavemente. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70%, e após centrifugação os microtubos foram levados à capela de fluxo laminar até completa secagem. Ressuspendeu-se o precipitado com 50 µL de água ultra pura estéril.

4.2.2 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por *kit* Wizard[®] Promega e tampão de lise enzimático

As membranas obtidas da filtração, descrita no item 4.1, foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas em tubos falcon. Adicionou-se NaCl 5 mol L⁻¹ e EDTA 0,5 mol L⁻¹ e agitou-se em vórtex até que as células fossem transferidas da membrana para a solução. A solução resultante foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 rpm durante 10 minutos, descartando, em seguida, o sobrenadante. Adicionou-se 480 µL de EDTA 50 mmol L⁻¹, 60 µL de lisozima e esta mistura foi incubada a 37°C por uma hora. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 3 minutos e adicionou-se 60 µL de proteinase K, com tampão adequado. A mistura foi incubada a 55°C por uma hora. Posteriormente,

adicionou-se 600 μL de “*Nuclei Lysis Solution*” e a extração seguiu-se conforme orientações do fabricante.

4.2.3 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio com pérolas de vidro

As membranas obtidas como descrito no item 4.1 foram lavadas com tampão Tris-HCl 0,5 mol L^{-1} , na placa de Petri, até que o valor do pH estivesse próximo de 7, aferido com tira de pH. Estas membranas foram cortadas e inseridas em um tubo falcon de 15 mL, com um volume de aproximadamente 2 mL preenchido com pérolas de vidro. Adicionou-se tampão Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,5 e EDTA 1mmol L^{-1} pH 7,5 até que as membranas com as pérolas de vidro estivessem cobertas. O tubo foi levado ao vórtex e agitado por 5 minutos, esta agitação foi novamente repetida por mais 5 minutos. Adicionou-se sarcosina 5% e a solução foi suavemente agitada. O tubo foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos. O líquido foi transferido para um microtubo ou tubo falcon, de acordo com o volume obtido. Incubou-se a 55°C durante 5 minutos e adicionou-se proteinase K (100 mg mL^{-1}), correspondendo a 20% do volume final de líquido obtido. Manteve-se a temperatura a 55°C por 60 minutos. Ao final da incubação adicionou-se 70 μL de solução de acetato de sódio 3M (pH 5), 200 μL de fenol equilibrado com Tris (pH 7,5) e 100 μL de clorofórmio. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e 200 μL de clorofórmio foram adicionados, seguida de nova centrifugação. A fase aquosa foi novamente transferida e o mesmo volume de solução obtido foi adicionado de isopropanol para a precipitação do DNA. Incubou-se a solução a -20°C por 1 hora. Centrifugou-se a 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Lavou-se o precipitado com 300 μL de etanol gelado, centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Evaporou-se o restante do etanol em temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar, e o precipitado foi ressuspendido em 50 μL de água ultra pura estéril.

4.2.4 Extração de DNA cromossômico de sistema de lixiviação de calcopirita por fenol-clorofórmio, pérolas de vidro e tampão de lise enzimática

As membranas obtidas como descrito no item 4.1 foram lavadas com tampão Tris-HCl 0,5 mol L^{-1} na placa de Petri até que o valor do pH estivesse próximo de 7, aferido com tira de pH. Estas membranas foram cortadas e inseridas em um tubo falcon de 15 mL, com um volume de aproximadamente 2 mL preenchido com pérolas de vidro. Adicionou-

se 250 μL de solução de sacarose 20% preparada em tampão Tris-HCl (Tris-HCl 50 mmol L^{-1} pH 7,5, EDTA 1 mmol L^{-1} pH 7,5). Adicionou-se 250 μL de solução de lisozima 5 mg mL^{-1} e esta mistura foi suavemente agitada. A solução foi incubada a 37°C por 60 minutos e agitada suavemente em intervalos de 10 minutos.

Adicionou-se 100 μL de solução de sarcosina 5% e proteinase K 10 mg mL^{-1} , preparada em tampão Tris-HCl, e a solução foi suavemente homogeneizada. Incubou-se a solução a 37°C por 60 minutos e a cada 10 minutos promovia-se uma agitação suave.

Adicionou-se 70 μL de solução de acetato de sódio 3M (pH 5), 200 μL de fenol equilibrado com Tris (pH 7,5) e 100 μL de clorofórmio. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. Adicionou-se 200 μL de clorofórmio seguido de nova centrifugação. A fase aquosa foi novamente transferida e o mesmo volume de solução obtido foi adicionado de isopropanol para promover a precipitação do DNA. Incubou-se a solução a -20°C durante 1 hora e, com a finalização desta etapa, centrifugou-se a 13.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Lavou-se o precipitado com 300 μL de etanol frio, centrifugou-se a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Evaporou-se o restante do etanol a temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar, e o precipitado foi ressuspendido em água ultra pura estéril.

4.3 Determinação da concentração de DNA e da pureza da amostra

A concentração de DNA após os procedimentos de extração foi obtida utilizando equipamento NanoVue Plus da Ge Healthcare®. A pureza da preparação foi determinada pelas relações A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} dadas pelo mesmo equipamento.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Preparou-se o gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TBE 0,5X concentrado para amostras de extração de DNA genômico e 1,2% (p/v), no mesmo tampão, para amostras de PCR.

