



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

Extração de DNA genômico de micro-organismos oxidantes de enxofre

Luanna Ferreira Cotta

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

**Ouro Branco
Novembro/2015**

Extração de DNA genômico de micro-organismos oxidantes de enxofre

Luanna Ferreira Cotta

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: Profa. Sandra de Cássia Dias

**Ouro Branco
Novembro/2015**

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

Extração de DNA genômico de micro-organismos oxidantes de enxofre

Luanna Ferreira Cotta

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Orientadora: Profa. Sandra de Cássia Dias

Examinador 1: Profa. Isabel Cristina Braga Rodrigues

Examinador 2: Natália Rocha Barboza

Ouro Branco, 30/11/2015

RESUMO

Um dos graves problemas ambientais causados pela indústria de mineração é a drenagem ácida de mina (DAM). As bactérias participantes da DAM são divididas em proteobacteria, nitrospira, firmicutes e acidobacteria. Algumas arqueias também participam da DAM. Culturas inoculadas com *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus termossulfidooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Sulfolobus acidocaldarius* cedidas gentilmente pelo Laboratório de Bio&Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto foram utilizadas para a extração do DNA genômico. O foco principal deste trabalho foi padronizar um método de rompimento celular para isolar DNA genômico de micro-organismos que provocam a drenagem ácida de mina. O rompimento celular utilizou o método mecânico, moinho de bolas, e enzimático. O rompimento celular utilizou o moinho de bolas. Em seguida, o DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo descrito na literatura por Tsai (1999), posteriormente, as amostras foram aplicadas no gel de agarose e as bandas de DNA visualizadas utilizando o brometo de etídio. Apenas o DNA genômico do *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *E.coli* (bactéria utilizada como padrão para validação do método de rompimento) foi extraído pelo método mecânico e enzimático. O DNA do *A. thiooxidans*, *S. acidocaldarius* e *S.termossulfidooxidans* não foi extraído. Provavelmente a formação de biofilme dos micro-organismo com o minério e a pequena concentração de células prejudicaram a etapa de rompimento e extração do DNA. Os dados obtidos não foram suficientes para o planejamento experimental. Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que tanto o rompimento enzimático quanto o rompimento mecânico são eficientes para o rompimento celular.

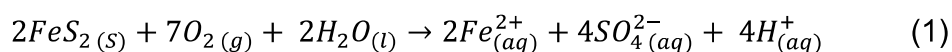
Palavras-chave: Drenagem ácida de mina, Micro-organismos oxidantes de enxofre, Moinho de bolas, DNA genômico.

Sumário

RESUMO.....	4
1- INTRODUÇÃO	6
2- OBJETIVOS	7
2.1- Objetivo Geral.....	7
2.2- Objetivos específicos	7
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Drenagem ácida de mina	8
3.2 Domínio Bactéria	9
3.3 Domínio <i>Archaea</i>	14
3.4 Rompimento celular	18
3.5 Extração do DNA	20
3.6 Planejamento Experimental Fatorial 2 ^k	21
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Micro-organismos	22
4.2. Preparação das amostras para o rompimento celular.....	22
4.3 Rompimento celular mecânico.....	23
4.4 Rompimento enzimático	25
4.5. Extração do DNA	26
4.6. Gel de agarose.....	27
4.7. Coloração de Gram	27
4.5. Dosagem das proteínas	28
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 <i>Sulfobacillus thermossulfidooxidans</i>	29
5.2 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	30
5.3 <i>Sulfobolus acidocaldarius</i>	32
5.4 Rompimento enzimático	34
5.5 Coloração de Gram	35
5.6 Rompimento enzimático e mecânico com a <i>E.coli</i> de padrão.....	36
5.7 Dosagem de proteínas	38
5.8 Planejamento experimental	39
6- CONCLUSÃO	40
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1- INTRODUÇÃO

Um dos graves problemas ambientais causados pela indústria de mineração é a drenagem ácida de mina. A drenagem ácida de mina acontece quando os minerais sulfetados, a pirita (FeS_2), arsenopirita (FeAsS), calcopirita (CuFeS_2) e esfalerita (ZnS) e marcasita dentre outros, sofrem reações de óxido-redução liberando calor, produzindo sulfato e metais tóxicos. Estas condições são desfavoráveis a maioria dos seres vivos, entretanto alguns micro-organismos colonizam este ambiente. A oxidação dos metais sulfetados pelos micro-organismos gera um efluente que ocasiona consequências graves ao meio ambiente, como: contaminação dos corpos hídricos e do solo, assoreamento de águas superficiais, erosão, além de redução da biodiversidade dos ecossistemas terrestres e aquáticos (MELLO *et.al*, 2014). A equação 1 apresenta a formação da drenagem ácida a partir da pirita (FeS_2).



As arqueias e bactérias encontradas no ambiente de mineração são acidófilas e tolerantes a metais. Eucariotos como protozoários, fungos e leveduras também povoam este meio ambiente. O estudo das interações dos micro-organismos com os minerais e o sequenciamento do seu genoma é importante para o uso destes no processamento de minério e obtenção de biomoléculas com aplicações tecnológicas (BAKER *et.al*, 2003).

Para a identificação e caracterização desses micro-organismos é fundamental a extração do DNA genômico que será utilizado em técnicas baseadas em ácidos nucleicos. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) produz milhões de cópias da porção do gene ou *cluster* de gene de interesse em curto espaço de tempo. Esta técnica é muito utilizada para a amplificação dos genes do rRNA 16S (MALIK *et.al*, 2008).

A primeira etapa para a liberação do DNA genômico é o rompimento da parede e membrana celular, respectivamente. A eficiência do rompimento celular depende das

características do micro-organismo e da técnica de rompimento empregada. A escolha do método de rompimento celular deve propiciar a liberação da molécula de interesse em menor tempo possível.

O moinho de bolas é um método mecânico utilizado para romper células de bactérias, fungos filamentosos e microalgas. Este equipamento é constituído por uma câmara cilíndrica fechada, horizontal ou vertical, um eixo que gira ou vibra em alta rotação e um sistema de refrigeração, item opcional. São adicionadas na câmara esferas de vidro ou aço inoxidável e células em suspensão. O rompimento celular ocorre devido à força de cisalhamento aplicada pelas esferas contra a parede celular. As condições de rompimento são controladas facilmente e sua eficiência depende da geometria da câmara de rompimento, da velocidade, do tipo e carga e tamanho de esferas, da concentração celular, velocidade de alimentação e temperatura (MARINELLO, 2012).

O presente trabalho avaliou a eficiência do moinho de bolas para a extração de DNA genômico de micro-organismos que causam a drenagem ácida de mina. Os cultivos inoculados com este tipo de micro-organismo foram gentilmente doados pelo Laboratório Bio&Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a extração do DNA genômico de micro-organismos que participam de processos geradores de drenagem ácida de mina.

2.2- Objetivos específicos

1. Utilizar diferentes cargas de esfera, tempo de rompimento e frequência no rompimento celular utilizando o moinho de bolas;
2. Utilizar o planejamento experimental fatorial 2^3 realizado em dois blocos para identificar as melhores condições de rompimento celular utilizando o moinho de bolas;
3. Extrair o DNA genômico, dos micro-organismos oxidantes de sulfeto.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Drenagem ácida de mina

Na natureza, os ciclos biogeoquímicos são processos naturais que transformam e reciclam substâncias orgânicas e inorgânicas presentes na água, solo e sedimentos. Esses ciclos colaboram para o equilíbrio da biosfera e dele participam diversas formas de micro-organismos como, arqueias e bactérias (MADSEN, 2011).

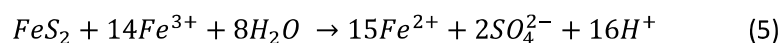
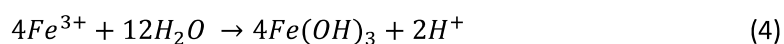
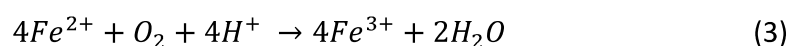
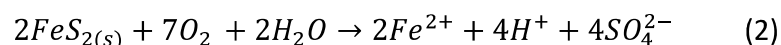
Emissões antropogênicas de sulfato compreendem desde as águas de esgoto doméstico, até emissões industriais de compostos de enxofre (sulfito, sulfatos, etc). Dentre as emissões industriais de compostos de enxofre podem se destacar as indústrias de processamento de alimento, de explosivos, de atividade de mineração, principalmente em águas de drenagem que apresentam características ácidas, resultado da degradação microbiana de minerais.

Quando sulfetos minerais tais como sulfetos de, Fe, Mn, Cr, Cd, Zn, Pb e As são expostos na superfície terrestre à presença de oxigênio e água sofrem o processo natural de oxidação, geram acidez e solubilizam metais, promovendo a drenagem ácida ou neutra de mina (DAM), um efluente rico em metais e sulfato. Esses efluentes ácidos de mina quando misturados com a água de rios e lagos geram uma grave degradação, devido ao sulfato, e aos metais dissolvidos tóxicos à vida aquática e comprometendo seriamente a qualidade dos recursos hídricos (MADIGAN e MARTINKO, 2004).

A drenagem ácida de mina pode ser química ou biológica e gera fluidos ricos em metais e ácidos. A drenagem biológica ocorre na presença de micro-organismos oxidantes de sulfeto minerais que geram íons sulfatos e cátions de metais solúveis como, ferro, alumínio, manganês, traços de chumbo, cobre e zinco. Os produtos da drenagem ácida de mina causam inúmeros efeitos tóxicos ao ecossistema aquático e terrestre. Além disto, a acidez age na dissolução de outros metais presentes na matéria mineral agravando o problema (TANG, 2008).

Os principais minerais sulfetados que produzem a DAM são os sulfetos de ferro como, pirita (FeS_2), arsenopirita (AsFeS) e calcopirita (CuFeS_2). A drenagem ácida de

mina inicia-se com a oxidação de pirita na presença de oxigênio e água formando Fe^{2+} e ácido sulfúrico (equação 2). Na presença de O_2 , pH menor que 3,5 e atividade bacteriana o íon ferroso produzido na equação 2 pode ser oxidado a íon férrico, conforme a equação 3. O íon férrico pode precipitar como $Fe(OH)_3$ em um meio com pH na faixa de 2,3 a 3,5 (equação 4). O íon férrico restante reage com pirita para produzir mais íon ferroso e ácido sulfúrico (equação 5). A equação 3 é a equação limitante da oxidação da pirita (BAKER *et.al*, 2003). Quantidades de sulfeto superior a de álcalis, permeabilidade do substrato à água e ao oxigênio, percolação da água da chuva são essenciais para a ocorrência de DAM (SILVAS, 2010).



A presença de micro-organismos oxidantes de enxofre acelera a velocidade de oxidação por um fator de centenas a milhões de vezes. Resultando em condições altamente oxidantes fornecendo um ambiente favorável à lixiviação de outros minerais como galena, esfalerita, calcopirita que são encontrados em associação com a pirita.

