



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA

ANA PAULA FELÍCIO NOVELLO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*
EM RESPOSTA AOS SULFETOS MINERAIS CALCOPIRITA E BORNITA E
EFEITO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *A. ferrooxidans* LR
CONTENDO CISTEÍNA NA OXIDAÇÃO BACTERIANA DA CALCOPIRITA**

Araraquara-SP

2008

ANA PAULA FELÍCIO NOVELLO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*
EM RESPOSTA AOS SULFETOS MINERAIS CALCOPIRITA E BORNITA E
EFEITO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *A. ferrooxidans* LR
CONTENDO CISTEÍNA NA OXIDAÇÃO BACTERIANA DA CALCOPIRITA**

Tese apresentada ao Instituto de Química
- Campus de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, como parte
dos requisitos para a obtenção do Título
de Doutor em Biotecnologia pelo
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Co-orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr

Araraquara-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

N939a Novello, Ana Paula Felício
Análise proteômica diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita / Ana Paula Felício Novello. -- Araraquara : [s.n], 2008
189 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Teresa Marques Novo
Co-orientador: Oswaldo Garcia Júnior

1. Biotecnologia. 2. Proteínas. 3. Bactéria acidofílica. I. Título.

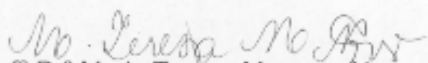
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

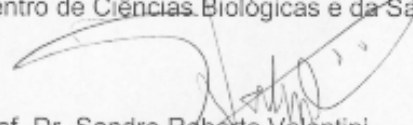
ANA PAULA FELICIO NOVELLO

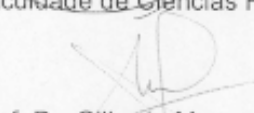
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

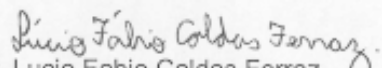
Araraquara, 24 de julho de 2008

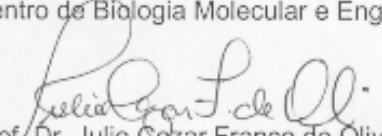
BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Maria Teresa Marques Novo
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCar, São Carlos


Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Gilberto Moraes
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFSCar, São Carlos


Dr. Lucio Fabio Caldas Ferraz
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – UNICAMP, Campinas


Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo

DADOS CURRICULARES

ANA PAULA FELÍCIO NOVELLO

1. Dados Pessoais

Nascimento: 26 de junho de 1978

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara-SP

Filiação: Antonio Carlos Felício

Josefa Teresa dos Passos Felício

Estado civil: casada

Profissão: Química

Documento de identidade: 27877184-1, SSP/SP

Cadastro de Pessoa Física: 267.728.628-99

Endereço: Rua Dr. Waldo Barbieri, nº 41, apto 104, Ed. I, Bairro Jardim Viaduto

CEP: 14810-273, Araraquara - SP

e-mail: anafelic@iq.unesp.br

2. Formação Acadêmica/Titulação

2.1. Graduação

Bacharel em Química, Instituto de Química - UNESP, Araraquara, SP, concluído em 22 de dezembro de 2000.

Título do trabalho de Monografia: “Efeito do cobre na síntese de proteínas de membrana de *Thiobacillus ferrooxidans*”.

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Bolsa de Iniciação Científica financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

2.2. Pós-Graduação

Mestrado em Biotecnologia - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química - UNESP, Araraquara, SP, concluído em 27 de fevereiro de 2003.

Título da Dissertação: “Efeito dos metais cobre, cádmio, zinco e níquel na respiração, crescimento e no perfil de proteínas periplasmáticas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR”.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Co-orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr.

Bolsa de Mestrado financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Doutorado em Biotecnologia - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química - UNESP, Araraquara, SP, concluído em 24 de julho de 2008.

Título da Tese: “Análise proteômica diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita”

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Co-orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr.

Bolsa de Doutorado financiada pela Vale (Brasil).

3. Produção bibliográfica

3.1. Trabalhos científicos publicados

Felício, A. P., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M. “The effect of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE”. Hydrometallurgy, v. 71, p. 165-171, 2003.

Felício, A. P., Oliveira, E. de, Odena, M. A., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ferraz, L. F. C., Reis, F. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M. “Chalcopyrite and bornite differentially affect protein synthesis in planktonic cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*”. Advanced Materials Research, v. 20-21, p. 461-464, 2007 (Apêndice A, p. 136).

3.2. Trabalho científico em fase final de preparação

Felício-Novello, A. P., Oliveira, E. de, Odena, M. A., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ferraz, L. F. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M. “Differential proteomic analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* planktonic cells exposed to bornite or chalcopyrite minerals”. Manuscrito em fase final de preparação, a ser submetido para Proteomics (Apêndice B, p. 143).

3.3. Trabalhos completos publicados em congressos

Felício, A. P., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ottoboni, L. M. M., Novello, J. C., Toyama, M., Novo, M. T. M. "Effects of metal ions on ferrous ion oxidation and periplasmic protein profiles in *Acidithiobacillus ferrooxidans*". In: 16th International Biohydrometallurgy Symposium, 2005, Cape Town, South Africa, p. 811-816.

Felício, A. P., Bertolini, M. C., Ferraz, L. F.C., Reis, F. C., Ottoboni, L. M. M., Garcia Jr, O., Novo, M. T. M. "Oxidation of chalcopyrite and bornite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: respirometry assay and differentially expressed proteins". In: XXII Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa e VII Meeting of the Southern Hemisphere on Mineral Technology, 2007, Ouro Preto-MG, Brasil, v. II, p. 325-331.

3.4. Resumo expandido publicado em congresso

Felício, A. P., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ottoboni, L. M. M., Novello, J. C., Toyama, M., Novo, M. T. M. "Effects of metal ions on ferrous ion oxidation and periplasmic proteins profiles in *Acidithiobacillus ferrooxidans*". In: 16th International Biohydrometallurgy Symposium, 2005, Cape Town, South Africa, p. 152-154.

3.5. Resumos apresentados em congressos

Felício, A. P., Bertolini, M. C., Novo, M. T. M., Garcia Jr, O. "Efeito do cobre na síntese de proteínas de membrana de *Thiobacillus ferrooxidans*". In: XII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2000, São José do Rio Preto-SP, Brasil.

Felício, A. P., Bertolini, M. C., Novo, M. T. M., Garcia Jr, O. "Effects of copper ions on synthesis of membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*". In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2001, Caxambu-MG, Brasil.

Felício, A. P., Bertolini, M. C., Novo, M. T. M., Garcia Jr, O. "Effects of copper ions on synthesis of membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*". In: 14th International Biohydrometallurgy Symposium, 2001, Ouro Preto-MG, Brasil.

Felício, A. P., Novo, M. T. M., Bertolini, M. C., Garcia Jr, O. "Effects of copper, cadmium, zinc and nickel ions on growth and profiles of periplasmic proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans*". In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2004, Caxambu-MG, Brasil.

Felício, A. P., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ferraz, L. F. C., Reis, F. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M. "Oxidação da calcopirita e bornita por *A. ferrooxidans*: estudos respirométricos e de expressão diferencial de proteínas". In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos-SP, Brasil.

Felício, A. P., Oliveira, E. de, Odena, M. A., Garcia Jr, O., Bertolini, M. C., Ottoboni, L. M. M., Novo, M. T. M. "Proteomic analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* planktonic cells exposed to bornite or chalcopyrite minerals". In: XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia-SP, Brasil.

Dedico esse trabalho,

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela benção, pelas conquistas, pelas alegrias e vitórias, pela saúde e fé. Agradeço pelo dom de viver!

Aos meus pais, Teresa e Antonio Carlos, pelo amor, carinho, incentivo, força. Obrigada pelo ombro amigo que sei que posso contar por toda minha vida. Por serem meus exemplos de vida, sempre, em todos os momentos. Agradeço com imensa gratidão e amor.

Ao Marcelo, meu grande amigo e companheiro, por fazer parte da minha vida, pelo apoio, paciência, conversas, compreensão, pelo ombro amigo, pelo exemplo de pessoa e de profissional! Obrigada, com todo meu amor!

A esse pequeno ser, um presente de Deus, que mesmo eu não conhecendo, já mudou muito a minha vida. Obrigada por ser a minha tranquilidade.

“Se por um instante Deus se esquecesse de que sou uma marionete de pano e me presenteasse um pedaço de vida, aproveitaria esse tempo o máximo que pudesse... Possivelmente não diria tudo o que penso, mas definitivamente pensaria em tudo o que digo. Daria valor às coisas, não por aquilo que valem, senão pelo que significam... Tantas coisas eu aprendi de vocês, os homens... Eu aprendi que todo o mundo quer viver em cima da montanha, sem saber que a verdadeira felicidade está na forma de subir a escarpada... Eu aprendi que um homem só tem direito de olhar a um outro de cima para baixo, quando vai ajuda-lo a levantar-se... Sempre diga o que sentes e faz o que pensas... Sempre há um amanhã e a vida nos dá outra oportunidade para fazer as coisas bem...”

Gabriel García Márquez

AGRADECIMENTOS

Este trabalho de Doutorado está sendo concluído com a certeza do envolvimento de pessoas importantes em minha vida, amigos, familiares, professores, colegas de trabalho que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Gostaria de agradecer especialmente aos professores Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo e ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr. A Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo pela orientação, pela confiança, pelas valiosas sugestões e discussões, pelas oportunidades a mim concedidas e por acreditar em minha capacidade. Obrigada por me acompanhar nesta importante etapa! Ao Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr., pela co-orientação, pela oportunidade de trabalhar em um importante grupo de pesquisa, de participar do projeto Convênio Vale (Brasil) - IQ/Araraquara-SP, pela infra-estrutura cedida, pelas oportunidades a mim concedidas, pela convivência diária. Aos Professores, muito obrigada, sobretudo pelo respeito e pelo exemplo de dignidade e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos!

A Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, pelo respeito, pelo espaço cedido para alguns experimentos, pela importante contribuição em discussões, sugestões, e pela participação no Exame Geral de Qualificação. Minha profunda gratidão.

A Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, pelo respeito, pelo espaço cedido em seu laboratório para realização dos experimentos de PCR em tempo real, pelas sugestões e discussões.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, por ter cedido gentilmente o clone de *E. coli* contendo a região codificadora da proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína, pelas sugestões e discussões no Exame Geral de Qualificação.

A Dra. Eliandre de Oliveira e a Maria Antonia Odena, da Plataforma de Proteômica-Parc Científic de Barcelona, da Universidade de Barcelona-Espanha, pelas análises por espectrometria de massas, pela disponibilidade e imensa ajuda.

Ao Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, pela colaboração nos experimentos de PCR em tempo real, pelas discussões e sugestões, pela paciência, disponibilidade e pela amizade.

A Dra. Elaine Cristina Teixeira, pela colaboração nos experimentos de clonagem e de purificação de proteína, pela amizade, pelas conversas, pelos ótimos momentos que passamos juntas.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini (Universidade Estadual Paulista-UNESP), ao Prof. Dr. Júlio Cezar Franco de Oliveira (Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP) e ao

Prof. Dr. Gilberto Moraes (Universidade Federal de São Carlos), pelos valiosos comentários e sugestões durante a Defesa da Tese de Doutorado.