A cuba foi preenchida com tampão TBE 0,5X concentrado. As amostras de DNA (5 μL) foram misturadas ao tampão de corrida Neotaq® (5 μL) e aplicadas nas canaletas do

gel. O mesmo procedimento foi realizado para o padrão de peso molecular de 100 bp da Norgen[®] ou 1 kb da RBC[®].

O gel foi corado em brometo de etídio 10 mg mL^{-1} (Amresco[®]) por 20 minutos. O resultado foi observado em transiluminador Locus modelo L.PIX[®], sob luz ultravioleta, para detecção de bandas e fotodocumentação dos géis.

4.5 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Os reagentes necessários para execução da técnica foram retirados do *freezer* e mantidos em banho de gelo, o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Preparou-se o *mix* de PCR sem o DNA, conforme descrito na tabela 4.1. Distribuiu-se $46 \mu\text{L}$ do *mix* em cada microtubo de $0,2 \text{ mL}$ e $4 \mu\text{L}$ da amostra de DNA genômico, homogeneizou-se suavemente. Os tubos com a reação pipetada foram levados ao termociclador, programado de acordo com a tabela 4.2. Ao final do ciclo de PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose, como descrito no item 4.4.

Tabela 4.1: Reagentes utilizados na reação de PCR (volume final igual a $50 \mu\text{L}$)

Reagente	Volume (μL)	Concentração Final
Tampão da reação 10x	5,0	1x
MgCl_2 (25mM)	3,0	$1,5 \text{ mmol L}^{-1}$
dNTPs (10mM)	1,0	$0,2 \text{ mmol L}^{-1}$
Solução de <i>primers</i> específicos diretos e inversos ($10 \mu\text{M}$)	2,0	$0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$
<i>Taq</i> DNA polimerase ($5 \text{ u}/\mu\text{L}$)	1,0	$5 \text{ u}/50 \mu\text{L}$
H_2O Milli-Q esterilizada	34,0	-
DNA genômico ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	4,0	$100 \text{ ng}/50 \mu\text{L}$

Tabela 4.2 – Programação da reação de PCR no termociclador. **Etapa 1:** Desnaturação inicial; **Etapa 2.1:** Desnaturação; **Etapa 2.2:** Anelamento; **Etapa 2.3:** Extensão; **Etapa 3:** Final da Extensão e; **Etapa 4:** Resfriamento.

Condições	Etapa 1	35 ciclos			Etapa 3	Etapa 4
		Etapa 2.1	Etapa 2.2	Etapa 2.3		
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	94	94	50	72	72	4
Tempo (min.)	3	1	1	1 e 30 s	15	

Obs: A etapa 2.2 foi realizada também a 55°C , com as demais etapas mantidas.

Os par de primers utilizado, foi o par universal para o gene 16S rDNA, 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3').

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras de DNA obtidas através dos protocolos de extração utilizados neste trabalho

Os quatro protocolos de extração resultaram em 10 amostras. As amostras receberam nomenclatura de acordo com o método de extração e a condição de cultivo do sistema de lixiviação. A tabela 5.1 representa as amostras obtidas, as condições das quais elas se originaram e o método de extração aplicado. Como as amostras eram da mesma origem e cultivadas em condições semelhantes, diferindo apenas na presença ou ausência de íons cloreto no meio, os métodos utilizados foram distribuídos de forma aleatória a fim de obterem-se melhores rendimentos em extração de DNA genômico.

Tabela 5.1 – Tabela de identificação das amostras de DNA obtidas através dos métodos de extração utilizados. Dois tipos de amostras foram estudados, meio de lixiviação suplementado com 1 mol L⁻¹ de íons cloreto (presença de cloreto) e meio não suplementado com íons cloreto (ausência de cloreto).

Amostra	Condição do meio de lixiviação	Método de extração
<u>1</u>	Ausência de Cloreto	4.2.2
<u>2</u>	Presença de Cloreto	4.2.2
<u>3</u>	Presença de Cloreto	4.2.2
<u>4</u>	Presença de Cloreto	4.2.2
<u>5</u>	Ausência de Cloreto	4.2.1
<u>6</u>	Presença de Cloreto	4.2.1
<u>7</u>	Presença de Cloreto	4.2.1
<u>8</u>	Ausência de Cloreto	4.2.3
<u>9</u>	Ausência de Cloreto	4.2.3
<u>10</u>	Presença de Cloreto	4.2.4

As amostras 2, 3 e 4 foram obtidas da mesma membrana, da mesma forma como as amostras 6 e 7. Isto foi necessário, pois membrana obtida da filtração do meio na presença de cloreto necessitou de um maior volume inicial de tampão para o desprendimento das células e sendo necessária a fragmentação da amostra, devido ao volume do microtubo (1,5 mL) utilizado na centrifugação.