A DAM tem diferentes nichos microbianos, mas estes nichos são restritos à poucas espécies devido as condições drásticas como temperatura, acidez, e pequena disponibilidade de compostos orgânicos. Um número razoável de bactérias envolvidas na DAM é estudado, mas pouco se sabe sobre as arqueias que participam no processo de DAM (BELI, 2014).

3.2 Domínio Bactéria

As bactérias participantes da DAM são divididas em proteobacteria, nitrospira, firmicutes e acidobacteria. As proteobacterias consistem em mais de 200 gêneros. As proteobactérias são classificadas em α , β , δ , ϵ e γ . O grupo γ -proteobactéria é o mais estudado. Os micro-organismos *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus caldus* e

Thiobacillus sp são γ -proteobactérias. *Acidimicrobium ferrooxidans* e *Ferromicrobium acidophilus* e *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* e *Sulphobacillus acidophilus* pertencem a subdivisão firmicutes (BAKER et.al, 2003).

As bactérias de acordo com a composição da sua parede celular podem ser divididas em Gram negativas ou Gram positivas. As bactérias Gram negativas têm a parede celular constituída por uma camada de peptidioglicano, lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo (Figura 1). O peptidioglicano é composto por dois açúcares aminados; ácido N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, está localizado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa conferindo rigidez à parede celular. A lipoproteína liga-se covalentemente ao peptidioglicano, e não covalentemente à membrana externa, estabilizando a membrana externa ancorando-a à camada de peptidioglicano. A membrana externa tem por finalidade funcionar como uma barreira molecular, dificultando a perda de proteínas periplasmáticas e o acesso de enzimas hidrolíticas produzidas pela célula ao peptidioglicano. O lipopolissacarídeo (LPS) consiste no lipídeo A (endotoxina), cujo papel biológico está envolvido na participação dos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana (ESTRELA e PÉCORA, 1997).

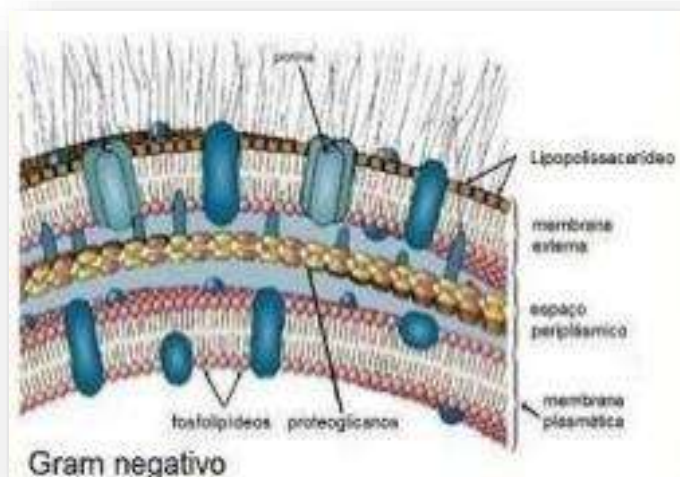


Figura 1: Componentes da parede celular de uma bactéria Gram negativa. Fonte: <https://williamenatashabioifex.wordpress.com/2011/04/06/metodo-de-gram/>

A figura 2 apresenta um esquema da parede celular das bactérias Gram positivas. A parede celular é formada por várias camadas de peptidoglicano ligado por ligações cruzadas entre si, formando uma rede rígida e forte. Os peptidoglicanos estão ligados quimicamente aos ácidos teicóicos, que possuem um grupo fosfato, deixando a superfície da célula carregada negativamente. A parede celular das bactérias Gram positivas apresenta uma maior quantidade de peptidoglicano em sua composição. Consequentemente a parede celular de uma célula Gram positiva é mais espessa e resistente do que a parede celular das bactérias Gram-negativas (ESTRELA e PÉCORA, 1997).

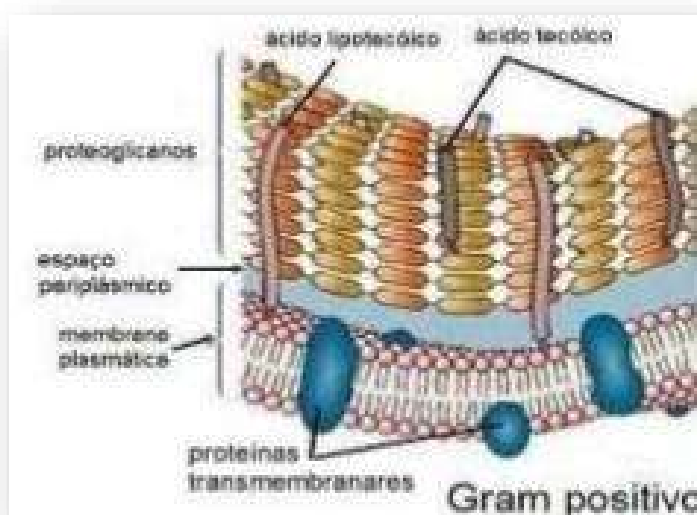


Figura 2: Componentes da parede celular de uma bactéria Gram positiva. (Fonte: <https://williamenatashabioif.es.wordpress.com/2011/04/06/metodo-de-gram/>)

3.2.1 Gênero *Acidithiobacillus*

As bactérias do gênero *Acidithiobacillus* são Gram negativas, podem crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias e pertencem a subclasse γ das Proteobacteria. Possui forma de bastão, com aproximadamente de 0,3 a 0,8 μm de comprimento e 0,9 a 2 μm de diâmetro (RAWLINGS E KUSANO, 1994). A maioria das espécies é quimiolitotrófica obrigatória e outras são quimiorganotróficas. Elas são

capazes de obter energia através da catálise oxidativa de compostos sulfurados, utilizando o oxigênio como aceptor de elétrons. São acidófilas, capazes de crescer em pH 0,5 a 2,0, temperatura ótima de crescimento 20 a 43°C e resistentes a altas concentrações de íons metálicos (MADIGAN e MARTINKO, 2004).

Segundo Santos (2006), as bactérias do gênero *Acidithiobacillus* podem oxidar compostos inorgânicos contendo enxofre. Estas espécies são encontradas em diversos ambientes, como locais de mineração, área de tratamento de esgoto e estuários

3.2.1.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

É uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete que utiliza como fonte de carbono o CO₂ atmosférico (BATISTA, 2009). A sua resistência a altas concentrações de íons metálicos é uma característica da *Acidithiobacillus ferrooxidans*, isso ocorre graças à capacidade de suas células eliminarem esses íons do meio intracelular (MADIGAN e MARTINKO, 2004). Segundo Colmer e Hinkle (1947), essa espécie foi a primeira a ser estudada e identificada como uma bactéria capaz de oxidar minerais. O pH ótimo de crescimento é na faixa de 1,5 a 2,5, temperatura ótima de crescimento é 30°C. O crescimento é favorecido em ambientes aeróbios com o O₂ como aceptor final de elétrons, em ambientes anaeróbios o íon formato pode ser utilizado como doador e íons férricos como aceptor de elétrons (RAWLINGS e KUSANO, 1994). A energia é obtida pela oxidação de Fe²⁺ a Fe³⁺ ou de compostos reduzidos de enxofre para ácido sulfúrico. Outros compostos como, UO₂ podem ser oxidados na presença de íons ferro pelo *A. ferrooxidans* em ambientes aeróbios.

Embora exista um número considerável de trabalhos na literatura relacionados a bio-oxidação por estas bactérias, poucos estudos se dedicaram a estudar a interação entre bactérias e superfícies minerais, formação de biofilme, reconhecimento bacteriano de superfícies minerais e dispersão destes micro-organismos no meio ambiente.

A análise do genoma pode fornecer informações consistentes a respeito dos genes e do potencial metabólico da espécie (VALDES *et.al*, 2008).

3.2.1.2 *Acidithiobacillus thiooxidans*

A.thiooxidans é uma bactéria meso-acidofílica, quimiolitotrófica, Gram negativa, possui a forma de bastão. *A. thiooxidans* cresce autotrophicamente utilizando enxofre elementar e compostos sulfúricos inorgânicos como fonte de energia. Diferente da *A.ferrooxidans*, pois esta espécie não pode adquirir elétrons ou utilizar a energia da oxidação de íons ferrosos para fixação de dióxido de carbono ou outros processos anabólicos. Essa espécie exibe sensibilidade a compostos orgânicos, como açúcares simples, ácidos orgânicos e aminoácidos. Esse micro-organismo apresenta como função principal a formação de ácido sulfúrico que promove o ataque protônico sobre o mineral e mantém o íon férrico estável. Possui um genoma de cerca de 2×10^6 pares de bases e teor de 55-65% de CG (BLAUTH, 2008). A oxidação de enxofre inorgânico é ampla em procariotos, entretanto ao contrário do ferro que apresenta apenas dois estados de oxidação +2 e +3, o enxofre apresenta vários estados de oxidação variando de -2 a +6.

3.2.2 Gênero *Sulfobacillus*

As bactérias do gênero *Sulfobacillus* são quimiolitotróficas facultativas capazes de assimilação de formas orgânicas e inorgânicos de carbono, termófilas, acidófilas, podem ser encontradas em depósitos minerais. Podem utilizar diversos substratos, Fe^{2+} , enxofre e minerais sulfetados em ambientes com alta concentração de metais e baixo pH. São Gram positivas, possuem forma de bastão com 1 a 4 μm de comprimento e 0,5 a 0,8 μm de diâmetro. Crescem em condições heterotróficas com meio rico em sacarose, glicose ou outras fontes orgânicas de carbono, o que o difere do gênero *Acidithiobacillus*, podem formar endósporos levemente ovais (TRAVISANY et.al, 2012).

3.2.2.1 *Sulfobacillus thermossulfidooxidans*

A espécie *Sulfobacillus thermossulfidooxidans* foi descrita pela primeira vez por Golovacheva e Karaviaro em 1978. É termófila moderada, cresce à temperatura e pH de 45°C e 2,0 a 2,5, respectivamente, na presença de Fe^{+2} e/ou enxofre suplementado com extrato de levedura (TRAVISANY *et.al*, 2012). Segundo Karavajko *et. al.* (1990), a sua morfologia assemelha-se um pouco à dos *Bacillus*, mas se diferencia na capacidade de ramificação das células. *S. thermossulfidooxidans* é capaz de oxidar 90% do ferro disponível no meio nas primeiras 30 horas (MORALES, 2012).

Possui o genoma com 3.862.012 pb no total e tem um teor de CG de 49,3% (TRAVISANY *et. al*, 2012).