A toda minha família, sempre presente em minha vida. Em especial ao meu irmão, Mário Henrique e as minhas sobrinhas Gabriela, Isabela, e Rafaela.

Aos meus irmãos, presentes de Deus, Angélica, Ivanilde, Denise, Andréia, Rogério, Mário, Eduardo, Alexandre e Lúcio, e ao pequeno Henrique, meu muito obrigado pela excelente convivência, momentos de alegrias, pelas risadas, companheirismo e pelos ricos momentos compartilhados.

Aos amigos Eduardo Hilário, Fernanda Zanolli Freitas, Margareth Batistote pelo carinho, amizade, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos ótimos momentos que passamos juntos.

As amigas Alexandra e Pricila, pela amizade, pela riquíssima troca de informações culturais, pelas risadas e confidências. Obrigada pelo carinho!

Aos amigos de laboratório, Claire, Daniel, Daniela, Fabiana, Gustavo, Juliana Artier, Juliana Pirola Garcia, Marcelo, Renata, Robson, Wanessa Wilmo, obrigada pela convivência, pelas risadas e companheirismo. Obrigada a todos pelo carinho!

A Dra. Denise Bevilaqua pela ajuda e discussões, pelas dicas e pelo respeito. Obrigada!

A Dra. Heloísa Andrea Acciari, pela ajuda, pelos ensinamentos valiosos, pelas discussões, pelas sábias palavras que me confortaram em vários momentos e pelo exemplo de pessoa. Obrigada!

Aos amigos, Waldenir, Fátima, Zilda, Fernando e Tarcísio, agradeço pela colaboração e amizade.

Agradeço aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação pela ajuda, pela paciência e pelos serviços prestados.

Agradeço a Vale (Brasil) pelo financiamento concedido ao Laboratório de Biohidrometalurgia, coordenado pelo Prof. Dr. Oswaldo Garcia Jr, no qual foi realizado este trabalho. Agradeço também pela bolsa de Doutorado e pelos recursos concedidos para participação no Curso Proteomics realizado em Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL) - EUA (período 30 junho - 13 julho de 2006).

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans (*A. ferrooxidans*) é uma bactéria quimioautotrófica capaz de oxidar íon ferroso ou sulfetos minerais para a obtenção de energia. Bornita e calcopirita são dois sulfetos de cobre que possuem a mesma composição elementar, mas diferem na susceptibilidade para a biolixiviação. Este trabalho teve por objetivo a análise proteômica diferencial de *A. ferrooxidans* em resposta à mudança do substrato íon ferroso para os sulfetos minerais calcopirita ou bornita. Comparativamente a outras doze linhagens de *A. ferrooxidans*, a linhagem LR apresentou uma das maiores velocidades de oxidação sobre ambos os minerais em experimentos de respirometria, sendo selecionada para ser utilizada na análise proteômica. Respostas de células de *A. ferrooxidans* LR à bornita ou calcopirita foram investigadas utilizando-se 2D-PAGE e espectrometria de massas. O perfil de proteínas totais de células livres expostas aos minerais por 24 ou 48 horas foi comparado com o perfil das células não expostas (controle). Para bornita, detectou-se indução na síntese das proteínas chaperonina (groEL), antioxidante da família AhpC/Tsa e aldeído desidrogenase, enquanto que proteína de domínio radical SAM, frutose-1-6-bifosfatase, proteína de choque térmico HslU, carboidrato quinase, ribulose bifosfato carboxilase e proteínas ribossomais S2 e L25 tiveram sua síntese reprimida. Alterações opostas na expressão protéica foram detectadas para duas formas da frutose-bifosfato aldolase, as quais apresentaram valores distintos de ponto isoelétrico, sugerindo o envolvimento de modificações pós-traducionais desta proteína em *A. ferrooxidans* em resposta à bornita. Todas as alterações detectadas para a bornita não foram observadas na presença de calcopirita, não sendo detectada pela abordagem utilizada qualquer alteração significativa em células expostas a este mineral. A análise proteômica evidenciou, portanto que calcopirita e bornita afetam de maneira distinta o metabolismo de *A. ferrooxidans* LR. Respostas diferenciais na síntese de proteínas de células aderidas à calcopirita, comparativamente às não aderidas, foram investigadas na fração periplasmática utilizando-se a análise proteômica. Células de *A. ferrooxidans* LR aderidas ao mineral apresentaram alteração significativa na síntese de quatro proteínas, sendo que duas delas, identificadas como superóxido dismutase, tiveram a síntese reprimida, enquanto outras duas, uma proteína que liga simples fita de DNA (SSB) e a PspA/IM30, tiveram a síntese induzida após exposição à calcopirita por 2 horas. Paralelamente, a expressão dos genes correspondentes a algumas das proteínas diferencialmente expressas na presença de bornita, como mencionado acima, foi investigada por PCR em tempo real em células livres expostas à calcopirita, detectando-se aumento da expressão dos genes que codificam para as proteínas ribossomais S2 e L25. Numa segunda parte do trabalho investigou-se o efeito de uma proteína putativa recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína (rPCys) sobre

a atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* LR na calcopirita, comprovando-se o aumento da velocidade de oxidação na presença da proteína, o que pode eventualmente ser atribuído ao seu conteúdo em cisteína e/ou em alguns outros aminoácidos.

Palavras-chave: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Bornita. Calcopirita. Análise proteômica/gênica. Células aderidas. Proteína-cisteína.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans (*A.ferrooxidans*) is a chemoautotrophic bacterium able to oxidize ferrous iron or mineral sulfides to obtain energy. Bornite and chalcopyrite are two copper sulfides having the same elemental composition but differ in relation to the susceptibility for bioleaching process. The aim of this work was to perform a differential proteomic analysis of the *A. ferrooxidans* response to the exchange of ferrous ion as an energetic substrate to the mineral sulfides chalcopyrite or bornite. Among twelve *A. ferrooxidans* strains, the LR strain presented one of the highest oxidative rates on both minerals by respirometric assays, and was chosen for the proteomic analysis studies. The bacterium responses to bornite or chalcopyrite were investigated by 2D-PAGE and mass spectrometry. The total protein profiles of cells exposed to bornite or chalcopyrite for 24 or 48 hours were compared to the one of control not exposed to minerals. For bornite, were detected an induction for the proteins chaperonin (groEL), AhpC/Tsa family antioxidant and aldehyde dehydrogenase, whereas the proteins radical SAM domain, fructose-1-6-bisphosphatase, carbohydrate kinase, HslU heat shock protein, ribulose biphosphate carboxylase and the ribosomal proteins S2 and L25 were repressed. For the protein fructose-bisphosphate aldolase two forms having distinct isoelectric points were observed suggesting pos-translational modification of this protein in the *A. ferrooxidans* response to bornite. No significant alteration of the protein expression was detected for cells exposed to chalcopyrite. Therefore, the proteomic analyses show that these minerals lead to distinct cellular responses in *A. ferrooxidans*. Distinct responses were detected by proteomic analysis of the periplasmic fraction for chalcopyrite-attached cells in relation to non-attached cells. The analysis by 2D showed four proteins that presented significant difference of the protein synthesis after exposure to chalcopyrite. The two periplasmic proteins that were repressed after exposure to chalcopyrite were identified as superoxide dismutase, whereas the single strand binding protein (SSB) and the PspA/IM30 protein were induced by the mineral. The expression of the genes coding for some proteins induced or repressed in the presence of bornite, as mentioned above, was investigated by real time PCR, utilizing *A. ferrooxidans* LR cells now exposed to chalcopyrite for 24 hours. It was detected induction in the expression of genes codifying for ribosomal proteins S2 and L25. In a second part of this work, the effect of a recombinant putative protein from *A. ferrooxidans* LR containing cysteine (rPCys) on the oxidative activity of the chalcopyrite by *A. ferrooxidans* LR was investigated by respirometric assay. The oxygen uptake by the bacteria in the presence of the recombinant protein was higher than in its absence, which can be attributed to its cysteine content and/or other amino acids.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Bornite. Chalcopyrite. Proteomic/genic analysis. Attached cells. Cysteine-rich protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Biolixiviação bacteriana de cobre de minérios de baixos teores.	26
Figura 2.	Mecanismos propostos para a ação do <i>A. ferrooxidans</i> sobre os sulfetos minerais.	32
Figura 3.	Esquema do respirômetro de <i>Warburg</i> .	46
Figura 4.	Seqüência de nucleotídeos (A) e de aminoácidos (B) da região codificadora da proteína putativa PCys (contendo 8% de cisteína) de <i>A. ferrooxidans</i> LR.	64
Figura 5.	Representação do vetor de expressão pET28a (<i>Novagen</i>) e de sua região de policlonagem.	65
Figura 6.	Consumo de oxigênio por doze linhagens de <i>A. ferrooxidans</i> na presença de calcopirita (A) ou bornita (B) durante ensaios respirométricos.	70
Figura 7.	Variação do potencial de óxido-redução durante crescimento de <i>A. ferrooxidans</i> LR na presença de calcopirita ou bornita [2,5% (m/v) de mineral em meio T&K sem íons Fe ²⁺].	71
Figura 8.	2D-PAGE de proteínas totais de <i>A. ferrooxidans</i> LR para padronização da metodologia de extração das proteínas.	72
Figura 9.	SDS-PAGE de proteínas totais (20 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempo.	74
Figura 10.	Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas totais de células de <i>A. ferrooxidans</i> após exposição aos minerais por 24 horas.	75
Figura 11.	Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas totais de células de <i>A. ferrooxidans</i> após exposição aos minerais por 48 horas.	76
Figura 12.	2D-PAGE de proteínas totais (250 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição aos sulfetos minerais por 24 horas.	78
Figura 13.	2D-PAGE de proteínas totais (250 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição aos sulfetos minerais por 48 horas.	79
Figura 14.	Quantificação relativa (% volume) de proteínas diferencialmente expressas por <i>A. ferrooxidans</i> LR em resposta à bornita após separação do extrato protéico total (250 µg) por 2D-PAGE.	80
Figura 15.	2D-PAGE em detalhe de proteínas diferencialmente expressas após exposição à bornita por 24 ou 48 horas.	83

Figura 16.	SDS-PAGE de proteínas totais de células <i>A. ferrooxidans</i> LR para padronização da metodologia de obtenção de células aderidas à calcopirita.	86
Figura 17.	SDS-PAGE de proteínas totais (20 µg) de células de <i>A. ferrooxidans</i> LR aderidas e não aderidas à calcopirita após exposição por 24 horas.	87
Figura 18.	SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 µg) de células de <i>A. ferrooxidans</i> LR aderidas e não aderidas à calcopirita após exposição por 24 horas.	88
Figura 19.	SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR para padronização da metodologia de extração de proteínas.	90
Figura 20.	SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempos.	91
Figura 21.	SDS-PAGE de proteínas de esferoplastos (3 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempos.	92
Figura 22.	Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas periplasmáticas de células de <i>A. ferrooxidans</i> após exposição à calcopirita por 2 horas.	93
Figura 23.	2D-PAGE de proteínas de periplasma (30 µg) de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita por 2 horas.	95
Figura 24.	Quantificação relativa (% volume) de proteínas diferencialmente expressas por células de <i>A. ferrooxidans</i> LR aderidas e não aderidas à calcopirita (2 horas de exposição) após separação do extrato periplasmático por 2D-PAGE.	96
Figura 25.	Análise da especificidade dos <i>primers</i> por PCR a partir do DNA genômico de <i>A. ferrooxidans</i> LR e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose.	99
Figura 26.	Análise da extração de RNA de células livres de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita por 24 horas.	100
Figura 27.	Quantificação da expressão de genes por PCR em tempo real de células livres de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita por 24 horas, em comparação ao controle (íons Fe ²⁺).	101
Figura 28.	SDS-PAGE da fração solúvel e do precipitado após indução e lise celular do clone recombinante de <i>E. coli</i> para detecção da rPCys.	103
Figura 29.	SDS-PAGE das frações eluídas durante a purificação da rPCys por cromatografia de afinidade.	104
Figura 30.	Efeito da rPCys e de alguns aminoácidos no consumo de oxigênio por	