Este aumento do número de amostras, resultantes da mesma membrana, gerou uma diluição da amostra, pois diminuiu o número de células e consequentemente a

concentração de DNA em solução. Este fato pôde ser confirmado com a eletroforese em gel de agarose (0,8%), que não apresentou bandas em nenhuma amostra proveniente das extrações realizadas. Para as demais amostras também não foram observadas bandas no gel de agarose, fato este que será discutido no item subsequente.

5.2 Avaliação da concentração e da pureza do DNA obtido

Através do equipamento Nano Vue Plus da GE® as concentrações de DNA e a presença de contaminantes em cada amostra puderam ser definidas através das absorbâncias obtidas, como está descrito na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Concentração de DNA ([DNA]) e relação de absorbâncias que indicam a pureza as preparações de DNA (A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230}).

Amostra	[DNA] (ng μ L ⁻¹)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
<u>1</u>	6,9	1,427	2,108
<u>2</u>	13,7	1,311	0,703
<u>3</u>	13,0	1,281	0,578
<u>4</u>	7,3	1,187	0,760
<u>5</u>	8,6	1,500	-1,71
<u>6</u>	5,0	1,207	0,283
<u>7</u>	3,9	1,604	0,362
<u>8</u>	39,5	1,215	1,491
<u>9</u>	11,5	1,106	1,085
<u>10</u>	23,5	1,205	0,701

A tabela 5.2 permite observar a baixa concentração de DNA em todas as amostras.

Algumas hipóteses estão relacionadas com esta baixa concentração de DNA obtida. No procedimento de obtenção das membranas, havia um pequeno número de células, pois a filtração foi realizada com apenas 200 mL de meio. Ao mesmo tempo, existe a possibilidade das células presentes em solução formarem biofilme e ficarem aderidas à matriz mineral. Como a extração de DNA do minério não foi realizada, há grandes chances de a maioria das células terem permanecido aderidas nesta matriz, que tem a formação de biofilme aumentada para a espécie *Sulfolobus acidocaldarius* em valores baixos de pH e altas temperaturas, como é o caso deste cultivo (KOERDT *et al.*, 2010).

A hipótese mais correta, que explica a baixa concentração de DNA, é a ineficiência dos métodos de extração, quanto às características específicas da espécie a ser lisada, ou seja, os métodos de extração não foram específicos para a espécie de *Sulfolobus acidocaldarius*.

Outra análise pode ser realizada com os resultados presentes na tabela 5.2, referente à concentração de DNA na presença ou ausência de cloreto, não havendo relação entre os valores de concentração obtidos para amostras com a mesma condição de cultivo. As amostras 1, 5, 8 e 9 são provenientes dos controles de cultivo, na ausência de cloreto, e apresentaram resultados bem variados no que se refere à concentração de DNA. As amostras obtidas de cultivo na presença de cloreto apresentaram a mesma variação. Além disso, é preciso considerar que as amostras 2, 3 e 4, assim como 6 e 7; 8 e 9 resultaram da mesma membrana. Dessa forma, haveria uma concentração de DNA muito maior caso as amostras não tivessem sido divididas.

Além da baixa concentração de células presentes nas membranas, os métodos de extração podem ter apresentado menor eficiência devido às características da parede celular e membrana citoplasmática de *Sulfolobus acidocaldarius* em relação aos reagentes utilizados. Em bactérias Gram positivas, métodos de extração com ação de lisozima são bastante eficientes. A enzima ataca as ligações β 1,4 do peptideoglicano fazendo com que as células ganhem poros ou rompam completamente sua parede celular. Assim, o DNA é liberado para o meio externo. O caso de *Sulfolobus acidocaldarius* se diferencia das bactérias. A espécie pertence ao domínio *Archaea* e não possui peptideoglicano como constituinte da parede celular. *S. acidocaldarius* apresenta ligações β 1,3 entre os açúcares constituintes de sua parede celular e, por isso, a lisozima não consegue clivar tais ligações. Dessa forma, os protocolos que utilizaram lisozima para o rompimento da parede celular não seriam eficientes para estes micro-organismos. As melhores aplicações se baseariam em forças mecânicas para lisar as células.

Os protocolos de extração com o uso de pérolas de vidro (4.2.3 e 4.2.4) deveriam apresentar uma boa extração de DNA das amostras, já que a colisão da célula com as pérolas de vidro fornecem energia para que ela se rompa. Através da tabela 5.2 é possível verificar que as maiores concentrações de DNA entre as amostras são provenientes das amostras 8, 9 e 10, obtidas pelos métodos em questão, verificando sua maior eficiência em

relação aos demais. Entretanto a concentração de DNA destas amostras também é muito baixa indicando algum fator limitante para os protocolos.

Analisando as condições de operação do procedimento um dos fatores que pode ter interferido no resultado foi o tamanho das pérolas de vidro utilizadas. As pérolas de vidro disponíveis apresentavam diâmetro médio de 2 mm. Como a célula de *Sulfolobus acidocaldarius* é muito menor que a pérola de vidro, como pode ser observado pela figura 3.5, a possibilidade de célula e esfera de vidro se chocarem é menor. Além disso, ao utilizar esferas de maior diâmetro, o número de esferas presentes no tubo se torna menor e, ainda que a colisão aconteça, a energia imposta à célula não é suficiente para romper a parede celular.