3.3 Domínio *Archaea*

Os micro-organismos deste domínio são procariotos, quimiolitotróficos, capazes de viver em condições extremas de pH e/ou temperatura como, fontes termais, águas extremamente salgadas, temperaturas baixas e condições extremas de pH. Podem ser anaeróbios facultativos ou aeróbios e colonizar locais contendo ferro e enxofre na forma reduzida. Espécies *Sulfolobus acidocaldarius* e *Sulfolobus solfataricus* utilizam como fonte de energia o enxofre e seus compostos reduzidos (BATISTA, 2009).

O domínio *Archaea* possui semelhança ao domínio *Bacteria*, no que diz respeito aos genes operacionais, envolvidos em vias metabólicas, mas o domínio *Archaea* apresenta características singulares. Segundo Oliveira (2013), a parede celular do domínio *Archaea* apresenta pseudo-peptideoglicano, glicoproteínas e outros. Algumas arqueias possuem pseudomureína, uma estrutura parecida ao peptideoglicano, composta de ácido N-acetilalosaminurônico e a ligação entre os açúcares. Outras arqueias apresentam em sua parede celular a metanocondroitina, que é um polímero de quatro açúcares (N-acetilgalactosamina, glicose, manose e ácido glucorônico), composto por sulfato de condroitina. Em bactérias e eucariotos, os ácidos graxos são ligados a uma molécula de glicerol-3-fosfato por uma ligação do tipo éster, não ramificado, saturado ou mono-insaturado. As arqueias não possuem essas cadeias de ácidos graxos,

possuem cadeias laterais de hidrocarbonetos que se ligam a uma molécula de glicerol-1-fosfato por uma ligação do tipo éter. Outra característica peculiar do domínio *Archaea* é a presença de monocamadas lipídicas onde a fluidez é modulada por ciclos de determinados componentes da cadeia lateral de hidrocarboneto (OLIVEIRA, 2013).

A parede celular da arqueia consiste de um arranjo de glicoproteína denominada de camada-S (*surface layer*), formando uma matriz pseudo-cristalina na superfície da célula. Geralmente é composto por um tipo de glicoproteína formando um cristal central constituído por um conjunto de duas (p2), três (p3), quatro (p4) ou seis (p6) subunidades, como apresentado na figura 3 (KLINGL, 2014).

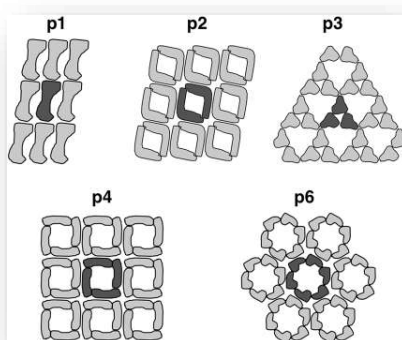


Figura 3: Arranjo das subunidades da camada-S com os diferentes tipos de simetria. A célula unitária dos cristais é indicada com uma cor mais escura. (Fonte: KLINGL, 2014).

As constantes de rede para esses cristais da camada-S chegam a variar entre 11 e 30 nm com massas molares entre 40 a 325 kDa. O centro-a-centro da camada-S, a simetria e o espaçamento são utilizados como uma característica taxonômica. A espécie *Sulfolobus*, apresenta uma simetria p3 e um espaçamento em torno de 21 nm. A camada-S tem funções, como: proteção contra alta temperatura, salinidade, baixo pH e manutenção da forma da célula, fornecendo estabilidade à temperatura em torno de 80°C e pH em torno de 3,0 (KLINGL, 2014).

Para viver e crescer em ambientes extremos, as arqueias desenvolveram mecanismos para protegê-las da alta concentração de sal. A parede celular é composta de glicoproteínas que atraem os íons Na^+ ao redor da parede, a concentração de K^+

intracelular é alta. A parede celular das arqueias são mais rígidas para resistir à alta temperatura. Para impedir a desnaturação por temperatura elevada, as proteínas das arqueias apresentam um maior número de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e menores porcentagem de aminoácidos termolábeis. Para resistir a temperaturas baixas as proteínas das arqueias apresentam menor quantidade de interações de hidrogênio, dissulfeto e hidrofóbicas (CARDOSO *et.al*, 2003).

3.3.1 Gênero *Sulfolobus*

O gênero foi definido em 1972 quando a primeira espécie foi isolada de uma locomotiva no parque nacional de Yellowstone, nos Estados Unidos da América.

Os *Sulfolobus* são aeróbios estritos, termófilos extremos, acidófilos e Gram negativos, possuem forma esférica com lobos, sem mobilidade. Temperatura de 80°C e pH de 3,0 são valores ótimos de crescimento dos *Sulfolobus*. Apresentam crescimento quimiorganotrófico, sendo o substrato extrato de levedura ou glicose, ou crescimento quimiolitotrófico, sendo fonte de energia o enxofre elementar, sulfetos minerais ou íons ferrosos (RODRIGUES, 2012). O gênero compreende 8 espécies: *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *S.shibatae*, *S. metallicus*, *S. tokodaii*, *S. yangmingensis*, *S.tengchongensis*, *S.islandicus*.

3.3.1.1 *Sulfolobus acidocaldarius*

A espécie que se destaca para a biolixiviação é a *Sulfolobus acidocaldarius*, apresentada na figura 4. São células irregulares, com forma espiroidal medindo entre 0,8 até 1,0 μm e Gram negativas. Possuem um genoma circular com 2.225.959 pb e 37% GC (GROGAN, 1996).

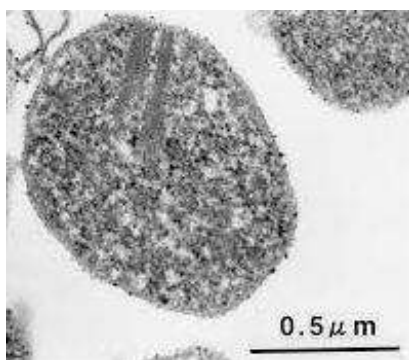


Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura, mostrando uma célula de *Sulfolobus acidocaldarius*.
(Fonte: <http://www.sulfosys.com/sulfolobus-solfataricus.html>)

Possui uma estrutura celular exclusiva de arqueia que não possui uma parede celular típica. O envelope celular consiste de uma membrana citoplasmática separada por uma camada S externa de glicoproteína, como mostra a Figura 5 (GROGAN, 1996).

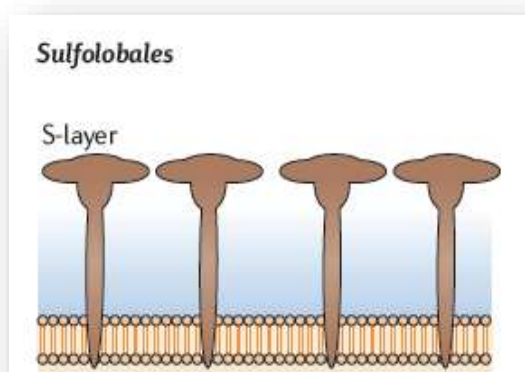


Figura 5: Parede celular da *Sulfolobus acidocaldarius* apresentando a camada proteica adicional, camada S, composta de uma única espécie de proteína ou glicoproteína, associada à membrana citoplasmática.
(Fonte: OLIVEIRA, 2013).

Segundo Klingl (2014), as proteínas constituintes da camada-S são ancoradas na membrana citoplasmática através de estruturas semelhantes a talos que formam um espaço quase-periplasmático.

De acordo com Chen *et. al* (2005), *Sulfolobus acidocaldarius* tem temperatura ótima de crescimento entre 75°C e 80°C, e pH ótimo de 2 a 3, em condições estritamente aeróbias utilizando substratos orgânicos como doadores de elétrons. Os carboidratos utilizados pelo *S. acidocaldarius* são D-fucose, D-Glicose, sacarose, maltotriose, dextrina, amido, extrato de levedura, triptona e aminoácidos como, L-alanina, L- asparagina, L- aspartato, L-glutamato. Quando os doadores de elétrons são compostos inorgânicos, H₂, H₂S, FeS, K₂S₄O₆, a temperatura ótima de crescimento é de 55 a 85°C e o pH 1.0 a 5.9 (WHEATON *et.al*, 2015).

3.4 Rompimento celular

Os critérios utilizados para a seleção da técnica de rompimento celular devem considerar fatores como: tamanho da célula, existência da parede celular e sua composição, tolerância a tensões de cisalhamento, necessidade de controle de temperatura, localização intracelular da molécula alvo, tempo de operação, rendimento do processo, gasto de energia, custo e capital de investimento. Os métodos de rompimento celular podem ser divididos em: mecânicos (homogeneizador a alta pressão, moinho de bolas e ultra-som); não-mecânicos ou físicos (choque osmótico, congelamento e descongelamento, aquecimento, secagem); químicos (álcalis, solventes, detergentes, ácidos) e enzimáticos (lise enzimática) (JÚNIOR, 2005).

O moinho de bolas consiste basicamente em uma câmara cilíndrica horizontal ou vertical fechada, um eixo que gira em alta rotação ou vibra. As câmaras horizontais são mais eficientes por comportarem maiores cargas de esferas. São adicionadas a essas câmaras esferas de vidro ou aço inoxidável e as células em suspensão. A força de cisalhamento entre as esferas e a parede celular leva ao rompimento celular. A figura 6 apresenta o desenho de um moinho de bolas (JÚNIOR, 2005).

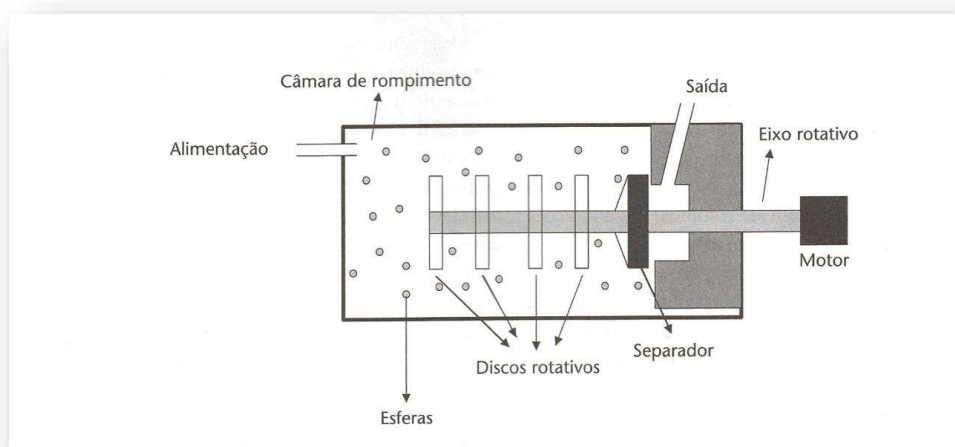


Figura 6: Esquema simplificado de um moinho de bolas em escala laboratorial. (Fonte: MARINELLO, 2012).