	<i>A. ferrooxidans</i> LR na presença de calcopirita, durante ensaios respirométricos.	105
Figura 31.	Efeito dos aminoácidos alanina, cisteína, metionina, histidina ou serina (concentração 1×10^{-4} mol L ⁻¹) no consumo de oxigênio por <i>A. ferrooxidans</i> LR na presença de calcopirita, durante ensaios respirométricos.	106
Figura 32.	Efeito dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (concentração 1×10^{-4} mol L ⁻¹) no consumo de oxigênio por <i>A. ferrooxidans</i> LR na presença de calcopirita durante ensaios respirométricos.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens de <i>A. ferrooxidans</i> e suas origens.	43
Tabela 2.	Fases do procedimento experimental da adaptação de <i>A. ferrooxidans</i> ao crescimento nos sulfetos de cobre.	48
Tabela 3.	Seqüências de <i>primers</i> utilizados no experimento de PCR em tempo real para amplificação das regiões centrais do cDNA de interesse.	60
Tabela 4.	Proteínas diferencialmente expressas em <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à bornita ou calcopirita.	81
Tabela 5.	Localização celular predita de proteínas diferencialmente expressas em células de <i>A. ferrooxidans</i> LR expostas a bornita.	84
Tabela 6.	Proteínas periplasmáticas diferencialmente expressas em células de <i>A. ferrooxidans</i> LR aderidas à calcopirita por 2 horas.	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
2D	Duas dimensões
2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida contendo SDS
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxiribonucleosídeos 5`-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
dpi	<i>Dots per inch</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
LC	Cromatografia Líquida
MALDI	<i>Matrix-assited laser desorption/ionization</i>
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em sequência
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
Q	<i>Quadrupole</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TFA	Ácido trifluoracético
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
I. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	29
II. Oxidação biológica de sulfetos minerais	31
II.1. Sulfetos em geral	31
II.2. Sulfetos de cobre: calcopirita e bornita	31
III. Interação bactéria-substrato	33
IV. Resposta de <i>A. ferrooxidans</i> a diferentes substratos oxidáveis	35
IV.1. Expressão protéica diferencial	35
IV.2. Expressão gênica diferencial	36
V. Análise genômica de <i>A. ferrooxidans</i>	37
VI. Pós-genômica: a eletroforese bidimensional aplicada à análise proteômica	38
VII. Análise proteômica em <i>A. ferrooxidans</i>	40
OBJETIVOS	41
MATERIAIS E MÉTODOS	43
PORTE I. Expressão diferencial de proteínas e genes de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em resposta aos minerais calcopirita e bornita	43
I.1. Linhagens de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	43
I.2. Condições de cultivo e obtenção de células	43
I.3. Amostras minerais de calcopirita e bornita	44
I.4. Estudos fisiológicos de <i>A. ferrooxidans</i> na presença dos sulfetos minerais	45
I.4.1. Ensaio respirométricos de várias linhagens de <i>A. ferrooxidans</i>	45
I.4.2. Curva de crescimento da linhagem LR	47
I.5. Exposição aos sulfetos minerais e obtenção de células de <i>A. ferrooxidans</i> LR para análise da expressão diferencial	48
I.5.1. Células livres ou planctônicas	48
I.5.2. Células aderidas à calcopirita	49
I.5.2.1. Padronização de metodologia para retirada de células aderidas ao mineral	49
I.5.2.2. Determinação do tempo de exposição à calcopirita	50

I.5.2.3. Exposição à calcopirita para análise por 2D	50
I.6. Análise da expressão protéica diferencial em <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição aos minerais	51
I.6.1. Extração de proteínas	51
I.6.1.1. Proteínas totais	51
I.6.1.1.1. Lise celular por sonicação	51
I.6.1.1.2. Extração com fenol	51
I.6.1.2. Proteínas de periplasma e de esferoplastos	52
I.6.2. Quantificação das proteínas	53
I.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	53
I.6.4. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	54
I.6.5. Coloração do gel	54
I.6.6. Análise da imagem de 2D e comparação dos géis	55
I.6.7. Identificação das proteínas diferenciais por espectrometria de massas	56
I.6.7.1. Digestão trípica das proteínas	56
I.6.7.2. Análise MS/MS	56
I.6.7.3. Pesquisa em banco de dados	57
I.7. Análise da expressão gênica diferencial em células livres de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita	58
I.7.1. Extração de RNA	58
I.7.2. Síntese de cDNA	59
I.7.3. PCR em tempo real	59
 PORTE II. Proteína putativa de <i>A. ferrooxidans</i> LR contendo cisteína: expressão em <i>E. coli</i>, purificação e avaliação do efeito da proteína recombinante sobre a oxidação bacteriana da calcopirita	 62
II.1. Clonagem da região codificadora da proteína putativa de <i>A. ferrooxidans</i> LR em vetor de expressão	63
II.2. Expressão da proteína PCys em <i>E. coli</i>	63
II.3. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade e diálise	66
II.4. Avaliação do efeito da proteína rPCys e de aminoácidos livres sobre a atividade oxidativa de <i>A. ferrooxidans</i> LR em calcopirita	67
II.4.1. Ensaio respirométrico na presença da proteína rPCys	67
II.4.2. Ensaio respirométrico na presença de cisteína livre e outros aminoácidos	67

RESULTADOS	69
PARTE I. Expressão diferencial de proteínas e genes de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> em resposta aos minerais calcopirita e bornita	69
I.1. Atividade oxidativa de <i>A. ferrooxidans</i> na presença dos sulfetos minerais	69
I.2. Análise da expressão protéica diferencial em <i>A. ferrooxidans</i>	69
I.2.1. Padronização da extração de proteínas totais	69
I.2.2. Expressão protéica diferencial de células livres em resposta à calcopirita ou bornita	73
I.2.2.1. Experimentos preliminares de exposição bacteriana à calcopirita por 24, 72 ou 144 horas	73
I.2.2.2. Exposição bacteriana à bornita ou calcopirita por 24 ou 48 horas	73
I.2.3. Expressão protéica diferencial de células aderidas à calcopirita	85
I.3. Análise da expressão gênica diferencial em células livres de <i>A. ferrooxidans</i> LR após exposição à calcopirita	98
PARTE II. Efeito de uma proteína putativa recombinante de <i>A. ferrooxidans</i> LR contendo cisteína sobre a oxidação bacteriana da calcopirita	102
DISCUSSÃO	108
CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS	123
APÊNDICES	136
ANEXOS	168

INTRODUÇÃO

Desde que começaram a ser utilizados, os metais ocupam um papel fundamental na história da humanidade. Embora outros materiais estejam sendo cada vez mais utilizados, ainda não são capazes de substituir totalmente os metais. É por essa razão que esses materiais e suas ligas ainda ocupam um lugar de destaque no cenário mundial.

As principais fontes de cobre e de outros metais como chumbo, zinco e níquel ocorrem na natureza na forma de sulfetos. Os processos convencionais de extração destes metais somente são economicamente aplicáveis a ocorrências minerais de grande teor do metal de interesse, o que naturalmente tem se tornado cada vez mais raro. Geralmente os concentrados de cobre são tratados por processos pirometalúrgicos e, mais recentemente, processos hidrometalúrgicos.

O processo pirometalúrgico é mais utilizado para minérios sulfetados (altos teores do metal) e baseia-se na extração do metal de interesse pela oxidação do respectivo minério utilizando-se altas temperaturas, o que requer alto gasto energético.

O processo hidrometalúrgico é apropriado, principalmente, para a extração de metais de minérios oxidados de baixo teor. A hidrometalurgia consiste em lixiviar o minério moído ou o concentrado com solventes adequados, entre os quais, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico e ácido nítrico, sendo o mais utilizado o ácido sulfúrico, obtendo-se assim lixívias ricas para posterior recuperação do metal de interesse por vários processos convencionais.

Dentre os processos hidrometalúrgicos, uma alternativa promissora que vem ganhando especial atenção do setor mineiro-metalúrgico é o processo biotecnológico conhecido como “biolixiviação” ou “lixiviação bacteriana”. Biolixiviação é o processo de solubilização de determinados componentes existentes em uma amostra mineral por algumas espécies de bactérias, através da capacidade que estas apresentam em oxidar íon ferroso (Fe^{2+}) e sulfetos minerais. Os sulfetos minerais insolúveis são solubilizados a sulfatos metálicos por bactérias aeróbicas, acidófilas, principalmente do gênero *Acidithiobacillus* e em especial a espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (BRIERLEY, 1978; LUNDGREN; MALOUF, 1983). Esse processo é muito atrativo quando comparado com processos físico-químicos, devido ao baixo impacto ambiental, pois requer pouca energia e não produz dióxido de enxofre ou

outro gás tóxico (JENSEN; WEBB, 1995). Esse processo também possibilita a economia de insumos como ácidos e agentes oxidantes, os quais são produzidos pela própria bactéria a partir de substratos existentes no referido minério.

Atualmente, a lixiviação bacteriana em pilhas é aplicada em escala industrial para a recuperação de cobre, urânio e níquel e mais recentemente de ouro em vários países, destacando-se EUA, Canadá, Espanha, México, Bulgária, África do Sul e Austrália, entre outros, especialmente em países da América do Sul. O interesse no Brasil pela interação de microrganismos e minerais e, mais especificamente, pela lixiviação de metais por bactérias assim como sua tecnologia ainda não está plenamente consolidado, apesar da existência de uma planta de biooxidação de sulfetos (arsenopirita, por exemplo) para recuperação do ouro ocluso (Mineração São Bento-MG).

A produção de cobre mundial tem aumentado entre 1984-2005, de 9 megatoneladas (Mt) a 16 Mt por ano, chegando perto de 18 Mt em 2006 (WATLING, 2006). O cobre é um metal utilizado principalmente nos setores de construção civil e eletroeletrônico. Segundo revisão de Rawlings (2002), a recuperação de cobre de minérios de baixos teores é a maior aplicação da biolixiviação atualmente (Figura 1). O íon férrico (Fe^{3+}) gerado da oxidação do íon ferroso (Fe^{2+}) é um poderoso agente oxidante responsável pela dissolução do sulfeto mineral, permitindo a oxidação de Cu^+ para a forma mais solúvel Cu^{2+} . O metal na forma Cu^{2+} pode então ser recuperado por técnicas físico-químicas incluindo extração por solvente. Cerca de 10-15% de cobre mundial é recuperado por meio desse processo.