Outro fator relevante e que deve ser considerado é que este cultivo não foi realizado em condições assépticas. Durante a lixiviação pode ter ocorrido contaminação do meio, inicialmente inoculado com cepa pura de *S. acidocaldarius*, por outras espécies microbianas, notadamente uma espécie do domínio *Bacteria*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, que é cultivada no mesmo laboratório em condições semelhantes. Estas células podem ter sido rompidas pelos protocolos de extração e o DNA em questão pode ser proveniente destes micro-organismos.

Além da concentração de DNA, a pureza das preparações pode ser constatada através das relações de absorbância A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} , presentes na tabela 5.2. A relação A_{260}/A_{280} é utilizada para constatar a contaminação por proteínas e a relação A_{260}/A_{230} verifica a presença de contaminantes fenólicos, outros solventes orgânicos e certos carboidratos, valores menores que 1,8 indicam amostras contaminadas (BROWN, 2003).

Através dos valores apresentados na tabela é possível verificar que a remoção de contaminantes pelas técnicas de extração não foram eficientes, apresentando contaminação tanto por proteína e fenol, como carboidratos e outros contaminantes. A amostra 7, dentre todas as amostras, apresentou maior valor (1,604) para a relação de absorbância A_{260}/A_{280} , apresentando-se fora da faixa de pureza aceitável da amostra de DNA, ou seja, a amostra contém contaminação por proteínas. A mesma amostra, quando avaliada para a relação A_{260}/A_{230} , indica um valor muito baixo (0,362), demonstrando alta contaminação por compostos fenólicos ou carboidratos.

A amostra **1** apresentou pureza suficiente para considerar a amostra livre de contaminações fenólicas, relação A_{260}/A_{230} igual a 2,108. Entretanto, para a relação A_{260}/A_{280} o valor obtido (1,427) não se encontra na faixa de pureza aceitável.

Estes resultados demonstram que novas metodologias de obtenção de amostras a partir de sistemas de biolixiviação devem ser buscadas, principalmente, no que tange a extração de DNA de possíveis biofilmes formados nas superfícies minerais. Além disso, métodos de lise celular mais adequados para células de *Archea* também necessitam ser avaliados.

Mesmo diante de resultados desanimadores para extração de DNA, optou-se executar PCR utilizando *primers* universais, uma vez que, em teoria, uma única molécula de DNA é capaz de ser amplificada por esta técnica. Estes resultados são apresentados a seguir.

5.3 Análise dos *amplicons* resultantes da reação de polimerização em cadeia (PCR)

As reações de polimerização em cadeia realizadas com temperatura de anelamento a 55°C não apresentaram bandas no gel, indicando a não amplificação de interesse e a necessidade de alteração desta temperatura.

A primeira PCR a 50°C, foi realizada com as amostras **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6** e **7**, provenientes dos protocolos de extração **4.2.1** e **4.2.2**. Após a reação, os *amplicons* foram observados em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, através de transiluminador Locus modelo L.PIX[®]. O gel resultante desta PCR está documentado na figura 5.1, onde pode ser observada a formação de bandas de aproximadamente 1.500 pares de bases nas amostras **1**, **2**, **4** e **5**. As demais amostras não foram amplificadas.

Com a obtenção de novas amostras, **9** e **10**, nova reação de PCR foi realizada. O resultado pode ser observado na figura 5.2. Nesta segunda PCR, apenas a amostra **4**, utilizada como controle, resultou em amplificação do DNA. As amostras **9** e **10** não geraram *amplicons*.

Mesmo não sendo observadas bandas de DNA genômico no gel de agarose, após extração. Algumas amostras foram amplificadas pela PCR utilizando *primer* universal. A possibilidade de contaminação é descartada devido à ausência de bandas no controle negativo.