A eficiência do processo de rompimento utilizando o moinho de bolas depende de alguns fatores, tais como a frequência de agitação, o movimento da câmara que cria um fluxo turbulento no interior desta, aumentando a tensão de cisalhamento e ocasiona o rompimento celular, à medida que aumenta a frequência, aumenta o contato das esferas com as células e consequentemente aumenta o rompimento celular. A carga de esferas, normalmente, em um moinho horizontal é 80-85% do volume da câmara. Outro fator de fundamental importância é o tempo de rompimento, tempo excessivamente longo aumenta o número de contaminantes que pode dificultar as etapas posteriores, podendo degradar a molécula alvo, tempo pequeno de rompimento pode levar a uma pequena liberação do produto de interesse gerando baixo rendimento do processo. Logo, o tempo ideal é aquele que leva a uma liberação máxima do produto, com boa qualidade e o mínimo possível de impurezas.

O presente trabalho utilizou o moinho de bolas com câmara horizontal, pois comportam maiores cargas de esferas, sendo consequentemente mais eficientes. Um fator que muito influencia na eficiência do processo de rompimento celular pelo moinho de bolas é a velocidade de agitação, quanto maior essa velocidade, mais rápido ocorre o rompimento. O diâmetro da esfera também é um fator de influência no rompimento, quando menor ela for, mais eficiente será o rompimento. Deve-se controlar a temperatura

de operação para prevenir a destruição da biomolécula-alvo, pois neste processo é liberada uma grande quantidade de calor (MARINELLO, 2012).

3.5 Extração do DNA

De acordo com Brügger et al, (2004) o sequenciamento do genoma é importante porque o genoma não é uma entidades estática, ele evolui continuamente. Um bom método de extração de DNA para qualquer tipo de amostra deve apresentar quantidade suficiente de DNA extraído, remoção de contaminantes, integridade e pureza do DNA (DHALIWAL, 2013).

Existem vários métodos para extrair o DNA genômico de micro-organismos, um destes é a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. No processo de extração, o fenol é responsável por desnaturar e solubilizar as proteínas, o clorofórmio também é utilizado como agente desnaturante das proteínas presentes na amostra. A mistura de fenol e clorofórmio é eficiente na desproteinização, aumentando o rendimento final. O álcool-isopropílico evita a formação de espuma quando a solução é agitada. Após a desnaturação das proteínas com fenol e clorofórmio, estas são concentradas na fase orgânica e o DNA na fase aquosa. Na próxima etapa o DNA é precipitado pela adição de uma solução de álcool isopropílico e NaCl. (OLIVEIRA *et al*, 2007).

Fragmentos de DNA e RNA podem ser separados de acordo com o seu tamanho através da eletroforese em gel de agarose. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa que pode ser utilizada para separar fragmentos de tamanhos diferentes quando colocados em um gel horizontal na presença de um campo elétrico. A agarose polimerizada leva a formação de uma rede tridimensional com poros onde as moléculas de DNA migram na presença de uma corrente elétrica. Quando o DNA é clivado com enzimas de restrição, fragmentos de diferentes tamanhos migram em diferentes padrões. O gel resultante apresenta um aspecto de "degraus de escada", visualizados após o gel ser corado com brometo de etídio, um corante que tem a propriedade de intercalar-se entre as fitas do DNA, emitindo radiação que é identificada quando o gel é exposto a luz ultravioleta. Em um dos poços do gel, deve ser adicionado

um marcador de massa molar contendo fragmentos de DNA de tamanho conhecido (SCHAEFER, 2006).

Por possuir carga negativa, o DNA é sempre aplicado do lado do pólo negativo no gel. Isso possibilita a corrida para o pólo positivo. A migração da molécula de DNA depende de diversos fatores: 1) tamanho da molécula – quanto maior a molécula, maior o coeficiente de atrito desta, sendo assim a sua migração no gel será mais lenta. 2) conformação do DNA – o DNA em forma de super-hélice circular ou na forma circular possui a velocidade de migração mais lenta; por isso as moléculas de DNA são clivadas, para que todas estejam na forma linear, a fim de se obter um padrão. 3) concentração da agarose – a concentração do gel (0,8% - 1,0%) deixará o gel mais ou menos concentrado, isso possibilitará que um mesmo fragmento de DNA tenha uma maior velocidade de migração, menor coeficiente de atrito (gel menos concentrado) ou uma menor velocidade de migração, maior coeficiente de atrito (gel mais concentrado) facilitando a separação de fragmentos menores (LIMA *et al*, 2010).

3.6 Planejamento Experimental Fatorial 2^k

O planejamento experimental é uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos processos. Além de proporcionar o aprimoramento de processos, um planejamento adequado, reduz a variabilidade dos resultados, o tempo de análise e, conseqüentemente os custos envolvidos (BUTTON, 2012).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, se destacam os planejamentos fatoriais em blocagem, que possibilitam a avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis, mas reduzindo os ensaios experimentais em ensaios nos quais a quantidade de matéria prima é insuficiente para realizar todos os ensaios. A utilização de blocagem minimiza a utilização de diferentes “lotes” de células. (CUNICO *et al.*, 2008).

Este tipo de planejamento é normalmente representado por b^k , onde k representa o número de fatores, isto é, o número de variáveis do sistema em estudo, e b representa o número de níveis escolhidos, ou seja, o número de condições de operação dos fatores de controle investigados nos experimentos (NEVES *et al.*, 2002). Este último, em geral é

identificado por nível baixo (-) e nível alto (+). O caso mais simples de planejamento fatorial é o representado por 2^2 , onde as variáveis estudadas são duas e cada uma delas está presente em apenas dois níveis (CUNICO et al., 2008).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Cultivos inoculados com os micro-organismos: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Acidithiobacillus Thiooxidans* e *Sulfolobus acidocaldarius* foram, doados gentilmente pelo Laboratório de Bio&Hidrometalurgia da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2. Preparação das amostras para o rompimento celular

Antes do rompimento celular uma etapa de preparo das células foi necessária. Os micro-organismos foram fornecidos em meio de cultivo (*A.ferrooxidans* e *A. thiooxidans*), minério (*Sulfolobus acidocaldarius*) e em membrana de $0,22\mu\text{M}$ (*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* e *Sulfobolus acidocaldarius*).

O meio de cultivo contendo *A.ferrooxidans* ou *A. thiooxidans* foi centrifugado para concentração celular. O meio de cultivo foi colocado em tubos cônicos, com tampa, de 50 mL. Os tubos foram centrifugados por 60 minutos a $1792\times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo as células foi lavado com solução salina ácida (HCl 0,01M e NaCl 0,9%) para auxiliar na remoção de algumas impurezas. Ao tubo contendo as células foi adicionada solução salina ácida na proporção de 2 volumes de tampão para 1 volume de células (mL mL^{-1}). Após a adição da solução salina tamponada as células foram ressuspensas utilizando o vórtex e centrifugadas por 30 minutos a $1792\times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem foi repetido mais duas vezes. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão de lise (TRIS 0,05 mol acrescido de EDTA 1mM e SDS 1 % (m/v) pH 7,5), utilizando 2 volumes de tampão para 1 volume de

pellet, conforme descrito acima para solução salina ácida. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a 4°C até o momento do rompimento celular.

A amostra de minério contendo micro-organismo foi lavada primeiramente com uma solução salina ácida pH 2,0. Primeiramente, 5 gramas de minério contendo o micro-organismo foi pesado e transferido para tubo cônico de 50 mL. Em seguida 10 mL de solução salina ácida foram adicionados a cada tubo e agitado no vórtex, e centrifugado a 1792xg, 4°C durante 60 minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado novamente 10 mL de solução salina ácida agitado e centrifugado conforme descrito anteriormente. Este processo de lavagem foi feito três vezes. Terminado o processo de lavagem com solução salina ácida, o minério foi lavado duas vezes com 10 mL de tampão de lise (TRIS 0,05 mol acrescido de EDTA 1 mM e SDS 1 % (m/v) pH 7,5) (2 volumes do *pellet*) centrifugado a 1792xg, 4°C durante 30 minutos. O *pellet* obtido ao final da 2ª centrifugação foi armazenado a 4°C e utilizado para o rompimento celular.

As membranas de microfiltração contendo micro-organismo foram cortadas em pequenos fragmentos e transferidas para tubo cônico de 50 mL e adicionado 10 mL de tampão de lise. O tubo foi agitado durante 3 minutos no vórtex para favorecer a saída das células da membrana para o tampão de lise. Terminado o tempo de agitação, os pedaços de membranas foram retirados, e a suspensão de células centrifugadas a 1792xg, 4°C durante 60 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a 4°C até o rompimento celular. Uma amostra do tampão de lise adicionado aos pedaços de membrana, antes da centrifugação, foi retirada para a realização da coloração de Gram para garantir que houve extração das células da membrana.

Outro protocolo para membranas de microfiltração contendo células foi testado. Neste protocolo, as membranas foram recortadas em pequeninos pedaços e utilizadas diretamente no rompimento celular.

4.3 Rompimento celular mecânico

A quantidade de esferas, a frequência e o tempo de rompimento foram avaliados no rompimento celular utilizando o moinho de bolas horizontal (Retsch MM 400). Cada

uma das três variáveis foi estudada em dois níveis: máximo (+) e mínimo (-). As tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as variáveis avaliadas e seus níveis utilizados no planejamento.

Tabela 1: Parâmetros utilizados no planejamento experimental fatorial 2^3 realizado em dois blocos para a avaliação do rompimento celular dos micro-organismos utilizando o moinho de bolas horizontal Retsch MM400.

Variáveis	Nível mínimo(-)	Nível Máximo (+)
Quantidade esfera	1,6 g (40% volume total)	3,2g (80% volume total)
Frequência de agitação	20 Hertz	30 Hertz
Tempo de agitação	3 minutos	7 minutos

Tabela 2- Matriz de delineamento do Planejamento Experimental Fatorial 2^3 realizado em dois blocos de quatro ensaios. Os blocos foram escolhidos de acordo com os sinais da interação 123.

Experimentos	Quantidade de esferas (g)	Frequência (Hertz)	Tempo (minutos)	Blocos
1	-	-	-	I
2	+	-	-	II
3	-	+	-	II
4	+	+	-	I
5	-	-	+	II
6	+	-	+	I
7	-	+	+	I
8	+	+	+	II

A figura 7 apresenta o volume de células utilizadas no rompimento celular, utilizando as células provenientes do meio de cultivo (*A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans*), minério (*S. acidocaldarius*) e membrana (*Sulfobacillus* e *S. acidocaldarius*).