A calcopirita (CuFeS_2) é um dos sulfetos minerais de cobre mais abundantes na natureza, mas ao mesmo tempo um dos mais refratários ao ataque bacteriano. A solubilização deste sulfeto em processos de lixiviação bacteriana apresenta taxas mínimas de oxidação e a eficiência final é muito inferior ao mínimo desejado. Por outro lado, a bornita (Cu_5FeS_4) é um outro sulfeto de cobre com a mesma constituição elementar da calcopirita, porém mais solúvel, mesmo em condições relativamente suaves de lixiviação. O conhecimento minucioso do processo de adesão e oxidação da calcopirita e da bornita por *A. ferrooxidans* pode contribuir decisivamente para uma melhor compreensão da cinética bacteriana de dissolução destes sulfetos.

Com o propósito de aprofundar o conhecimento sobre a oxidação da calcopirita por *A. ferrooxidans*, iniciou-se no ano de 2004 um projeto bastante amplo,

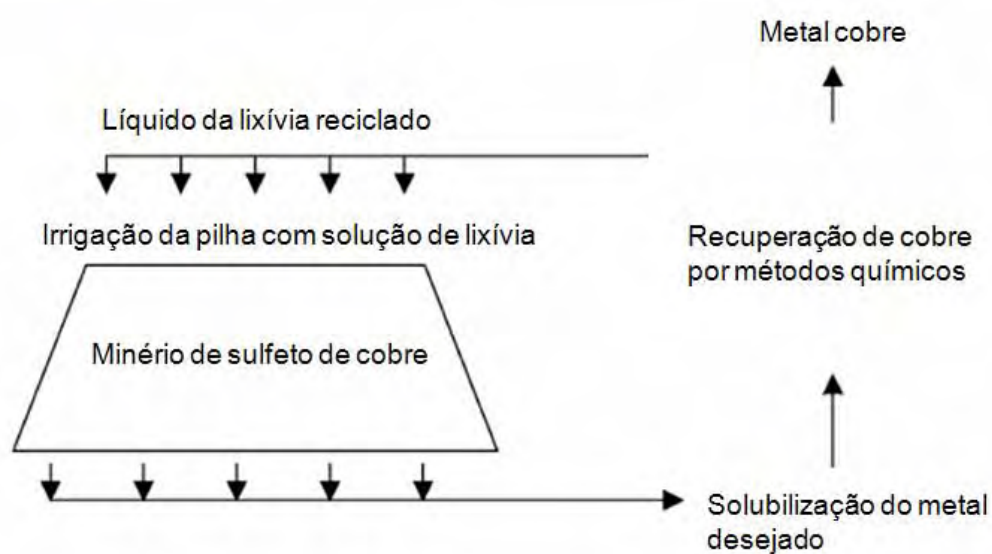


Figura 1. Biolixiviação bacteriana de cobre de minérios de baixos teores. O minério é aglomerado em pilhas e irrigado com uma solução de ácido sulfúrico (pH~2). Essa solução, coletada após a percolação pelo minério, é reciclada constantemente pela pilha, ocasionando uma intensificação da atividade bacteriana no substrato mineral. Dessa ação resulta uma elevação da acidez e do poder oxidante da solução, pela produção biológica de ácido sulfúrico e do íon Fe^{3+} , com a conseqüente solubilização do metal desejado. O metal é extraído da solução por tratamentos químicos (RAWLINGS, 2002).

com vigência até final de 2010, financiado pela Vale (anteriormente Companhia Vale do Rio Doce - Brasil), o qual visa estudar a interação, os mecanismos eletroquímicos, as proteínas e os genes envolvidos na oxidação da calcopirita e bornita por *A. ferrooxidans*. Deste projeto participam hoje pesquisadores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

O trabalho aqui apresentado está inserido neste projeto e teve como objetivo central a análise proteômica diferencial envolvida na resposta de *A. ferrooxidans* à mudança de substrato solúvel (Fe^{2+}) para o substrato mineral pouco solúvel como calcopirita e bornita. Este trabalho visa tanto compreender melhor os mecanismos bioquímicos envolvidos, como também identificar possíveis proteínas-chaves que possam eventualmente ser utilizadas do ponto de vista biotecnológico para fins de melhoramento do processo de biolixiviação. Paralelamente, a expressão diferencial também foi investigada para alguns genes por PCR em tempo real. Além disso, foi realizada uma investigação inicial do efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans*, contendo cisteína (e definida como sendo hipotética na anotação do genoma), sobre a oxidação bacteriana da calcopirita.

A análise das proteínas diferencialmente expressas pela bactéria em um estudo comparativo entre a bornita e a calcopirita em função de seus diferentes comportamentos, pode significar um passo inicial e pioneiro na otimização do processo, em seu parâmetro central: o *A. ferrooxidans*. O próprio microrganismo pode consistir numa fonte altamente interessante para detecção de proteínas que possam atuar como auxiliares do processo de biolixiviação, principalmente no que se refere à calcopirita, uma vez que a bactéria atua neste mineral, embora não de uma forma eficiente ou desejável para um processo industrial.

Do ponto de vista do melhoramento do processo de biolixiviação da calcopirita, tais proteínas auxiliares poderiam eventualmente ser adicionadas ao mineral, após serem produzidas na forma recombinante em *Escherichia coli*, desde que tal procedimento em larga escala se apresentasse como economicamente viável. Ou ainda, os genes correspondentes a tais proteínas poderiam ser superexpressos por uma linhagem de *A. ferrooxidans* melhorada geneticamente. Neste último caso, tais proteínas poderiam ser excretadas para o meio extracelular

pela própria bactéria, durante o processo de lixiviação, ou mesmo poderiam ser endereçadas em grande quantidade para a sua membrana celular, onde poderiam atuar na oxidação ou na adesão mineral. Nesse sentido, a construção de um vetor de expressão para endereçamento da proteína de interesse para a membrana de *A. ferrooxidans* também seria uma abordagem altamente interessante.

Obviamente tais objetivos obrigatoriamente exigem o desenvolvimento de um sistema genético eficaz para a transformação de *A. ferrooxidans*, o que ainda não foi satisfatoriamente relatado na literatura. Um dos grupos envolvidos neste projeto financiado pela Vale, o grupo do CBMEG/UNICAMP, tem como um de seus objetivos realizar tentativas para o desenvolvimento de um sistema genético de transformação do *A. ferrooxidans*, o que futuramente poderia ampliar as perspectivas de aplicação biotecnológica de proteínas detectadas pela análise proteômica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

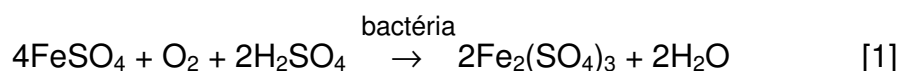
I. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Filogeneticamente, o gênero *Acidithiobacillus* está situado entre as subdivisões β e γ de *Proteobacteria* (LANE et al., 1992; RAWLINGS, 2001). Espécies do gênero *Acidithiobacillus* são obrigatoriamente acidofílicas (pH ótimo de crescimento menor que 4,0), Gram-negativas e utilizam CO_2 atmosférico como principal fonte de carbono.

A espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, anteriormente denominada *Thiobacillus ferrooxidans* (KELLY; WOOD, 2000), é uma bactéria aeróbia considerada um dos principais microrganismos envolvidos na biolixiviação de metais a partir de minérios. É uma espécie não patogênica, com dimensões médias de 0,5 a 0,6 μm de diâmetro por 1,0 a 2,0 μm de comprimento, ocorrendo isolada ou em pares, raramente em cadeias pequenas. São móveis e apresentam flagelo (HOLT, 1994), além de *pilli* (DISPIRITO et al., 1982), sendo sua reprodução por divisão binária simples (PIVOVAROVA; GOLOVACHEVA, 1985). Essa bactéria é considerada um microrganismo mesófilo, sendo 30°C a temperatura ótima de crescimento, entretanto foram isoladas linhagens psicrófilas com crescimento em 2°C (BERTHELOT; LEDUC; FERRONI, 1993; LEDUC; TREVORS; FERRONI, 1993). É um microrganismo acidófilo estrito e o pH ótimo de crescimento situa-se em torno de 2,0, ocorrendo, porém, crescimento numa faixa de 1,5 a 4,5; abaixo de pH 1,0, não é capaz de sobreviver (SMITH; LUTHY; MIDDLETON, 1988).

A espécie é considerada obrigatoriamente autotrófica e necessita, além de uma fonte energética de natureza inorgânica, de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (TUOVINEN; PANDA; TSUSHUJA, 1979; RAWLINGS, 1981). Apresenta metabolismo quimiolitotrófico, obtendo energia necessária para seu crescimento da oxidação de íons Fe^{2+} , enxofre e compostos reduzidos de enxofre (S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} , $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) incluindo os sulfetos minerais como, por exemplo, a pirita (FeS_2) (BOSECKER, 1997).

As equações gerais abaixo ilustram algumas das reações de oxidação citadas.



onde MeS é o sulfeto mineral.

A. ferrooxidans pode ainda crescer anaerobicamente na presença de hidrogênio como doador de elétrons e íons Fe^{3+} comoceptor de elétrons (BROCK; GUSTAFSON, 1976; PRONK et al., 1991a; OHMURA et al., 2002). É também capaz de crescer em ácido fórmico quando o mesmo é adicionado em pequenas quantidades (PRONK et al., 1991b). A fixação de N_2 por essa bactéria já foi demonstrada (MackINTOSH, 1978).

No meio ambiente esse microrganismo é encontrado em drenagem ácida de minas e em outros locais de elevada acidez, onde minerais como a pirita, o mais abundante de todos os sulfetos minerais, são utilizados como fonte de energia (JOHNSON; HALLBERG, 2003).

Uma característica fisiológica marcante de *A. ferrooxidans* é a sua generalizada tolerância a altas concentrações de íons metálicos, inclusive metais pesados (DUXBURY; BICKNELL, 1983; DAS; MODAK; NATARAJAN, 1997; DE; OLIVER; PESIC, 1997; RAWLINGS, 2005), o que provavelmente é condicionada por um sistema genético altamente especializado e pode ser atribuída à presença constante de metais no próprio *habitat* da bactéria. Segundo Magnin et al. (1998), os níveis de tolerância a metais da linhagem DSM583 de *A. ferrooxidans* crescida em Fe^{2+} foram os seguintes: Cu^{2+} 0,6 mol L^{-1} ; Cd^{2+} 0,75 mol L^{-1} ; Zn^{2+} 1 mol L^{-1} e Ni^{2+} 1 mol L^{-1} . Linhagens de *A. ferrooxidans* que não são afetadas por concentrações de cobre até 800 mmol L^{-1} têm sido descritas (DEW; MUHLBAUER; VAN BUUREN, 1999), enquanto bactérias heterotróficas toleram cerca de 1 mmol L^{-1} do metal (TETAZ; LUKE, 1983).

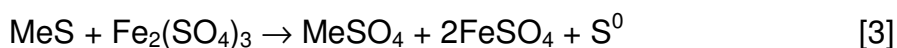
A resposta de *A. ferrooxidans* a diversas situações, inclusive à presença de metais pesados, tem sido estudada pela análise da expressão protéica, por meio da técnica eletroforese bidimensional (2D-PAGE). Proteínas induzidas em resposta ao choque térmico (VARELA; JEREZ, 1992), estresse de pH (AMARO et al., 1991), limitação de fosfato (SEEGER; JEREZ, 1993; HE et al., 2005b) ou presença de cobre (FELÍCIO et al., 2003; NOVO; GARCIA JUNIOR; OTTOBONI, 2003) têm sido descritas na literatura.