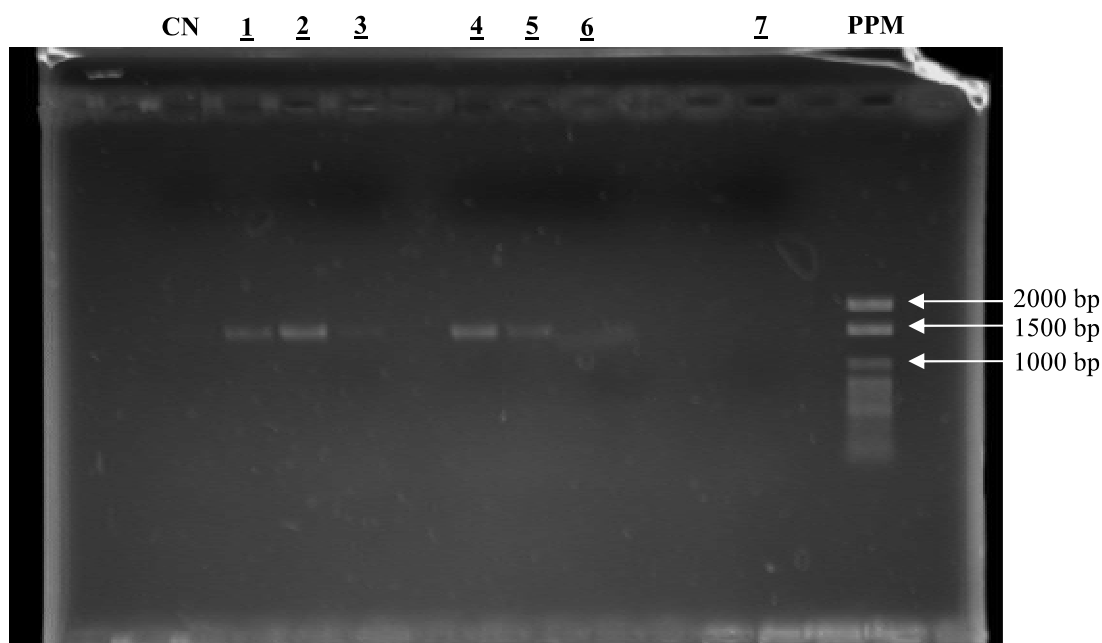


Figura 5.1 – Produtos de PCR obtidos para o par de *primers* universais 27F e 1492R, direcionado ao gene 16S rDNA. As amostras utilizadas foram resultantes da extração de DNA, do sistema de lixiviação de calcopirita a 70°C, em presença ou ausência de íons cloreto. **CN**: Controle Negativo; **PPM**: padrão de peso molecular de 100 bp da Norgen®. As condições de cada amostra estão descritas na tabela 4.1.

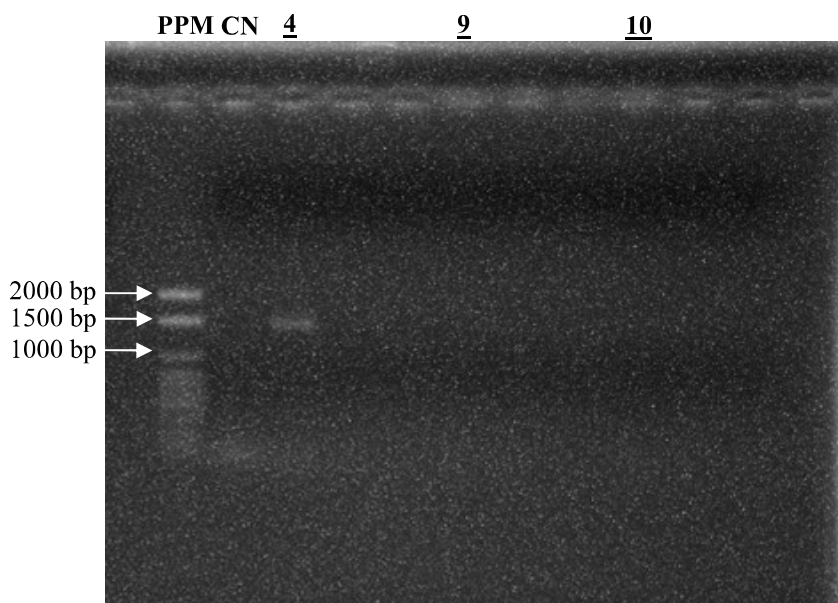


Figura 5.2 - Produtos de PCR obtidos para o par de *primers* universais 27F e 1492R, direcionado ao gene 16S rDNA. As amostras utilizadas foram resultantes da extração de DNA, do sistema de lixiviação de calcopirita a 70°C, em presença ou ausência de íons cloreto. **CN**: Controle Negativo;

PPM: padrão de peso molecular de 100 bp da Norgen[®]. As condições de cada amostra estão descritas na tabela 4.1.

O par de *primers* utilizado (27F e 1492R) é universal para o gene 16S rDNA, o *primer* 27F é direcionado ao domínio *Bacteria*, enquanto o *primer* 1492R é relatado como sendo universal para ambos os domínios. O *amplicon* esperado para este par de *primers* é de aproximadamente 1500 pares de bases (comprimento do gene amplificado), sendo o produto obtido nas amplificações realizadas de tamanho esperado (figura 5.1 e 5.2). Posteriormente, tentou-se produzir uma biblioteca de 16S rDNA com estes *amplicons*, para posterior sequenciamento, mas devido a uma série de problemas técnicos e ao tempo para finalização do trabalho esta etapa não pode ser realizada e será destinada a trabalhos futuros.

No entanto, a análise das sequências amplificadas leva a duas possíveis hipóteses. Houve anelamento inespecífico destes *primers* e a sequência gênica do 16S rDNA de *Sulfolobus acidocaldarius* foi amplificada, uma vez que este micro-organismo foi inicialmente inoculado no meio em estudo. Por outro lado, considerando que este par de *primers* gera anelamento específico para o domínio *Bacteria*, gerando também um *amplicon* de aproximadamente 1500 pares de base, existe a possibilidade de contaminação do sistema. A contaminação pode ter ocorrido no sistema, devido ausência de condições assépticas ou por contaminação cruzada entre os cultivos presentes no mesmo laboratório. Os micro-organismos do domínio *Bacteria* que suportam as condições adversas do meio, se apresentam como uma possibilidade de contaminação do sistema. Outra contaminação possível do domínio *Bacteria* seria uma espécie presente no laboratório, *Sulfbacillus thermosulfidooxidans* que apresenta a sequência gênica do 16S rDNA disponível no Anexo I, assim como *Sulfolobus acidocaldarius*.