<i>Células em meio de cultivo (A. ferrooxidans e A. thiooxidans)</i> •Foram realizados 4 experimentos.Em cada experimento foi utilizado 2 mL da suspensão de células. •Posteriormente outro lote de células, 8 experimentos foram realizados, com 1,5 mL da suspensão de células.	Células em minério •Foram realizados 8 experimentos, utilizando 1,0 g de minério e 1,5 mL de tampão de lise. •Mais 8 experimentos foram realizados, mas desta vez, 2,0 g de minério e 0,5 mL de tampão foi empregado.	Células em membrana de microfiltração •Uma membrana foi dividida em 4 partes iguais , mais 1,5mL tampão lise e cada parte foi utilizada em um experimento. •Posteriormente com outro lote de células as membranas foram divididas em 4 partes, acrescentado 1,5mL de tampão lise e realizado 4 experimentos.
---	---	--

Figura 7: Volume de células utilizadas em diferentes experimentos no rompimento celular.

Após o término do rompimento celular, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12000xg. O *pellet* foi descartado, e o sobrenadante utilizado para extração do DNA.

Células de *Escherichia coli*, crescidas em meio Luria-Bertani, foram utilizadas para validar o rompimento mecânico.

4.4 Rompimento enzimático

O método de rompimento enzimático foi utilizado para comparar os resultados obtidos utilizando o rompimento mecânico. O rompimento celular enzimático utilizou a lisozima que catalisa a hidrólise de poli (NAG-NAM) unidos ligações $\beta(1\rightarrow4)$, o polissacarídeo da parede bacteriana e a enzima proteinase K, enzima que cliva ligações peptídicas preferencialmente após os aminoácidos hidrofóbicos (LEHNINGER, 2006). O rompimento celular enzimático foi feito utilizando as culturas de *A. ferrooxidans*, *S. acidocaldarius* e *E.coli*. As membranas contendo células foram transferidas para tubo tipo falcon, e agitadas no vórtex até que as células se desprendessem. A seguir o tubo foi colocado no ultrassom por 30 minutos. Decorrido este tempo uma alíquota foi retirada para a coloração de Gram.

O rompimento celular enzimático seguiu o protocolo convencional de extração. Primeiramente, as células foram lavadas com tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA pH 8,0). Dois volumes (mL) de tampão para cada volume de célula (g) foram adicionados, as células foram ressuspensas, e a seguir a suspensão foi centrifugada a 1792xg, durante 60min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foram adicionados 250 μ L de sacarose 20% e 250 μ L da solução de lisozima a 5mgmL⁻¹. Em seguida, a solução foi agitada suavemente, e incubada a 37°C durante 60 minutos agitando em intervalos regulares. Decorrido o tempo da incubação, 100 μ L da solução de sarcosil 5% e proteinase K 10mgmL⁻¹ foram adicionadas, a solução foi agitada suavemente e incubada a 37°C *overnight*. Decorrido o tempo de incubação com a proteinase K, a solução foi utilizada para extração do DNA gênomico conforme descrito no item 4.5.

Células de *Escherichia coli* crescidas em meio Luria-Bertan, foram utilizadas para validar o rompimento mecânico e enzimático.

4.5. Extração do DNA

A extração do DNA gênomico dos micro-organismos utilizou o protocolo descrito por Tsai (1999), com algumas adaptações.

Em cada tubo tipo *eppendorf* contendo as amostras provenientes do rompimento celular mecânico foram adicionados 250µL de fenol saturado com Tris-HCl, e a seguir agitado no vórtex por 30 segundos. Em seguida, 350µL de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1) foram adicionados e misturados, suavemente. Os tubos foram centrifugados a 12000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *eppendorf* com auxílio de uma pipeta. Ao sobrenadante obtido foi adicionado um volume de isopropanol, e 10^{-1} volume de NaCl 5 mol L⁻¹. O tubo foi agitado e a mistura incubada durante 30 minutos a -20°C. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12000xg por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol absoluto, centrifugado 12000xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente. Por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de água Milli-Q e armazenado -4°C.

Outro protocolo utilizado para a extração do DNA genômico pelo rompimento enzimático também foi utilizado. Em todos os tubos tipo *eppendorf* contendo as amostras provenientes do rompimento celular enzimático, foram adicionados 70µL de solução de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ pH 5, 200 µL de fenol (equilibrado) com TRIS pH 8 e 100 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados e centrifugados a 18928xg durante 15 minutos a 4°C. Após o término da centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionados 200 µL de clorofórmio. Novamente, a mistura foi centrifugada a 18928xg durante 15 minutos. Decorrido este tempo, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado um volume de isopropanol para a precipitação de DNA. A seguir, a mistura foi incubada por 1 hora a -20°C e centrifugada a 18928xg durante 15 minutos a. O sobrenadante obtido a partir desta centrifugação foi cuidadosamente descartado para evitar o desprendimento do precipitado de DNA e *pellet* foi lavado com 300µL de etanol absoluto. Uma nova centrifugação a 18928xg durante 15 minutos foi executada, o sobrenadante foi descartado e o etanol restante evaporado a temperatura ambiente. Por fim, o precipitado de DNA foi ressuspensionado em 50µL de água Mili-Q e incubou-se a 60°C

durante 60 minutos para favorecer a dissolução de DNA e inativar as enzimas que degradam o DNA (as DNAses).

4.6. Gel de agarose

O DNA extraído foi visualizado utilizando gel de agarose. Uma solução de agarose a 0,8% (m/v) foi preparada utilizando como solvente o tampão TBE 0,5%, (5,4g TRIS, 2,75g ácido bórico e 2,0 mL de EDTA 0,51M pH 8,0 para cada L de tampão). A agarose foi solubilizada utilizando o micro-ondas, durante aproximadamente 2 minutos, para preparar 150 mL da solução. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e a seguir vertida na cuba de eletroforese horizontal, com as canaletas já posicionadas. A cuba foi coberta com o tampão TBE 0,5%. Em seguida, 3 μ L de tampão de corrida e 5 μ L da amostra foram homogeneizados e aplicado nas canaletas do gel. O gel foi corrido por aproximadamente 2 horas a uma voltagem de 100 V e 60 A.

As bandas de DNA foram coradas com brometo de etídio e visualizadas com auxílio de um transiluminador (*Loccus*) sob luz UV.

4.7. Coloração de Gram

As células dos micro-organismos foram coradas utilizando a coloração de Gram. Esfregaços das células foram feitos sobre lâminas histológicas de vidro, com o auxílio de alça de níquel-cromo. A seguir os esfregaços foram secos e fixados no fogo. O esfregaço foi recoberto com solução de cristal violeta por um minuto. Decorrido esse tempo, as placas foram lavadas e o excesso do corante retirado com água destilada. A seguir, o esfregaço foi coberto com lugol por um minuto e lavado com água destilada. Na próxima etapa, o esfregaço foi recoberto com etanol absoluto por 10 a 15 segundos. Por fim, corante fucsina foi colocado sobre o esfregaço por um minuto e meio e, o excesso foi lavado com água destilada. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, e visualizadas no microscópio óptico utilizando o aumento de 1000X.

4.5. Dosagem das proteínas

O método de Lowry foi utilizado para a dosagem de proteínas totais. Sua principal vantagem é a alta sensibilidade e, por isto, é utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em diversos meios. O método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, reagente Folin-Ciocalteu, o qual sofre uma redução quando reage com proteínas na presença do cobre (II), produzindo um composto com absorção de 660 nm. Essa redução ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetra-peptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas (SANTOS, 2012).

Para a realização da dosagem de proteínas pelo método de Lowry, preparou-se duas soluções diferentes:

Solução 1: 0,1 mL sulfato de cobre a 0,39 g/mL⁻¹ e 5mL de Tartarato de sódio 10 g/L⁻¹.

Solução 2: 50 mL do Hidróxido de sódio 4g e de carbonato de sódio 2% m/v e 1 mL da solução 1.

As amostras foram adicionadas em tubos de ensaio. A seguir foi acrescentado 1mL da solução 2 homogeneizado rapidamente e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 1 N, homogeneizado rapidamente e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, a absorbância foi lida a 660 nm. A curva padrão foi construída utilizando soro albumina bovina como padrão (tabela 4.3).

Tabela 3: Dados para a obtenção da curva analítica de soroalbumina, utilizando o método de Lowry.

Tubo	BSA (0,2 mg/mL) uL	Água deslilada (uL)
Branco	-	150
P1	150	0
P2	120	30
P3	100	50
P4	80	70
P5	50	100
P6	20	130

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração de DNA de cultura inoculada com *Sulfobacillus thermossulfidooxidans*

As células do *S.thermossulfidooxidans* foram fornecidas junto com o minério e submetidas ao rompimento celular e extração do DNA, conforme descrito no item 4.2 e 4.5, respectivamente. Nenhuma banda de DNA genômico foi observada no gel de agarose corado com brometo de etídeo (figura 8). Este resultado levantou algumas hipóteses: a) não havia quantidade suficiente de células na amostra de minério utilizada para o rompimento celular e extração de DNA; b) as oito diferentes condições utilizadas no rompimento celular empregando o moinho de bolas foram eficiente para romper as células. Para responder estas questões resolvemos utilizar membranas de microfiltração contendo células de *S.thermossulfidooxidans* utilizando o moinho de bolas e os oitos experimentos conforme descrito no item 4.2 (figura 9).



Figura 8: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. O DNA genômico extraído das amostras de *Sulfobacillus thermossulfidooxidans* no minério (S1 a S8) utilizando as condições descritas na tabela 4.2. PPM padrão de massa molecular 1kb.

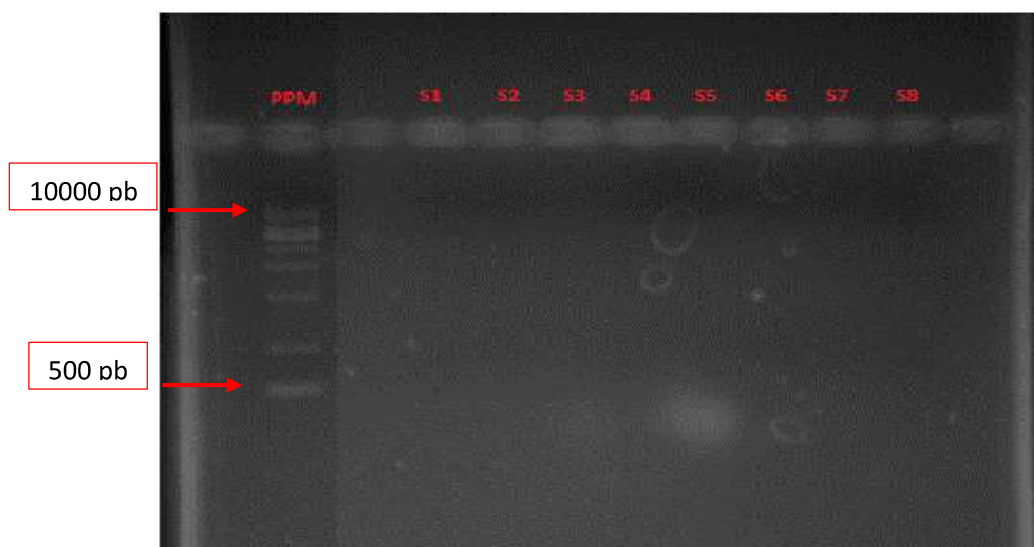


Figura 9: Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O DNA genômico extraído das amostras de *Sulfobacillus thermossulfidooxidans* retiradas na membrana (S1 a S8) utilizando as condições descritas na tabela 4.2. PPM padrão de massa molecular 1kb.