II. Oxidação biológica de sulfetos minerais

II.1. Sulfetos em geral

Tem sido relatada a capacidade do *A. ferrooxidans* em oxidar arsenopirita (FeAsS), bornita (Cu₅FeS₄), calcopirita (CuFeS₂), covelita (CuS), galena (PbS), pirita (FeS₂), esfalerita (ZnS), dentre outros sulfetos minerais, inclusive sulfetos minerais sintéticos como CdS, CoS, CuS, NiS, SnS e MnS (SILVER; TORMA, 1974; LIZAMA; SUZUKI, 1991; TUOVINEN et al., 1994; GARCIA JUNIOR; BIGHAM; TUOVINEN, 1995a,b; BOSECKER, 1997; BEVILAQUA et al., 2002; EHRLICH, 2002). No entanto, a interação direta da bactéria com os sulfetos minerais ainda é um dos temas mais controvertidos na literatura (BOON, 2001; SAND et al., 2001; TRIBUTSCH, 2001).

De acordo com Boon (2001), os metais podem ser liberados dos sulfetos minerais por mecanismo direto e indireto de lixiviação bacteriana. No mecanismo direto, a bactéria obtém energia pela solubilização direta do mineral por reações enzimáticas de oxidação (reação [2]). No mecanismo indireto, o ataque mineral não ocorre por reações enzimáticas e sim pela ação dos íons Fe³⁺ (poderoso agente oxidante de sulfetos minerais, reação [3]), o qual é reciclado pela bactéria para obtenção de energia (reação [1]).



Esta classificação dos mecanismos foi refinada incluindo-se mais uma categoria: mecanismo indireto, mecanismo de contato indireto e mecanismo de contato direto (CRUNDWELL, 2003). A Figura 2 ilustra os três mecanismos.

II.2. Sulfetos de cobre: calcopirita e bornita

Calcopirita (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄), objetos de estudo deste trabalho, são dois importantes sulfetos de cobre. A calcopirita é o sulfeto de cobre mais abundante na natureza e por sua vez o mais refratário ao ataque químico e bacteriano, apresentando taxas mínimas de oxidação (BRIERLEY, 1978; THIRD; CORD-RUWISCH; WATLING, 2000).

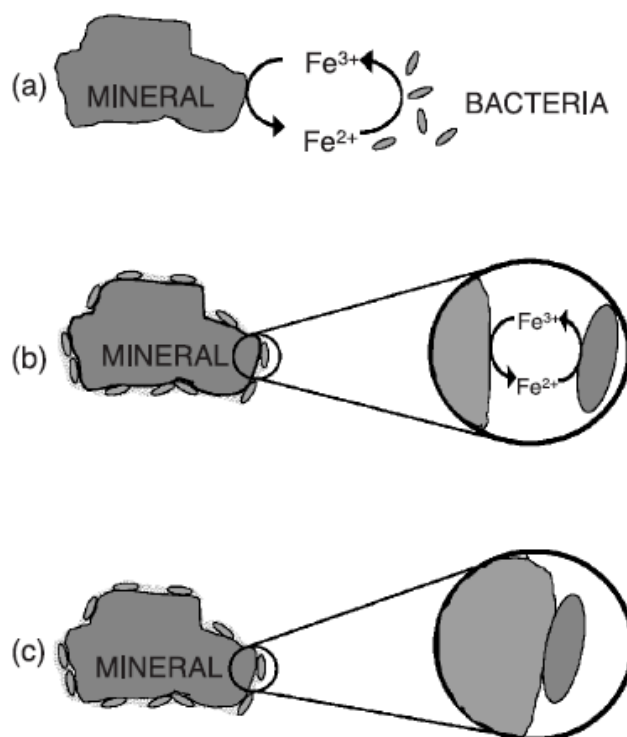


Figura 2. Mecanismos propostos para a ação do *A. ferrooxidans* sobre os sulfetos minerais. (a) mecanismo indireto, no qual a bactéria oxida os íons Fe^{2+} a íons Fe^{3+} em solução, e este por sua vez, lixivia o metal; (b) mecanismo do contato indireto, no qual a bactéria aderida ao mineral oxida os íons Fe^{2+} dentro do biofilme (formado pela própria bactéria e o material exopolimérico que ela produz), e os íons Fe^{3+} lixivia o metal dentro desta camada exopolimérica; (c) o mecanismo contato direto, no qual a bactéria oxida o mineral, sem requerer íons Fe^{3+} ou Fe^{2+} (CRUNDWELL, 2003).

A fórmula química da calcopirita é CuFeS_2 , sendo as ligações essencialmente covalentes, com átomos oscilando entre dois estados iônicos: $\text{Cu}^+\text{Fe}^{3+}\text{S}_2^{2-}$ e $\text{Cu}^{2+}\text{Fe}^{2+}\text{S}_2^{2-}$ (HABASHI, 1978). A refratariedade da calcopirita pode ser atribuída à ocorrência de uma camada passiva de enxofre elementar na superfície do mineral, precipitado de íons Fe^{3+} ou intermediários de polissulfetos de cobre que dificultam a biolixiviação do mineral (LUNDGREN; SILVER, 1980; THIRD; CORD-RUWISCH; WATLING, 2000). Esta camada passiva e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada não foi totalmente esclarecida (THIRD; CORD-RUWISCH; WATLING, 2000).

A bornita é outro sulfeto de cobre com a mesma constituição elementar da calcopirita, porém mais susceptível a ação química e bacteriana. A bornita tem fórmula geral Cu_5FeS_4 , sendo os estados de oxidação dos cátions $\text{Cu}_5^+\text{Fe}^{3+}\text{S}_4$ (VAUGHAN; CRAIG, 1978).

Provavelmente a diferença de susceptibilidade a ação bacteriana entre os sulfetos (calcopirita e bornita) está associada às suas diferentes estruturas cristalinas (VAUGHAN; BECKER; WRIGHT, 1997).

III. Interação bactéria-substrato

Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a identificação de agentes bioquímicos envolvidos na lixiviação de metais por *A. ferrooxidans*. Embora parâmetros físicos como tamanho de partículas, tempo de incubação e agitação sejam importantes no processo de adesão (MURTHY; NATARAJAN, 1992), tem sido sugerido que o mecanismo real está baseado em interações tanto específicas como não específicas. Interações específicas podem ser definidas como interações microscópicas (interações iônicas, químicas ou ligações protéicas), enquanto interações não específicas envolvem propriedades macroscópicas (hidrofobicidade, energia livre de superfície e interações eletrostáticas) (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987).

O substrato de crescimento do *A. ferrooxidans* (antes do seu contato com o sulfeto mineral) é essencial para estabelecer as forças que irão predominar na interação bactéria/superfície (CURUTCHET; DONATI, 2000; SAMPSON; PHILLIPS; BLAKE II, 2000). Estes autores mostraram que células de *A. ferrooxidans* crescidas em meio contendo enxofre, como fonte energética, apresentam mais hidrofobicidade

do que aquelas que foram crescidas em meio contendo íons Fe^{2+} . Entretanto esta condição não pode ser associada com maior ou menor adesão das células.

Outros estudos sugerem que substâncias exopoliméricas (EPS) presentes na superfície celular (GEHRKE; HALLMANN; SAND, 1995; SAND et al., 1995; POGLIANI; DONATI, 1999) e proteínas (OHMURA et al., 1996; SOMASUNDARAN; REN; RAO, 1998; SHARMA et al., 2001) desempenham um papel muito importante nos estágios iniciais de adesão. O EPS de *A. ferrooxidans*, que é secretado pela bactéria quando em contato com o mineral (RODRIGUEZ-LEIVA; TRIBUTSCH, 1988), consiste de 42% de lipopolissacarídeos, 54% de moléculas de Fe^{3+} hexahidratado, 0,5% de ácido glucurônico e 3,5% de diferentes constituintes (GEHRKE et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 2003). A adesão bacteriana aos sulfetos minerais resulta da modificação das propriedades da superfície celular, que dependem das condições de crescimento (DEVASIA et al., 1993; BLAKE II; SHUTE; HOWARD, 1994).

Rojas-Chapana e Tributsch (2000) relataram que a atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* na pirita (FeS_2) aumentou quando foi adicionada uma pequena quantidade de aminoácido cisteína em solução ácida em contato com o mineral. A taxa de lixiviação do sulfeto aumentou três vezes quando comparada ao processo normal sem adição do aminoácido. Os resíduos de cisteína dos polipeptídeos da parede celular da bactéria podem reagir espontaneamente com o ferro do sulfeto e ativar o processo de corrosão similar com o observado com cisteína exógena (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000). Os autores identificaram que a cisteína (que contém grupo tiol) é utilizada por *A. ferrooxidans* para romper a interface do sulfeto de ferro formando pontes de enxofre (S-S ou -S-) com a pirita. A interação e complexação da cisteína com pirita enfraqueceram e quebraram ligações químicas no mineral, promovendo a oxidação do mesmo (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000). Segundo os autores, a corrosão da pirita em solução contendo cisteína pode refletir um mecanismo envolvido pelo thiobacilli com o objetivo de obter energia de fontes de sulfeto insolúveis.

Blake II, Sasaki e Ohmura (2001) investigaram a adesão do *A. ferrooxidans* e da aporusticianina na pirita, com base no modelo onde a proteína localizada na superfície da célula bacteriana age como um receptor mineral específico para a adesão inicial da bactéria à pirita. Eles sugeriram que a aporusticianina se ligaria por coordenação aos íons ferro da superfície do cristal de pirita, o que poderia alterar e enfraquecer ligações de valência do ferro. Esse enfraquecimento seria suficiente

para retirar íons Fe^{3+} do cristal, os quais seriam difundidos no meio líquido como ferro solubilizado. A aporusticianina poderia então se ligar a outro átomo de ferro do cristal e iniciar outro ciclo catalítico de solubilização do ferro. Outra hipótese sugerida foi que a aporusticianina funcionaria para promover um caminho de transferência de elétrons da pirita para a cadeia respiratória da bactéria. A proteína poderia utilizar o mesmo mecanismo intramolecular para conduzir elétrons da pirita sólida para os componentes da cadeia respiratória da bactéria.

IV. Resposta de *A. ferrooxidans* a diferentes substratos oxidáveis

IV.1. Expressão protéica diferencial

Uma série de proteínas cuja síntese foi alterada durante o crescimento de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 em sulfetos minerais, tiosulfato, enxofre elementar ou íons Fe^{2+} foram caracterizadas utilizando a técnica de 2D-PAGE (RAMÍREZ et al., 2004). Mesmo considerando a passagem de elétrons dos íons Fe^{2+} até o oxigênio um mecanismo não conhecido totalmente, os autores se basearam nas proteínas conhecidas da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans* para estudar outras proteínas envolvidas na oxidação do enxofre e sulfetos minerais (por exemplo, pirita e calcopirita).