Em vista destes resultados, é possível afirmar que a espécie inicialmente inoculada *Sulfolobus acidocaldarius* ainda esteja presente no meio, sendo responsável pela biolixiviação da calcopirita, mas que a presença de outras espécies, incluindo *Sulfbacillus thermosulfidooxidans* não pode ser descartada. No entanto, apenas o sequenciamento destes produtos de PCR poderá confirmar estas hipóteses.

6. CONCLUSÃO

O trabalho não alcançou o objetivo de caracterizar a população microbiana presente no sistema de lixiviação da calcopirita. Entretanto, foi possível observar a capacidade de desenvolver uma comunidade de micro-organismos neste sistema (alta temperatura e presença de íons cloreto) e que são necessárias pesquisas no que se refere ao desenvolvimento de técnicas mais eficazes para a extração de DNA genômico de espécies do domínio *Archaea*, devido à constituição de sua parede celular se diferenciar da presente no domínio *Bacteria*. Além da busca de metodologias para recuperação de células neste tipo de sistema, no qual a formação de biofilmes é intrínseca.

ANEXO I

Sequências genéticas para 16s rDNA das espécies *Sulfolobus acidocaldarius* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

Sulfolobus acidocaldarius

>gi|287450|dbj|D14876.1|SSO16SRR *Sulfolobus acidocaldarius* gene for 16S ribosomal RNA, complete sequence
 GAATTCAGCCTTTTTTTTAAATGATATGGTAAATTCATGACATATATAGTATCGGAAAACACACCATAATATA
 TCGACGTAAGTTTATATATTGTAGTTGTACAAGATATATTTTCGCGGACAACCCCCCGCGGGCACAAAAACCG
 CGCGGGGGGATGAAGCTTATTCATGGAGGGATGAGAAAGCTGAGGGGTCTAACCTCAGAAGTCTCATTCTGA
 CAGGGGAAGATTACGGGTGGTGAAAAGCCCTCCCGCCCCGATTCCGG**TTGATCCTG**CCGGACCCGACCGCTAT
CGGGGTAGGGATAAGCCATGGGAGTCTTACACTCCCGGGTAAGGGAGTGTGGCGGACGGCTGAGTAACACGTG
GCTAACCTACCCTCGGGACGGGGATAACCCCGGAACTGGGGATAATCCCGATAGGGAAGGAGTCCTGGAA
TGGTTCCTTCCCTAAAGGGCTATAGGCTATTTCCCGTTTGTAGCCGCCGAGGATGGGGCTACGGCCCATCAG
GCTGTCCGTGGGGTAAAGGGCCACCGAACCTATAACGGGTAGGGGCCGTGGAAGCGGGAGCCTCCAGTTGGGC
ACTGAGACAAGGGCCCAGGCCCTACGGGGCGCACCAGGCGCGAAACGTCCCCAATGCGCGAAAGCGTGAGGGC
GCTACCCCGAGTGCCTCCGCAAGGAGGCTTTTCCCCGCTCTAAAAAGGCGGGGGAATAAGCGGGGGGCAAGTC
TGGTGTGACCCGCCCGGGTAATACCAGCTCCGCGAGTGGTCCGGGTGATTACTGGGCCTAAAGCGCCTGTAGC
CGGCCCACCAAGTCGCCCCCTTAAAGTCCCCGGCTCAACCGGGGAACTGGGGGCGATAC**TGGTGGGCTAGGGGG**
CGGGAGAGGCGGGGGGTACTCCCGGAGTAGGGGCGAAATCCTTAGATACCGGGAGGACCACCAGTGGCGGAAG
CGCCCCGCTAGAACCGCCCCGACGGTGAGAGGCGAAAGCCGGGGCAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGT
CCCCGGCTGTAAACGATGCGGGCTAGGTGTCGAGTAGGCTTAGAGCCTACTCGGTGCCG**CAGGGAAGCCGT**TAA
 GCCCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCACCACAAGGGGTGG
 AACCTGCGGCTCAATTGGAGTCAACGCCTGGAATCTTACCGGGGAGACCGCAGTATGACGGCCAGGCTAACG
 ACCTTGCTGACTCGCGGAGAGGAGGTGCATGGCCGTCGCCAGCTCGTGTGTGAAATGTCCGGTTAAGTCCG
 GCAACGAGCGAGACCCCCACCCCTAGTTGGTATTCTGGACTCCGGTCCAGAACCACACTAGGGGGACTGCCGG
 CGTAAGCCGGAGGAAGGAGGGGGCCACGGCAGGTCAGCATGCCCCGAACTCCCGGGCCGCACGCGGGTTACA
 ATGGCAGGGACAACGGGATGCTACCTCGAAAGGGGGAGCCAATCCTTAAACCTGCCGCAGTTGGGATCGAGG
 GCTGAAACCCGCCCTCGTGAAACGAGGAATCCCTAGTAACCGCGGGTCAACAACCCGCGGTGAATACGTCCCTG
 CTCTTTGCACACACCGCCCGTCGCTCCACCCGAGCGAGAAAGGGGTGAGGTCCCTTGCGATAAGTGGGGGATC
GAACTCCTTTCCCGCGAGGGGGGAGAACTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCA
 TATATTTACTCCCCGCTAATTGGGTGGGAGGGCTTCACTAAACTCGTAATCTTCCCTTTTATAGATGCAGT
 TCTCCTCTTGGGCCAGAGGGGAATGAAGTGCTAGGGCCCATTTGGCAGAGACATACAAATATGTCTCTGCCA
 AGTTAGGGCTCAATGAGGCTAGTACTAGGTAGCCACATTATAGCCGTCTAGGAGTTCTACCCAGGGGCCGAAG
 CCTCCCGGTGGATGGCTCGGCTCGGGCACCAAGAAGGGCGCGGCAAGCAGCGAAATGCTCGGGTGAGGCGCAA
 AGCCGTTGACCCGAGGTCCCCTAATGGGATATCCT