A figura 9 apresenta o resultado do DNA extraído das células obtidas a partir da membrana de microfiltração. Apenas na amostra S5 foi possível visualizar uma banda menor que 500pb na condição de rompimento que utilizou 1,6 g de esferas, 20 hz e 7 minutos de rompimento. Esta banda de baixa massa molar evidencia a degradação do DNA genômico. Os resultados obtidos utilizando as células da membrana também foram inconclusivos. Resolvemos utilizar o *Acidithiobacillus ferrooxidans* obtido a partir do meio de cultivo. Os resultados para este micro-organismo estão descritos no item seguinte.

5.2 Extração de DNA de cultura inoculada com *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A figura 10 A e B mostra o resultado obtido após a extração do DNA genômico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, presente em meio líquido e proveniente de dois cultivos diferentes. Na figura 10 A foram feitos 4 experimentos correspondentes ao bloco II (ver

tabela 4.2), devido à pequena quantidade de células o planejamento utilizado foi em blocagem. A figura 10B apresenta o resultado de 8 experimentos.

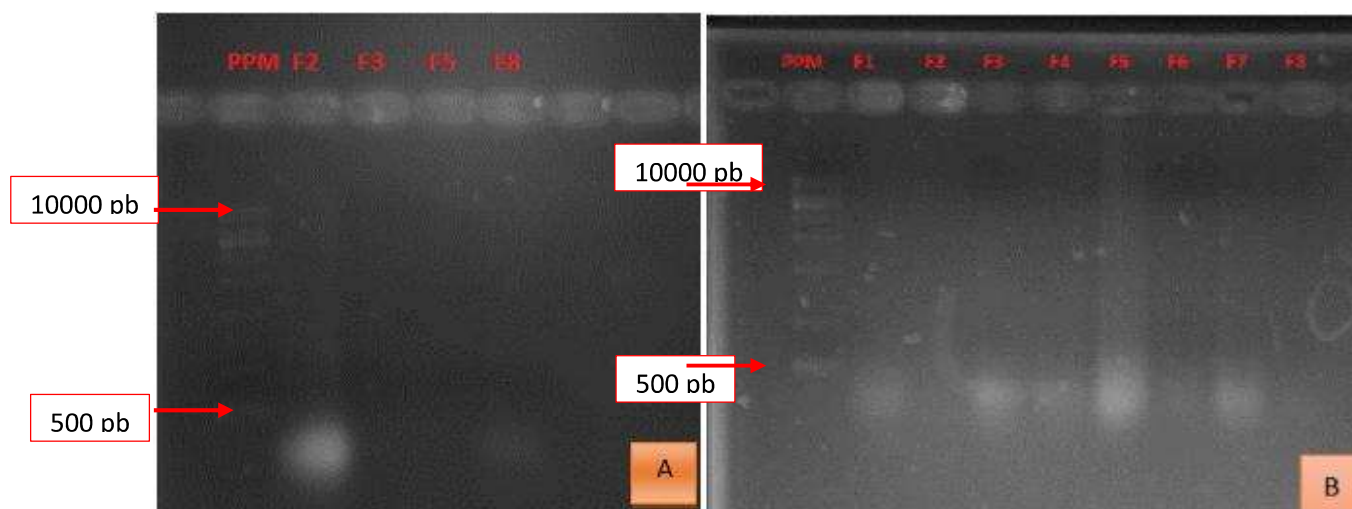


Figura 10: gel de agarose 0,8%(m/v) corado com brometo de etídio, do DNA genômico extraído das amostras de *A.ferrooxidans* A: primeiro bloco do planejamento experimental (F2, F3, F5 e F8). B: planejamento experimental completo dois blocos (F1 a F8). PPM padrão de massa molecular 1kb.

Analisando a figura 10 A observamos a presença de uma banda menor que 500pb nas canaletas F2 e F8. Na figura 10 B apenas na canaleta F2 não foi possível observar bandas menores que 500 pb. Estas bandas menores que 500 pb, indicam que o DNA genômico foi degradado durante o processo de rompimento ou de extração. Este resultado esclareceu a hipótese que o moinho de bolas foi eficiente para o rompimento celular. Logo, a ausência de bandas no gel obtido utilizando as amostras provenientes do *Sulfobacillus thermossulfidooxidans* (figura 8) pode ser devido a pequena concentração de células na amostra, ou a interferência do minério no processo de rompimento e ou extração. Os resultados apresentados na figura 10 A levantaram uma nova questão: o que causou a degradação do DNA genômico do *A. ferrooxidans*? Seriam as condições utilizadas durante o rompimento celular? Ou durante a extração do DNA? Ou a características da amostra?

Antes de respondermos as novas hipóteses levantadas a partir dos resultados do *A.ferrooxidans*, analisamos as amostras obtidas utilizando o *Sulfolobus acidocaldarius*

presente no minério ou membrana de microfiltração, os resultados estão descritos no próximo item.

5.3 Extração de DNA de cultura inoculada com *Sulfobolus acidocaldarius*

A células de *Sulfobolus acidocaldarius* estavam presentes no minério e após sua preparação, foram rompidas pelo moinho de bolas, e o DNA genômico extraído de acordo com o descrito nos itens 4.2, 4.3 e 4.5, respectivamente. A análise da figura 11 mostra que nenhuma banda de DNA genômico foi visualizada no gel de agarose. Resultado semelhante ao obtido para o *Sulfobacillus thermossulfidooxidans* (figura 9).

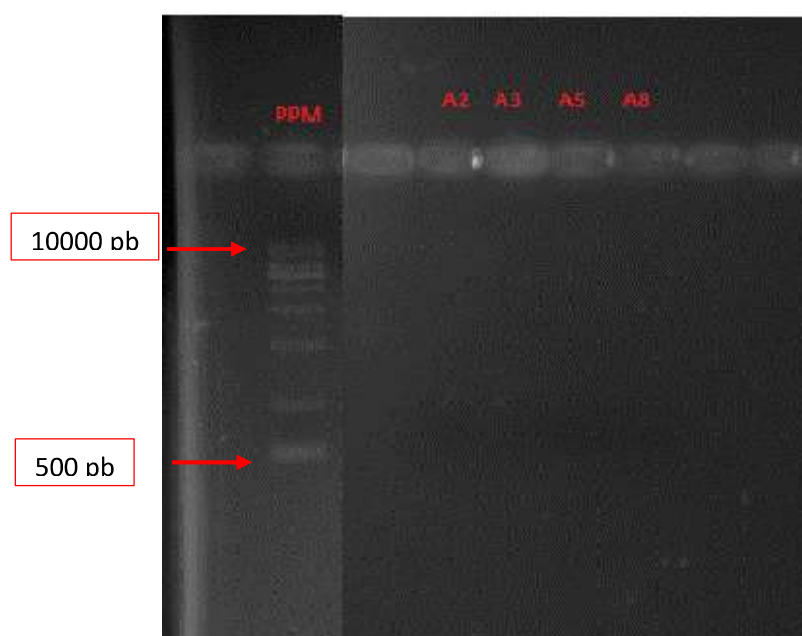


Figura 11: Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, do DNA genômico extraído das amostras de *Sulfobolus acidocaldarius* no minério nas quatro condições mostradas na tabela 4.2, do bloco II. PPM padrão de massa molecular 1kb.

Este resultado sustentou a hipótese que o rompimento e a extração de DNA das células presentes no minério não era efetivo. Para esclarecemos esta dúvida utilizamos duas membranas contendo *S.acidocaldarius*. Uma membrana continha células cultivadas na presença de cloreto e outra membrana, células cultivadas na ausência de cloreto. Essas membranas foram divididas em 4 partes iguais, cortadas em pequeninos pedaços e

utilizadas no rompimento celular, conforme descrito no item 4.2. O resultado destes experimentos é apresentado na figura 12.

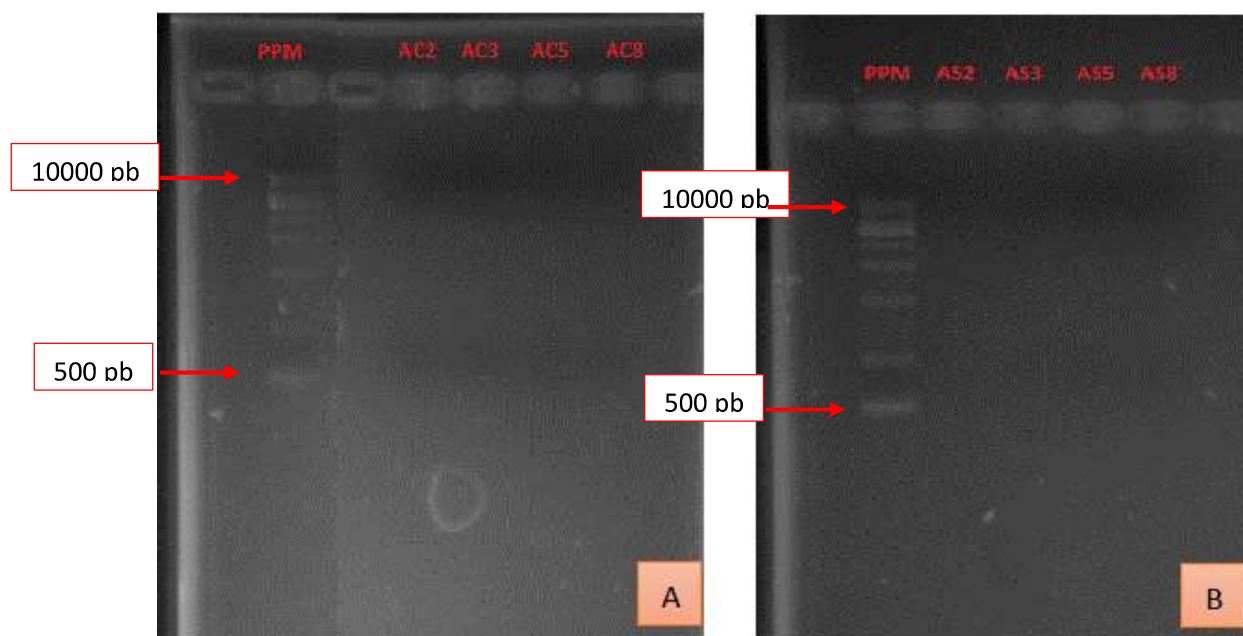


Figura 12: Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, do DNA genômico extraído das amostras de *Sulfolobus acidocaldarius* utilizando o primeiro bloco do planejamento experimental. A: *Sulfolobus acidocaldarius* cultivado na presença de cloreto (AC). B: *Sulfolobus acidocaldarius* cultivado na ausência de cloreto (AS). PPM padrão de massa molecular 1kb.