Nesse estudo, Ramírez et al. (2004) dividiram essas proteínas em dois grupos. O primeiro grupo consistiu de proteínas cuja síntese foi altamente induzida durante o crescimento na presença de compostos de enxofre (e reprimida na presença de íons Fe^{2+}): proteína de membrana externa de 44 kDa, tiosulfato enxofre transferase de 21 kDa, proteína de 33 kDa que liga tiosulfato/sulfato, proteína que exporta polissacarídeos de 45 kDa e uma proteína de função desconhecida de 16 kDa. A expressão diferencial da tiosulfato enxofre transferase tinha sido previamente observada nas mesmas condições, sendo sua síntese regulada dependendo do substrato oxidável (RAMÍREZ et al., 2002).

O segundo grupo consistiu de proteínas que tiveram sua síntese reprimida pelo crescimento em enxofre (e induzida na presença dos íons Fe^{2+}): rusticianina, citocromo *c₅₅₂*, proteína que liga fosfato (PstS), a pequena e a grande subunidade da ribulose bifosfato carboxilase, e uma proteína CbbQ de 30 kDa.

Com base nesses resultados, Ramírez et al. (2004) sugeriram uma separação dos mecanismos de oxidação do Fe^{2+} e do enxofre. Rusticianina, cuja síntese foi induzida na presença de íons Fe^{2+} , foi também sintetizada, embora em níveis baixos, durante o crescimento na presença de compostos de enxofre e sulfetos minerais. Além disso, os autores concluíram que durante o crescimento em sulfetos minerais contendo ferro, como pirita e calcopirita, ambos os grupos de proteínas reguladas por íons Fe^{2+} e por compostos de enxofre foram sintetizados, indicando que os dois caminhos de geração de energia são influenciados simultaneamente pelo tipo e concentração do substrato oxidável utilizado (RAMÍREZ et al., 2004).

Análise da expressão protéica de *A. ferrooxidans* em resposta a substratos oxidáveis também tem sido realizada pela abordagem proteômica (item VII).

IV.2. Expressão gênica diferencial

A regulação da expressão gênica é um importante processo para adaptação a mudanças em condições ambientais e para sobrevivência dos microrganismos (SINGH; NAGARAJ, 2006).

Acosta et al. (2005) verificaram que os genes *p11* (que codifica para uma proteína tipo rodanese) e *sirA* (que codifica para uma proteína predita redox, reguladora da formação de pontes de dissulfeto), presentes no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, são expressos em altos níveis quando células bacterianas são crescidas em enxofre, comparando-se ao crescimento em íons Fe^{2+} . Os resultados sugeriram o envolvimento desses genes na oxidação e no metabolismo de enxofre, na formação de *clusters* Fe-S ou no mecanismo de detoxificação (ACOSTA et al., 2005).

Um *cluster* de cinco genes denominado *operon gal* e supostamente envolvido na formação de substâncias exopoliméricas (EPS), foi identificado em *A. ferrooxidans* (BARRETO; JEDLICKI; HOLMES, 2005). De acordo com os autores, a ordem dos genes é *luxA-galE-galK-pgm-galM*, codificando para as proteínas LuxA, EDP-glicose 4-epimerase, galactoquinase, fosfoglicomutase, e mutarotase galactose, respectivamente. Experimentos de transcrição reversa semiquantitativa acoplada à reação de PCR mostraram que os cinco genes foram mais expressos durante o crescimento em meio contendo íons Fe^{2+} do que em meio contendo enxofre. Os dados obtidos sugeriram que *A. ferrooxidans* é capaz de sintetizar

precursores do EPS UDP-glicose e UDP-galactose (BARRETO; JEDLICKI; HOLMES, 2005).

A técnica de PCR em tempo real (VITZTHUM et al., 1999; FEY et al., 2004; SCHIPPERS; NERETIN, 2006; KOCK; SCHIPPERS, 2006; DREIER; STÖRMER; KLEESIEK, 2007) tem sido uma das técnicas aplicadas ao estudo da expressão gênica em *A. ferrooxidans*.

Yarzabal et al. (2004) observaram por PCR em tempo real que o *operon rus* que codifica para proteínas da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans* ATCC 33020 foi altamente expresso em células crescidas em Fe^{2+} quando comparado com o crescimento em enxofre. Quatrini et al. (2006) analisaram por essa mesma técnica os genes da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 que transcrevem preferencialmente na presença de íons Fe^{2+} ou enxofre. Os resultados obtidos por Yarzabal et al. (2004) estão de acordo com o modelo da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans* na presença de Fe^{2+} ou de enxofre elementar proposto por Quatrini et al. (2006).

V. Análise genômica de *A. ferrooxidans*

O genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 foi completamente seqüenciado, contendo mais de 2700 *ORFs* (*Open Reading Frames*) identificadas em três milhões de pares de bases (pb) do genoma total (SELKOV et al., 2000). A seqüência completa do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 obtida pela *TIGR* (*The Institute for Genomic Research*) está disponível ao acesso público em *The Comprehensive Microbial Resource* (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>). Baseados na seqüência completa do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 têm sido preditos modelos preliminares de vias metabólicas e de sua regulação na bactéria (BARRETO et al., 2003; VALDÉS et al., 2007).

Um dos focos de estudo em *A. ferrooxidans*, principalmente após o seqüenciamento do seu genoma, tem sido o metabolismo energético, o qual é diretamente responsável pela biolixiviação. Genes de *A. ferrooxidans* envolvidos no metabolismo de enxofre ou de ferro têm sido identificados (YARZÁBAL; BRASSEUR; BONNEFOY, 2002).

Barreto et al. (2003) encontraram no genoma de *A. ferrooxidans* genes candidatos envolvidos na biossíntese de aminoácidos, resistência a metais pesados,

utilização de H₂, conjugação e fluxo de cátions. Genes *ppk* e *ppx* que codificam para proteínas envolvidas na resposta a limitação de fosfato foram identificados no genoma de *A. ferrooxidans* (VERA; GUILIANI; JEREZ, 2003). Oito seqüências nucleotídica codificam um domínio de rodanese, uma tiosulfato enxofre transferase (TST) que reduz pontes de dissulfeto presentes em tiosulfato e gera enxofre e sulfito, foram encontradas no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: *p11*, *p14*, *p14.3*, *p15*, *p16*, *p16.2*, *p21* e *p28* (ACOSTA et al., 2005). Um *cluster* de cinco genes possivelmente envolvido na formação de substâncias exopoliméricas (EPS) foi identificado em *A. ferrooxidans* (BARRETO; JEDLICKI; HOLMES, 2005).

VI. Pós-genômica: a eletroforese bidimensional aplicada à análise proteômica

A revolução propiciada pela genômica tem levado à utilização de técnicas de análise em larga escala de transcritos de todos os genes (transcriptoma) ou análise de todas as proteínas (proteoma) de uma célula. As inter-relações entre essas análises, bem como a investigação da interação entre proteínas (interatoma), têm criado oportunidades de estudo da expressão fisiológica de um determinado microrganismo (SINGH; NAGARAJ, 2006). O estudo da expressão de RNA e de proteínas tem sido fundamental para o entendimento dos mecanismos moleculares presentes em microrganismos (SINGH; NAGARAJ, 2006). De fato, diferenças entre estados celulares são refletidos em mudanças na expressão de genes que se manifestam em nível de transcrição (RNA mensageiro, RNAm) e do produto final (proteínas) (COX; MANN, 2007).

O termo proteoma ou proteômica funcional refere-se ao estudo das proteínas de um microrganismo expressas em um momento específico. Um importante aspecto da proteômica envolve a caracterização de proteínas diferencialmente expressas de células expostas a diferentes condições ambientais. A análise proteômica comparativa de células baseia-se principalmente na separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em combinação com a identificação por espectrometria de massas (MS) (GYGI et al., 2000; SIMPSON, 2002). A alta reprodutibilidade do 2D-PAGE é particularmente válida para comparação de várias amostras.

Apesar do surgimento de tecnologias alternativas à eletroforese bidimensional para a análise proteômica, essa metodologia é a única disponível para resolução de

milhares de proteínas simultaneamente, sendo atualmente muito empregada em associação à espectrometria de massas (GORG; WEISS; DUNN, 2004). Essa abordagem possibilita a identificação das proteínas isoladas a partir do gel 2D, por meio do seqüenciamento dos seus peptídeos trípticos e comparação das seqüências obtidas com as de proteínas presentes em banco de dados do organismo em estudo, anotadas a partir da sua seqüência genômica.

A técnica de cromatografia líquida (LC) também é uma alternativa para a análise proteômica, a qual pode ser acoplada à espectrometria de massas (MS). Embora a tecnologia LC-MS tenha mais sensibilidade e permita a identificação de maior número de proteínas, é a técnica de 2D-PAGE que permite uma quantificação das variações da expressão protéica.

Ao longo dos anos, avanços importantes vêm sendo introduzidos na eletroforese bidimensional, a qual tem mantido sua importância como instrumento para a análise proteômica (GORG; WEISS; DUNN, 2004; VAN DEN BERGH; ARCKENS, 2005), frente a outras técnicas emergentes. O aumento de resolução tem sido possível pela utilização de faixas sobrepostas mais estreitas de gradiente de pH durante a isoeletrofocalização, enquanto um aumento do nível de detecção de proteínas menos abundantes tem sido proposto pelo pré-fracionamento subcelular da amostra (GORG; WEISS; DUNN, 2004). Além disso, atualmente é possível uma quantificação bastante precisa das proteínas que compõem o perfil no gel 2D pela técnica 2D-DIGE (*Fluorescence Difference 2-D Gel Electrophoresis*) (UNLÜ; MORGAN; MINDEN, 1997), a qual apresenta maior sensibilidade em comparação com o método 2D-PAGE convencional e também apresenta total compatibilidade com a análise das proteínas por espectrometria de massas (MAROUGA; DAVID; HAWKINS, 2005).

O avanço da técnica de espectrometria de massas acoplada à pesquisa em banco de dados tornou-se uma importante ferramenta para identificação de proteínas. A combinação da técnica de dessorção/ionização por laser de moléculas contidas em uma matriz sólida (MALDI) com a medida do tempo de voo (TOF) em alto vácuo dos íons gerados tem sido utilizada como método preferido nos estudos de análise proteômica (AEBERSOLD; MANN, 2003; AITKEN; LEARMONTH, 2002; LANDRY; LOMBARDO; SMITH, 2000). A caracterização das proteínas permite o monitoramento da taxa de síntese, nível de expressão e modificações pós-traducionais (proteólises, fosforilação, glicosilação, etc.) que podem contribuir para a

diversidade do proteoma de uma célula (SIMPSON, 2002; AGNETTI et al., 2007).

VII. Análise proteômica em *A. ferrooxidans*

A análise proteômica de linhagens de *A. ferrooxidans* foi realizada após o crescimento em Fe^{2+} ou enxofre (HE et al., 2005a; BOUCHAL et al., 2006). Essas análises comparativas revelaram que o proteoma foi significativamente influenciado pelo tipo de substrato, o que permitiu a detecção de proteínas de importância fisiológica, como por exemplo, proteínas transportadoras de elétrons na cadeia respiratória e proteínas de membrana externa envolvidas na adesão bacteriana (BOUCHAL et al., 2006), além de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos (HE et al., 2005a).