A sequência dos *primers* utilizada neste trabalho é a seguinte:

27F: 5'AGAGT**TTGATCMT**GGCTCAG 3' (Sendo M = A ou C)

1492R: 5'GGTTACCTTG**TTACGACTT** 3'

Marcado em rosa, anelamento inespecífico para o *primer* 27F e em azul para o *primer* 1492R. Este produto, marcado em negrito, possui 1.447 pares de bases.

Sulfobacillus thermosulfidooxidans

>gi|343200258|ref|NR_040945.1| *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* strain DSM 9293 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
 AGAGT**TTGATCCT**GGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCGTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCTTCGGGTC
 AGCGGCGGACGGGTGAGGAACACGTGAGTGATCGGGCTGTGAGTGGGGGATATCGGGCCGAAAGGCGCGGCAA
 TCCCGCATACGTTCGGGGGAACCGGAAGAAAGCTTGGCAACAGGCGCTCACAGGGGAGCTCGCGGGCCATTAG
 CTAGTTGGGGGGTAATGGCCTCCCAAGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGA
 GCAACGCCCGCTGAGTGAAGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTGTCTGTCTGGGACGAAGACCGGCCCGGAAG
 GGCCGGGGAGCCGGTACCGACGGAGGAAGCCCCCTGCAAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAGACGTAGGGGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGTGCGATACGTAGCGGTTTTAAGCCTCCGG
 CTCACCCGGAGGAGGGCGGCTAAACGGTCGCGCTAGAGGGCAGGAGAGGTGCGTGGAATTCCTGGTGGAGCGG
 TGAAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCGCACCTGGCCTGGCCCTGACGCTGAGGCGC
 GACAGCGTGGGGAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGGTACTAGGTGTGCC
 CGGGTCCACCGGGCGGTGCCGGAGCTAACGCACTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGCAGAACCTTA
 CCAGGACTGGACACGCTCGTGAGCGCCGCGAAAGCGGCGGGCCCTTCGGGGAGCGAGCGCAGGTGCTGCATGG
 TTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTGTGCCAG
 CGGTTTCGGCCGGGCACTCACACGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCCGCA
 TGGCCTTGATGTTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCCGACAACGGGATGCGACGGCGCGAGCCGGAGC
 CAATCCTTCAAACGGGATCTCAGTTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAA
 TCGCCCATCAGCATGGGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTCGG
 CCACACCCGAAGCCGGGCGATCCAACCGCAGATGCGGAGGGTCCCCTCGACGGTGGGGTCGGTGATTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGTTGGA

A sequência dos *primers* utilizada neste trabalho é a seguinte:

27F: 5'AGAGT**TTGATCMT**GGCTCAG 3' (Sendo M = A ou C)

1492R: 5'GGTTACCTTG**TTACGACTT**3'

Marcado em rosa, anelamento específico para o *primer* 27F e em azul para o *primer* 1492R. Este produto, marcado em negrito, possui 1.465 pares de bases.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALQUÉRES, S.M.C; ALMEIDA, R.V.; CLEMENTINO, M.M.; VIEIRA, R.P.1; ALMEIDA, W.I.1; CARDOSO, A.M.; MARTINS, O.B.. Exploring the biotechnological applications in the *archaeal* domain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 398 – 405, 2007.

BACMAP, genome atlas. *Acidithiobacillus caldus*. Disponível em: <bacmap.wishartlab.com>. Acesso em: 11 de novembro de 2015.

BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 3, n. 1, p. 121 – 130, 2012.

BATISTA, L. A. **Análise das comunidades microbianas presentes em depósitos de minerais sulfetados com ocorrência de drenagens ácidas de mina e em sistemas de biolixiviação**. 2009. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Saneamento Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

BROWN, T. A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 276p.