Analisando a figura 12A e B, não foi observado nenhuma banda no gel, ou seja, não houve sucesso na extração do DNA genômico do *S. acidocaldarius* a partir da membrana de microfiltração. Neste momento, novas hipóteses foram levantadas: a) a quantidade de células presentes na amostra seria insuficiente. b) o método de rompimento mecânico não seria adequado para romper a parede celular destes microorganismos. Para responder a 1ª hipótese resolvemos fazer uma coloração de Gram para visualizarmos as células, e a 2ª hipótese fizemos o rompimento celular dos microorganismos obtidos de meio de cultivo a partir do minério e membrana utilizando o rompimento enzimático. Resolvemos utilizar *Escherichia coli* como controle positivo dos métodos de rompimento enzimático e extração de DNA.

5.4 Rompimento enzimático

O rompimento enzimático de *Escherichia coli* e *A. ferrooxidans* (meio de cultivo), *A. thiooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* e *S. acidocaldarius* (presentes na membrana) utilizou o procedimento descrito no item 4.2. O DNA genômico foi extraído conforme descrito no item 4.5. O resultado destes experimentos é mostrado na figura 13.



Figura 13: Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, do DNA genômico extraído das amostras de *E.coli*, *A. thiooxidans* (T), *A. ferrooxidans* (F), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (S) e *Sulfolobus acidocaldarius*, sem cloreto (AS) e com cloreto (AC), na membrana. PPM padrão de massa molecular 1kb.

A figura 13 mostra que apenas o DNA genômico da *E.coli* e do *A. ferrooxidans* foi extraído, podemos observar uma banda no gel de aproximadamente 10000pb para a *E.coli*. Já o DNA do *A.ferrooxidans* apresentou banda de massa molar indicando degradação do material genômico. A *E.coli* foi um padrão utilizado para garantir a eficiência do método de rompimento celular e extração do DNA. Para os outros micro-organismos não houve sucesso na extração do DNA genômico. Provavelmente, a amostra utilizada no rompimento celular apresenta uma pequena quantidade de células, fato que prejudica a extração do DNA. Nós observamos que no sobrenadante descartado antes do rompimento celular haiva uma quantidade considerável de células presente (dados não mostrados). Uma forma de solucionar este problema é utilizar uma centrífuga

com maior velocidade de rotação. Outro fator que prejudicou a extração é a presença de minério, as etapas de filtração realizadas para coletar as células e de lavagem não foram suficientes para eliminar estes contaminantes e alguns íons metálicos permaneceram.

5.5 Coloração de Gram

As células de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *S. thermossulfidooxidans* e *S. acidocaldarius* foram coradas pela coloração de Gram e visualizadas em microscópio óptico. Os esfregaços preparados a partir dos tipos celulares são apresentados na figura 14.

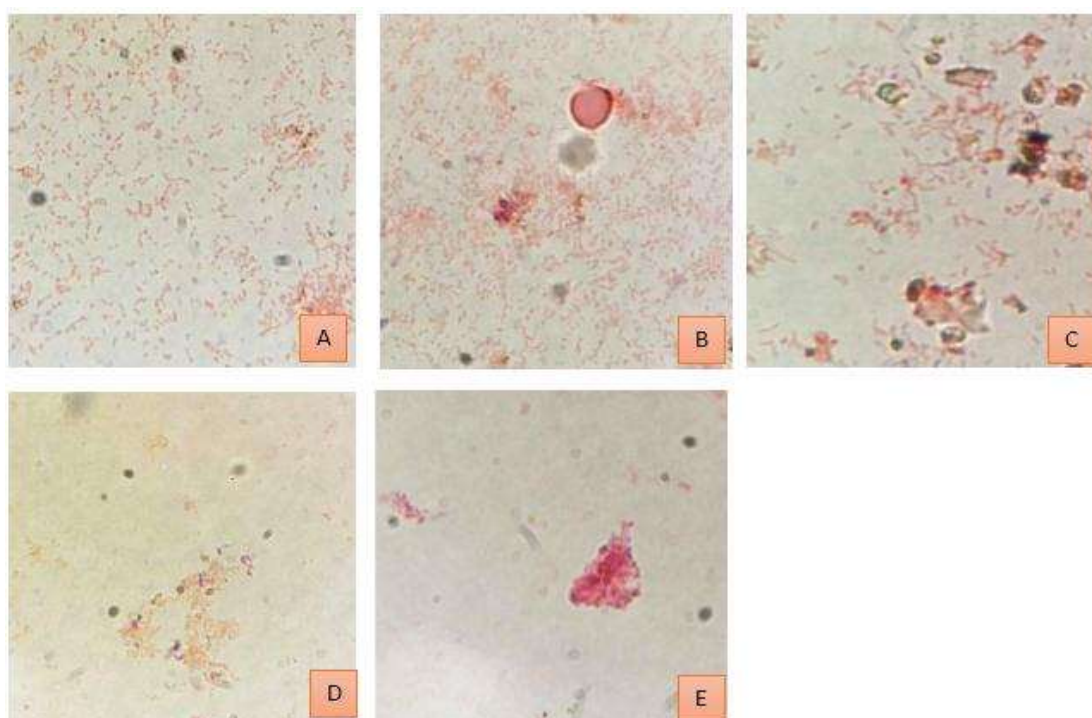


Figura 14: Coloração de Gram das diferentes espécies obtidas. A- *A. Thiooxidans*. B- *A. Ferrooxidans*. C- *Sulfobacillus thermossulfidooxidans*. D- *Sulfolobus acidocaldarius* cultivado com cloreto. E- *Sulfolobus acidocaldarius* cultivado sem cloreto. Aumento de 1000X.

A análise da figura 14 mostra que havia células presentes nas amostras *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermossulfidooxidans*. Os dados obtidos para *S. acidocaldarius* com e sem cloreto foram inconclusivos. De acordo com a literatura as células de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans* são Gram negativas e apresentam forma de

bastão, as células presentes na figura 14 A e B foram Gram negativas e apresentaram a forma de bastão. Entretanto o resultado obtido para *S. thermosulfidooxidans* foi inconclusivo, de acordo com a literatura a espécie *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* é Gram positiva, mas utilizando a coloração de Gram as células foram Gram negativas, em forma de bastão assim como citado pela literatura. Novas amostras devem ser analisadas para esclarecermos este resultado. Para a arqueia *S. acidocaldarius* não conseguimos visualizar a presença nítida de células (figura 14 D e E). Provavelmente, a formação de biofilme destes micro-organismos dificulta a retirada das células do minério. Desta forma, novos experimentos utilizando substâncias que atuam no rompimento do biofilme serão necessários para a extração das células e consequentemente obtenção do seu DNA genômico.

5.6 Rompimento enzimático e mecânico com a *E.coli* utilizada como padrão

Este experimento foi feito para elucidar a questão: o moinho de bolas não é adequado para extração do DNA, pois leva à sua degradação (figura 10 A e B). As condições 2,3,5 e 8 do planejamento experimental (Tabela 4.2) foram utilizadas para romper as células descritas acima. Após o rompimento celular, o DNA genômico da *E.coli* e de *A.ferrooxidans* foi extraído utilizando o protocolo descrito no item 4.5. Analisando a figura 15 podemos concluir que o moinho de bolas não degradou o DNA, pois nos experimentos feitos com a *E.coli*, observamos bandas de massa molar ao redor 10000 pb, e um pouco de DNA degradado, bandas menores que 500 pb (Figura 15). As

amostras do *A.ferrooxidans* apresentaram bandas de aproximadamente 10000 pb fracas, e bandas abaixo de 500 pb um pouco mais nítidas.



Figura 15: Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. O DNA genômico foi extraído das amostras de *E.coli*, *A. ferrooxidans* utilizando o método mecânico, Foram realizadas 4 extrações utilizando o planejamento experimental em blocagem com as condições do bloco II.PM padrão de massa molecular 1kb.



Figura 16: Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio. O DNA genômico de *E.coli* (*E.c.*), *A. ferrooxidans* (*F*) presentes em meio líquido, o *A. Thiooxidans* (*T*), *S. thermoossulfidooxidans* cultivado sem minério (*SS*) e *S. thermoossulfidooxidans* cultivado com minério (*SC*) foram rompidas utilizando o método enzimático. PPM padrão de massa molecular 1kb.

Pela análise da figura 16, foi possível observar bandas apenas na amostra de *E.coli*, e *A. ferrooxidans*. Novamente, o DNA genômico não foi extraído das amostras *S. thermoossulfidooxidans*, *A. thiooxidans* e *S. acidocaldarius*.

O DNA genômico do *A. ferrooxidans* foi extraído de células cultivadas em minério utilizando uma solução de Tison X-100 para obter as células livres de minério de ferro (Henao, 2010). Starosvetsky et al (2013), extraiu o DNA de *A. ferrooxidans* e *A. thiooxidans* de cultura pura e de amostras de água utilizando *kit* comercial. Escobar et al, extraíram DNA de amostras de minério contendo micro-organismos utilizando o procedimento descrito: 10 gramas de minério foram lavadas três vezes com ácido sulfúrico 0,3 N, a seguir o minério foi lavado em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 acrescido de 50mM de EDTA e 20% (m/v) de sacarose. As células aderidas foram lisadas utilizando três incubações sucessivas: 1 hora a 37 °C em 15 mgmL⁻¹ de lisozima, 1 hora a 50°C em 10 mgmL⁻¹ de proteinase K, SDS 4% (m/v) e 5 M de NaCl, e 1 hora a 65°C em CTAB a 1%. Este protocolo é uma alternativa futura a ser testada para a extração do DNA das amostras utilizadas neste trabalho de conclusão de curso, neste caso utilizaríamos diretamente o minério utilizado no meio de cultivo.

5.7 Dosagem de proteínas

Com o intuito de dosar a proteína total, utilizou-se o método de Lowry. Para isso, construiu-se uma curva padrão, apresentada na figura 17, com soro albumina bovina em diferentes concentrações e com o valor de absorbância encontrado para cada concentração. Portanto, com a equação obtida a partir do gráfico, pode-se obter a quantidade de proteína total desconhecida das amostras.