A análise proteômica da fração periplasmática de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 após crescimento da bactéria em tiosulfato foi realizada utilizando-se 2D-PAGE (CHI et al., 2007). Os autores identificaram 131 proteínas presentes no periplasma do microrganismo. Quando possível, as proteínas foram divididas em categorias funcionais, sendo elas: transporte e ligação de proteínas, proteínas do envelope celular, metabolismo energético, proteínas relacionadas ao direcionamento ou enovelamento. A identificação dessas proteínas periplasmáticas foi importante para o entendimento da fisiologia do microrganismo acidofílico, bem como para a anotação funcional do genoma de *A. ferrooxidans*.

Diferentemente dos trabalhos relatados, em que a análise proteômica é realizada após crescimento das células de *A. ferrooxidans* na presença de sulfetos minerais, o trabalho aqui apresentado buscou identificar proteínas diferencialmente expressas previamente ao crescimento celular, apenas pela exposição à calcopirita ou bornita. Resultados preliminares aos aqui apresentados foram relatados por Felício et al. (2007) (Apêndice A, p. 136).

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo identificar proteínas diferencialmente expressas em *A. ferrooxidans* em resposta precoce aos minerais calcopirita e bornita (Parte I). Um segundo objetivo foi avaliar o efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR na atividade bacteriana de oxidação da calcopirita (Parte II).

Os objetivos específicos foram:

1. Comparar a atuação de doze linhagens de *A. ferrooxidans* sobre a calcopirita ou bornita por ensaios de respirometria celular para seleção da linhagem com maior atividade oxidativa;
2. Avaliar a atuação da linhagem selecionada (LR) sobre os minerais por meio de curva de crescimento;
3. Detectar por 2D-PAGE proteínas diferencialmente expressas em células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição aos minerais, além de quantificar, validar estatisticamente a expressão diferencial e identificar as proteínas por espectrometria de massas e pesquisa em banco de dados;
4. Comparar o perfil de proteínas de periplasma por meio de SDS-PAGE de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita após exposição ao mineral durante diferentes intervalos de tempo, comparativamente às células não expostas ao mineral e às células livres (não aderidas);
6. Detectar por 2D-PAGE proteínas periplasmáticas diferencialmente expressas em células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita, além de quantificar, validar estatisticamente a expressão diferencial e identificar as proteínas por espectrometria de massas e pesquisa em banco de dados;

7. Analisar por experimentos de PCR em tempo real a expressão dos genes correspondentes a algumas das proteínas diferencialmente expressas em bornita, sendo a expressão investigada em células livres após exposição à calcopirita;
8. Expressar em *E. coli* uma proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína e purificar a proteína recombinante;
9. Avaliar por experimentos de respirometria celular o efeito da proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR na oxidação bacteriana da calcopirita, além do efeito da cisteína, dentre outros aminoácidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

PARTE I. Expressão diferencial de proteínas e genes em *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos minerais calcopirita e bornita

I.1. Linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

As linhagens de *A. ferrooxidans* utilizadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de *A. ferrooxidans* e suas origens.

Linhagem	Origem
AMF	Mina de carvão de Figueira da Companhia Carbonífera Cambuí-PR (Brasil)*
CMV	Efluente de mina de ouro da Companhia Morro Velho-MG (Brasil)
DMS11477	Linhagem-tipo da <i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> (Alemanha)
FG-460	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Figueira-PR (Brasil)*
I-35	Recebido do Dr. O. H. Tuovinen (<i>Ohio State University</i> , EUA)
LR	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Lagoa Real-BA (Brasil)*
PCE	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Poços de Caldas-MG (Brasil)*
PCEL	Efluente de lixiviação de minério de urânio de Poços de Caldas-MG (Brasil)*
S	Mina de cobre de Surubim (Caraíba-BA, Brasil)*
SJ22	Pirita, mina <i>Cae Coch, Trefriw, Wales</i> (EUA, cedida por B. Jonson)
SSP	Efluente de mina de carvão de Siderópolis-SC (Brasil)*
V3	Mina de cobre de <i>Sofia</i> , Bulgária (cedida por S. Groudev)

* Linhagens isoladas por O. Garcia Jr. (GARCIA JUNIOR, 1991)

I.2. Condições de cultivo e obtenção de células

O meio de cultivo utilizado para o crescimento bacteriano foi o meio T&K modificado (TUOVINEN; KELLY, 1973), preparado pela mistura da solução A com a solução B (na proporção 4:1, respectivamente), as quais apresentam as seguintes composições em g L⁻¹:

- Solução A: K₂HPO₄.3H₂O (0,4); MgSO₄.7H₂O (0,4); (NH₄)₂SO₄ (0,4); pH 1,75 corrigido com H₂SO₄ concentrado (autoclavagem a 120 °C por 20 minutos);

- Solução B: FeSO₄.7H₂O (33,4), pH 1,75 corrigido com H₂SO₄ concentrado (esterilização por filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de diâmetro de poro).

As culturas de *A. ferrooxidans* (Tabela 1) foram previamente repurificadas em meio T&K solidificado com agarose 0,45% (m/v). Um volume de suspensão diluída (concentração final 1x10⁻⁶) em Tween-80 0,25% (v/v) foi inoculado em meio sólido e

incubado a 30°C, por aproximadamente 15 dias. Uma colônia isolada foi transferida para meio líquido T&K e o procedimento foi repetido por três vezes. As culturas foram mantidas em geladeira, sendo repicadas a cada três meses.

Para obtenção de células para os experimentos, a cultura de *A. ferrooxidans* foi obtida por inóculo [10% (v/v)] da cultura estoque em meio T&K modificado, sendo o crescimento conduzido a 30°C e aproximadamente 200-250 rpm em mesa agitadora (*New Brunswick Scientific*). As células foram coletadas ao final da fase exponencial de crescimento (~24 horas), quando a porcentagem de oxidação de Fe^{2+} foi de aproximadamente 75% (Apêndice C, p. 167). Para isto, a quantidade de Fe^{2+} remanescente no meio de cultura foi determinada, titulando-se alíquotas de 2 mL com dicromato de potássio 0,1 N em meio ácido ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) (VOGEL, 1981, p. 268; GARCIA JUNIOR, 1991; GARCIA JUNIOR; BIGHAM; TUOVINEN, 1995a).

A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm (17.696 x g) por 20 minutos (centrífuga *Beckmann Avanti-J25*) ou filtrada em membrana de acetato de celulose e as células foram lavadas com H_2SO_4 0,01 mol L⁻¹ (centrifugação de 12.000-13.000 rpm por 5-10 minutos a 4°C, em microcentrífuga *Eppendorf 5415R*) e suspendidas nessa mesma solução. Para os experimentos de aderência à calcopirita (item I.5.2), as células crescidas em Fe^{2+} foram separadas do meio de cultura a uma velocidade de centrifugação de 4.000 rpm (2.831 x g) por 1 hora a 4°C, inferior à anteriormente citada, com o objetivo de evitar a eventual perda de substâncias exopoliméricas (EPS), importantes na aderência ao mineral (GEHRKE et al., 1998).

I.3. Amostras minerais de calcopirita e bornita

Foram utilizados os sulfetos de cobre calcopirita (CuFeS_2) e bornita (Cu_5FeS_4) “grau minério” (rocha natural de aproximadamente 500 g), de procedências distintas, adquiridas da empresa *Ward's Natural Science Establishment (Rochester, New York)*. Essa amostra de bornita também é constituída por grãos de calcopirita, como observado por uma análise microscópica qualitativa desse mineral. Para a análise proteômica e gênica diferencial foi utilizada a calcopirita proveniente da mina de Salobo-PA (Brasil), fornecida pela Vale (Brasil), sendo esta constituída por calcopirita e traços de sílica. Os minerais foram processados em moinho de bola para uma granulometria 100% inferior a 0,2 mm.

I.4. Estudos fisiológicos de *A. ferrooxidans* na presença dos sulfetos minerais

I.4.1. Ensaio respirométricos de várias linhagens de *A. ferrooxidans*

Para selecionar a linhagem mais eficiente na oxidação da calcopirita ou bornita, suspensões celulares de doze linhagens de *A. ferrooxidans* (Tabela 1) foram submetidas a ensaios respirométricos na presença desses sulfetos minerais.

Células provenientes de 1 mL de suspensão celular (item I.2) foram ressuspendidas em 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e mantidas em banho fervente por 30 minutos para a lise celular. As proteínas totais do lisado celular foram quantificadas pela metodologia de Hartree (1972). O sobrenadante foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos em microcentrífuga. Um volume de 0,9 mL da solução A [tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) 2 g L⁻¹; Na₂CO₃ 100 g L⁻¹; NaOH 1 mol L⁻¹] foi adicionado a 1 mL da solução de proteínas em diferentes diluições. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 10 minutos, resfriando-se a seguir à temperatura ambiente. Na mistura foram adicionados 0,1 mL da solução B (KNaC₄H₄O₆.4H₂O 20 g L⁻¹; CuSO₄.5H₂O 10 g L⁻¹; NaOH 1 mol L⁻¹), mantendo-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente foram adicionados 3 mL da solução C (1 volume do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 3 vezes com água destilada). Após aquecimento a 50°C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro DU530 (*Beckmann*) a 650 nm. A curva padrão foi obtida de maneira análoga utilizando-se volumes de uma solução padrão de soroalbumina bovina 0,5 g L⁻¹.

Após quantificação das proteínas, um volume máximo de 500 µL de suspensão celular contendo 300 µg mL⁻¹ de proteína total foi submetido a ensaios respirométricos na presença dos sulfetos de cobre calcopirita ou bornita. Os ensaios foram conduzidos em um equipamento de *Warburg* (Figura 3) em frascos de 25 mL, que consistem basicamente de um frasco de reação com um reservatório lateral para adição das células.