CHEN, L.; BRUGGER, K.; SKOVGAARD, M.; REDDER, P.; SHE, Q.; TORARINSSON, E.; GREVE, B.; AWAYES, M.; ZIBAT, A.; KLENK, H. P.; GARRETT, R. A. The Genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a Model Organism of the *Crenarchaeota*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 4992–4999, 2015

COLLING, A. V. **Oxidação da pirita por via bacteriana em rejeitos de carvão para a produção de sulfatos férricos**. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia – Área de Concentração: Tecnologia Mineral, Ambiental e Metalurgia Extrativa) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FIRMINO, S. M. **Biossolubilização da calcopirita (CuFeS₂) na presença de íons cloreto**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

HANSKRAUSE. *Sulfolobus acidocaldarius*. Disponível em: <http://www.hanskrause.de/HKHPP/hkhpp_02_04.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

HENAO, D. M. O. **Estudo de genes envolvidos no processo de adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* em calcopirita (CuFeS₂)**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

HORTA, D. G. **Influência da adição da espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* e de íons Cl⁻ na dissolução da calcopirita (CuFeS₂)**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

IORIS, R. M. **Construção e triagem de uma biblioteca metagenômica de solo da Floresta Atlântica Paranaense**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

JAMES. Eye on Spain. RIO TINTO. Disponível em: <<http://www.eyeonspain.com/blogs/spains-top-ten/14767/10-destinations---andalucia.aspx>>. Acesso em: 20 de setembro de 2015.

JOHNSON, E.A.; LARSON, A.E. **Lysozyme**. Em: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BAREN, A.L. **Antimicrobials in foods**. 3ed, cap. 12, CRC press, 2005. 720 p.

JUNIOR, F. B. R.; MENDES, L. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. *Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Micro-organismos do Solo*. Planaltina: **Embrapa**, 2002.

KARAVAJKO, G. I.; BULYGINA, E. S.; TSAPLINA, I. A.; BOGDANOVA, T. I.; CHUMAKOV, K. M. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: a new lineage of bacterial evolution. **Febs letters**, v. 261, n. 1, p. 8 – 10, 1990

KLINGL, A. S-layer and cytoplasmic membrane – exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

KOERDT, A.; DEKE, J. G.; BERGER, J.; THORMANN, K. M.; ALBERS, S. V. Crenarchaeal Biofilm Formation under Extreme Conditions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

KOERDT, A.; ORELL, A.; PHAM, T. K.; MUKHERJEE, J.; WLODKOWSKI, A.; KARUNAKARAN, E.; BIGGS, C. A.; WRIGHT, P. C.; ALBERS, S. V. Macromolecular Fingerprinting of *Sulfolobus* Species in Biofilm: A Transcriptomic and Proteomic Approach Combined with Spectroscopic Analysis. **Journal of Proteome – ACS Publications**, v. 10, p. 4105 – 4109, 2011

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v. 3, São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 593 p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER J. **Microbiologia de Brock**. 10ed. São Paulo: Pearson – Prentice Hall, 2006. 1089 p.

MARTINS, F. L. **Biolixiviação da calcopirita utilizando microorganismos termófilos extremos na presença de íons cloreto**. 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais – Área de Concentração: Processos de Fabricação) - Rede Temática de Engenharia dos Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

NAKANO, V. A. **Macromolecular Fingerprinting of *Sulfolobus* Species in Biofilm: A Transcriptomic and Proteomic Approach Combined with Spectroscopic Analysis**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente) – Centro de Energia Nuclear da Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 977 p

OLIVEIRA, D. M.; SÉRVULO, E. F.; SOBRAL, L. G. S.; PEIXOTO, G. H. C. **Biolixiviação: utilização de micro-organismos na extração de metais**. Série Tecnologia Ambiental, v. 53. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. 40p.

OLIVEIRA, T. R. **Estudo da riqueza de membros do domínio *Archaea* em sedimentos de lagoas do cerrado**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

PATEL, S. Biotechnology. 19 de fevereiro de 2014. Disponível em: <<http://amazingbiotech.blogspot.com.br/2014/02/biocorrosion.html>>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V.. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444 p.

PINA, P. S. **Estudo da biolixiviação e da lixiviação química de um concentrado sulfetado de zinco**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais) - Rede Temática de Engenharia dos Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

PIRES, E. S.; TEIXEIRA, K. R. S.. Construção de bibliotecas de genes para 16S RNAr a partir de amostras ambientais. **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 24, n.2, p. 41-45, 2004

QUINTAES, B. R. Avaliação de comunidades microbianas em lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos – Revisão. **Revista de Ciencia & Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 7 – 33, 2012.

RODRIGUES, I. C. B. **Métodos Moleculares Aplicados a Biotecnologias Relacionadas ao Ciclo do Enxofre**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais – Área de Concentração: Tecnologias ambientais) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

ROSA, M. M.. **Avaliação de Diferentes Metodologias para extração de DNA de solos sob cultivo de cana de açúcar**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

SHAEFER, R. **Técnicas em Biologia Molecular**. Concórdia: Embrapa, 2006. v. 116.

SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. W. Microbiology: an envolving science, 3ed. Figura 14.24b. 2014. Disponível em: <<http://wnnorton.com/college/biology/micrograph/single.aspx?fig=236>>. Acesso em: 25 de novembro de 2015.

SOUZA, A. D. **Processo integrado: biolixiviação e lixiviação química na indústria do zinco**. 2005. 111 F. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais - Área de