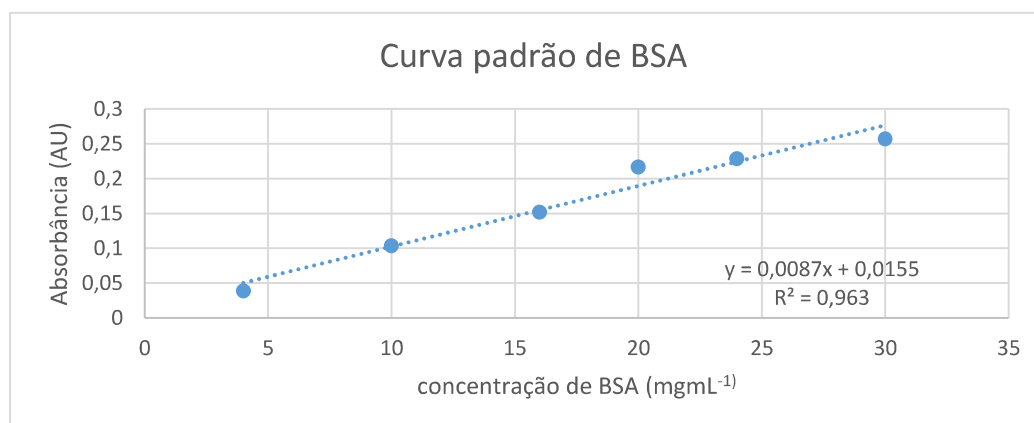


Figura 17: Curva padrão para dosagem de proteínas pelo método de Lowry, usando albumina como padrão.

Tabela 4 – Dosagem de proteínas totais das amostras e concentração de proteína pelo método de Lowry

Amostras	Absorbância (AU)	Concentração de proteína ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Ferrooxidans</i> 2	0,116	577,58
<i>Ferrooxidans</i> 3	0,115	571,83
<i>Ferrooxidans</i> 5	0,128	646,55
<i>Ferrooxidans</i> 8	0,173	905,17
<i>E.coli</i> 2	0,219	1169,54
<i>E.coli</i> 3	0,249	1341,95
<i>E.coli</i> 5	0,217	1158,04
<i>E.coli</i> 8	0,16	830,45

A tabela 4 apresenta a concentração de proteína total de quatro experimentos utilizando a *A. ferrooxidans* e a *E. Coli*. Apenas o experimento 8 a concentração de proteína total do *A. ferrooxidans* foi maior que da *E. coli*. A concentração de células de *E.coli* utilizada no rompimento celular foi de $129,5 \text{ mg mL}^{-1}$, já a concentração de células do *A. ferrooxidans* foi de $49,10 \text{ mg mL}^{-1}$, no fundo do *eppendorf* observamos a presença de minério, logo parte da massa de *A. ferrooxidans* foi minério, o que pode explicar a menor concentração de proteína nestas amostras, quando comparada a *E. coli*.

5.8 Planejamento experimental

Para todas as condições do rompimento mecânico não foi possível concluir o planejamento experimental, pois em nenhuma delas ocorreu o esperado, ou seja, o DNA genômico. A presença de minério nas células de *A. ferrooxidans* interferiu na extração do DNA genômico impossibilitando a realização dos cálculos do planejamento experimental.

6- CONCLUSÃO

O moinho de bolas foi eficiente para o rompimento celular e extraiu o DNA genômico da *E.coli* e do *A. ferrooxidans*,

Tanto o moinho de bolas quanto o rompimento enzimático foram eficientes para o rompimento celular.

Para os outros micro-organismos, *A. thiooxidans*, *Sulfobacillus thermoosulfidooxidans* e *Sulfolobus acidocaldarius*, não foi possível extrair o DNA genômico utilizando o método de rompimento mecânico ou enzimático. Provavelmente, o insucesso deve-se à insuficiente quantidade de células na amostra.

O planejamento experimental não foi concluído devido a dificuldade de rompimento celular e extração do DNA genômico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.K. *Detecção de bactérias redutoras de sulfato em efluente e sedimento de mina de urânio*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais). Comissão Nacional de Energia Nuclear – Centro de desenvolvimento da tecnologia nuclear. Belo Horizonte, 2005.

BATISTA, L. A. *Análise das comunidades microbianas presentes em depósitos de minerais sulfetados com ocorrência de drenagens ácidas de minas e em sistemas de biolixiviação*. 2009. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

BAKER, B.J.; BANFIELD, J.F. Microbial communities in acid mine drainage. *Microbiology Ecology*, v.44,139-152, 2003.

Beveridge, T. J. & Schultze-Lam, S. 1996. The response of selected members of the Archaea to the Gram stain. *Microbiology*, 142:2887-2892.

BELI, E. *Estudo da diversidade microbiana em reator ASBR no tratamento da drenagem ácida de minas sintética sob diferentes condições operacionais*. 2014. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

BLAUTH, P.L. *Oxidação da calcopirita (CuFeS₂) por Acidithiobacillus ferrooxidans em presença de cisteína e de Acidithiobacillus thiooxidans*. 2008. 82f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BÜGGER, K.; TORARINSSON, E.; REDDER, P.; CHEN, L.; GARRETT, R.A. Shuffling of Sulfolobus genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. *Biochemical Society Transactions* (2004), v.32, part , 2, p. 180-185).

BUTTON, S.T. *Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados*. 2012. 87p. Programa de pós-graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARDASO, A. M.; CLEMENTINO, M, B, M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R, V.; ALQUERES, S, M, C.; ALMEIDA, W, I. Archaea: Potencial biotecnológico. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* – ed 30, p.71-77, 2003).

CHEN, L.; BRUGGER, K.; SKOVGAARD, M.; REDDER, P.; SHE, Q.; TORARINSSON, E.; GREVE, B.; AWAYEZ, M.; ZIBAT, A.; GARRETT, R.A. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a Model Organism of the crenarchaeota. *Journal of Bacteriology*, vol. 187, n. 14, p.4992-4999, 2005.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* Vol. 8. April, 1986.

COLMER, A. R. e HINKLE, M. E. The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. *Science*, 106, 253-256, 1947.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, v. 9, n. 1, p. 23-32, 2008.

DHALIWAL, A. DNA extraction and purification. *Materials and Methods. New Jersey*, v.3, p. 191, 2013.

DIAS, A.B.A. filogenia molecular e cultivo de *Archaea* de solos de Cerrado *sensu stricto*. (Dissertação) Programa de pós-graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

ESCOBAR, B.; Bustos, K.; Morales, G.; Salazar, O. *Rapid and specific detection of Acidithiobacillus ferrooxidans e Leptospirillum ferrooxidans by PCR*. Disponível em http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/125184/Escobar_Blanca.pdf?sequence=1. Acessado em 25 de novembro 2015.

ESTRELA, C., PÉCORA, J.D. *Características da citologia bacteriana*. Pós-Graduação da USP, 1997.

GOTTSCHALK, G. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag New York Inc. New York, USA, 1979.

GROGAN, D.W. Isolation and fractionation of cell envelope from the extreme thermo-aciophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of microbiological methods* 26 (1996) 2012, p.35-43.

HENAO, D. M. O. H493e Estudo de genes envolvidos no processo de adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* em calcopirita (CuFeS₂), 2010 150 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara.

JÚNIOR, A. P.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*- 1ª edição. Barueri, SP: Manole, 2005.

KARAVAJKO, G.I.; BULYGINA, E.S.; TSAPLINA, T.I.; BOGDANOVA, K.M. *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: a new lineage of bacterial evolution? *Institute of Microbiology, UssR Academy of Sciences*, v. 261, number 1, 8-10, February 1990.

KLINGL, A. S-layer and cytoplasmic membrane- exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. *Frontiers in Microbiology*. 2014. 6f.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. – CAPÍTULO 9.

LENS, P. N. L., VISSER, A., JANSSEN, A. J. H., POL, L. W. H. e LETTINGA, G. Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. *Critical Reviews in*

Environmental Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 41-88, 1998.

LIMA, A.; GARCEZ, A.; ALEXANDRE, B.; CERQUEDA, G. *Extração de DNA genômico e minipreparação do plasmídeo (métodos de lise alcalina e biolining)*. Rio de Janeiro, 2010.

MADIGAN, M. T. e MARTINKO, J. M. *Microbiologia de Brock*. 10ed, São Paulo: Prentice Hall, 2004. 624pp.

MADSEN, E.L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, v.22, p. 456-464).

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, v.34, p.265-276, 2008.

MARINELLO, M. *Rompimento celular*. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS)- Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Bento Gonçalves, 2012.

MELLO, J.W.V; DUARTE, H.A; LADEIRA, A.C.Q. Origem e Controle do Fenômeno Drenagem Ácida de Mina. *Cadernos temáticos de química nova na escola*. N.8, p-24-29, maio 2014.

MORALES, M.A. *Extracellular polymeric substances (EPS) production in Sulfolobus thermosulfidooxidans and its relevance on attachment to metal sulfides*. 2012. 98f. Tese (Mestrado em ciências- microbiologia). Faculdade de Ciências. Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E. Variables search technique applied to gas separation. *Química Nova*. v.25, n.2, p.327-329, 2002.

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

OLIVEIRA, M.C.S et al. *Fundamentos teóricos-práticos e protocolo de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

POSTGATE, J.R. *The sulphate-reducing bacteria*. 2^a edição Cambridge University Press, New York, 1979.

RAWLINGS, D.E; KUSANO, T. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol, Rev* 58:39-55.

RODRIGUES, I.C.B. *Métodos Moleculares Aplicados a Biotecnologias Relacionadas ao Ciclo do Enxofre*. 2012. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) -

Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

SANTOS, F. R. D. *Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza*. 63f. Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Araraquara, 2012.

SANTOS, L. R.G. *Biolixiviação de um concentrado sulfetado complexo de níquel e de ferro e caracterização dos produtos de oxidação*. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Programa de pós-graduação em Engenharia de Materiais da REDEMAT, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

SCHAEFER, R. *Técnicas em biologia molecular*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006.

SILVAS, F.P.C. *Biotecnologia aplicada ao tratamento de Drenagem Ácida de Mina*. 2010. Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

STAROSVETSKY, J.; ZUKERMAN, U.; ARMON, R. H. A simple médium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* from water samples. *Journal of Microbiological Methods*. V.92, p. 178-182, 2013.

TANG, K.; BASKARAN, V.; NEMATI, N. Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering journal*, 44, p. 73-94, 2009.

TRAVISANY, D., GENOVA, A.D., SEPÚLVEDA, A., BOBADILLA-FAZZINI, R.A., PARADA, P., MAASS, A. Draft Genome Sequence of the *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Cutipay Strain, an Indigenous Bacterium Isolated from a Naturally Extreme Mining Environment in Northern Chile. *Journal of bacteriology* 2012, p.6327-6328.

VALDES, J.; PEDROSO, I.; QUATRINI, R.; DODSON, R. J. TETTELIN, H.; BLACK, R.; EISEN, J.A.; HOLMES, D.S. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolismo: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, v. 9, 597, 2008).

WHEATON, G. Counts, J.; MUKHERJEE, A.; KRUH, J. KELLY. The confluence of Heavy metal biooxidation and heavy metal resistance: implications for bioleaching by extreme thermoacidophiles. *RMIneral* 2015 (5) p.397-451.