No compartimento principal do frasco, onde ocorrem as reações a serem investigadas, foram colocados 100 mg do sulfeto mineral e tampão glicina 0,2 mol L⁻¹ (em H₂SO₄, pH 2,2) para um volume final de 3 mL (incluindo o volume de suspensão celular). Frascos-controle foram realizados em paralelo, nas mesmas condições dos anteriores, porém sem a adição de suspensão celular, completando-se o volume

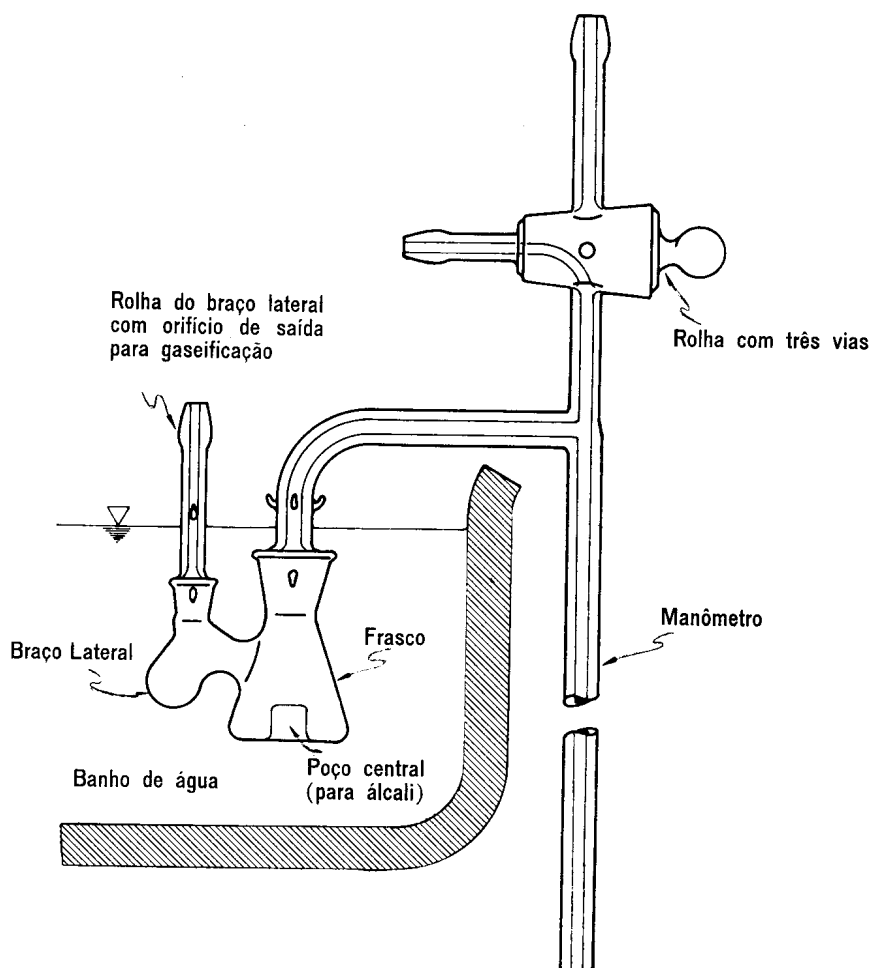


Figura 3. Esquema do respirômetro de *Warburg*. A técnica de *Warburg* se fundamenta no fato de que mantendo-se a temperatura constante, toda e qualquer variação de volume de um gás corresponde a uma modificação na pressão.

para 3 mL com o referido tampão. Um volume de 0,1 mL de KOH 20% (m/v), embebido em um papel de filtro, foi colocado no poço central para consumo do CO₂ existente no interior de cada frasco, a fim de impedir a multiplicação celular de *A. ferrooxidans*.

Para execução do experimento foi acoplado ao frasco de reação um manômetro graduado, contendo um líquido de densidade conhecida. O manômetro consta de dois ramos, os quais se comunicam entre si em suas bases através de um tubo de borracha encaixado na extremidade inferior. Durante o consumo de gás, a pressão diminuiu e o menisco do líquido se elevou. Essa diferença indicada em milímetros na escala graduada foi transformada em volume gasoso expresso em microlitros (μL). Para tanto, se multiplicou o valor em milímetros por uma constante (K) obtida a partir dos dados experimentais aplicando-se a equação dos gases perfeitos.

$$K = \frac{(V_T - V_f) \times (273/T) + V_f \times a}{P_o}$$

onde VT = volume do conjunto frasco-manômetro;

T = 237 + t (temperatura durante a execução do experimento);

Vf = volume líquido do sistema experimental;

a = coeficiente de solubilidade de um gás na água;

Po = pressão expressa em termos de fluído manométrico (Po = 10.032).

Os conjuntos (frascos-manômetros) fechados foram mantidos em banho-maria a 30°C e 150 agitações minuto⁻¹. O consumo de oxigênio (μL) foi expresso como uma média dos valores das réplicas em cada intervalo de tempo (minutos).

I.4.2. Curva de crescimento da linhagem LR

A linhagem de *A. ferrooxidans* LR, que apresentou uma das melhores taxas de oxidação da calcopirita e bornita nos testes de respirometria (item I.4.1), foi investigada quanto ao crescimento na presença dos minerais. Para a realização desse ensaio uma alíquota de 5% (v/v) de cultura estoque de *A. ferrooxidans* LR foi

previamente adaptada ao crescimento em T&K contendo quantidades crescentes dos minérios (e decrescentes de Fe^{2+}), conforme Tabela 2 (BEVILAQUA, 1999). Cada fase teve duração de aproximadamente 15 dias, sendo que o pH foi ajustado periodicamente para $\sim 1,8$ com solução esterilizada de H_2SO_4 1 mol L^{-1} , o potencial de óxido-redução (Eh/mV vs. Ag/AgCl saturado) medido e a água de evaporação repostada com água destilada esterilizada (pH neutro).

Tabela 2. Fases do procedimento experimental da adaptação de *A. ferrooxidans* ao crescimento nos sulfetos de cobre.

Fases	Concentração de Fe^{2+} (mMol L^{-1})	% Sulfeto mineral (m/v)
1	60	0,2
2	30	0,4
3	15	0,8
4	7,5	2,0
5	-	2,5

I.5. Exposição aos sulfetos minerais e obtenção de células de *A. ferrooxidans* LR para a análise da expressão diferencial

Inúmeros testes foram previamente realizados para definir as condições experimentais de exposição celular aos minerais. Simultaneamente, várias metodologias foram testadas para a recuperação das células tanto do sobrenadante como de células aderidas ao substrato mineral. As condições que possibilitaram melhor recuperação das células puderam ser definidas em função desses testes realizados. Apenas os testes finais que apresentaram resultado satisfatório são descritos a seguir.

I.5.1. Células livres ou planctônicas

Os experimentos de exposição aos minerais foram realizados no mínimo em triplicata, em ensaios independentes, utilizando-se células de *A. ferrooxidans* obtidas a partir de 3.000 mL de cultura (item I.2), as quais foram suspendidas em 300 mL de meio T&K (sem íons Fe^{2+}). As células não expostas aos minerais (controle) foram obtidas a partir de 100 mL desta suspensão celular por meio de centrifugação a 3.900 rpm por 20 minutos a 4°C em centrífuga de mesa *Sorvall*.

Cada experimento de exposição foi realizado em 2 frascos Erlenmeyer de 250

mL contendo 100 mL da suspensão e 2,5 g de calcopirita ou de bornita, incubando-se a 30°C sob agitação de 150-250 rpm por diferentes tempos (24, 48, 72 ou 144 horas com calcopirita; 24 ou 48 horas com bornita). Testes prévios foram realizados, o que permitiu determinar a relação massa/volume de 2,5% como sendo apropriada para os experimentos de exposição. Após o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada a 700 rpm por 1 minuto (*Sorvall*) para separação do mineral. As células livres presentes no sobrenadante foram coletadas por centrifugação a 3.900 rpm por 20 minutos a 4°C e lavadas com H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹.

Células-controle e células livres após exposição ao mineral foram submetidas à análise protéica (item I.6) e/ou à análise da expressão gênica (item I.7).

I.5.2. Células aderidas à calcopirita

I.5.2.1. Padronização de metodologia para retirada de células aderidas ao mineral

Células provenientes de 300 mL de cultura (item I.2) foram suspendidas em 30 mL de T&K (sem íons Fe²⁺). O experimento de aderência foi realizado em 2 frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo cada 10 mL da suspensão e 2,5% (m/v) de calcopirita, os quais foram mantidos a temperatura ambiente, sem agitação, por 24 horas. As células-controle (provenientes de 10 mL da suspensão, não expostas ao mineral) e as células após exposição foram obtidas como descrito no item I.5.1, sendo o mineral separado das células livres por centrifugação a 700 rpm por 1 minuto a 4°C.

Para obtenção das células aderidas à calcopirita os procedimentos utilizados foram adaptados a partir do descrito por Garcia e Jerez (1995) e Ohmura et al. (1996), adicionando-se 1 mL de Triton X-100 0,05% (v/v) ou 1 mL de DTT 5 mmol L⁻¹ ao mineral, respectivamente. Após 20 minutos sob agitação vigorosa em vortex, o mineral foi centrifugado a 800 rpm por 1 minuto e as células aderidas foram obtidas por centrifugação do sobrenadante (13.200 rpm por 10 minutos a 4°C).

I.5.2.2. Determinação do tempo de exposição à calcopirita

Uma análise do tipo *time course* foi realizada para verificar as alterações nos perfis protéicos de células aderidas à calcopirita em intervalos de tempos variáveis de até 24 horas.

Células provenientes de 2.000 mL de cultura de *A. ferrooxidans* (item I.2) foram suspendidas em 200 mL de T&K (sem íons Fe^{2+}). Cada experimento de exposição foi realizado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL da suspensão celular com 2,5% (m/v) de calcopirita. Os frascos foram mantidos a 30°C e 60 rpm por diferentes tempos (2, 6, 8 ou 24 horas). Controles foram realizados na ausência da calcopirita, tanto sem agitação (tempo de 0 hora) como também sob agitação para cada um dos tempos de incubação. As células dos controles, e as células livres foram obtidas como descrito no item I.5.1. As células aderidas ao mineral foram obtidas após tratamento com Triton X-100 0,05% (v/v) (item I.5.2.1).

Células-controle (tempo 0 hora e após agitação nos diferentes tempos na ausência do mineral), células livres e aderidas à calcopirita foram submetidas à extração de proteínas de periplasma e de esferoplastos (item I.6.1.2) e analisadas por eletroforese.

I.5.2.3. Exposição à calcopirita para análise por 2D

Com base nos resultados de exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempo (item I.5.2.2), as proteínas periplasmáticas (item I.6.1.2) foram extraídas de células não aderidas e de células aderidas ao mineral após exposição por 2 horas (sob agitação a 60 rpm) e separadas por 2D-PAGE (pH 3-10). Para análise por eletroforese as células não aderidas também foram tratadas de modo análogo com Triton X-100 0,05% (v/v).

A análise das proteínas periplasmáticas foi realizada entre apenas duas réplicas, porém cada uma delas foi obtida a partir de um *pool* de três experimentos independentes, com o objetivo de garantir quantidade de proteína suficiente para a separação por eletroforese 2D.

I.6. Análise da expressão protéica diferencial em *A. ferrooxidans* LR após exposição aos minerais

I.6.1. Extração de proteínas

I.6.1.1. Proteínas totais

I.6.1.1.1. Lise celular por sonicação

Para obtenção de proteínas totais, células de *A. ferrooxidans* foram lisadas inicialmente por sonicação, segundo procedimento descrito por Ramírez et al. (2004), com modificações. As células (item I.2) foram lavadas com Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,5) e suspendidas em tampão contendo Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 7,5), MgCl₂ 5 mmol L⁻¹ e RNase pancreática 50 µg mL⁻¹. A lise foi realizada por ultra-som com pulsos de 9 segundos (alternados com repouso de 9 segundos) e amplitude de 30% por 6 minutos em sonicador *Vibracell* (*Sonics*).

O sobrenadante contendo proteínas totais foi submetido à purificação com *2-D Clean-Up Kit* (*GE Healthcare*) e as proteínas precipitadas foram suspendidas em tampão de lise [uréia 9,5 mol L⁻¹; Igepal 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v)]. As amostras foram mantidas a -20°C. As proteínas foram quantificadas pelo método descrito no item I.6.2 e analisadas por eletroforese.

I.6.1.1.2. Extração com fenol

A extração de proteínas com fenol foi realizada segundo método descrito por De Mot e Vanderleyden (1989). As células (item I.2) foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (K₂HPO₄ 124 g L⁻¹; KH₂PO₄ 0,39 g L⁻¹; NaCl 8,8 g L⁻¹; pH 7,2) por centrifugações a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga. As células foram suspensas em 750 µL de tampão de extração [sacarose 0,7 mol L⁻¹; Tris-base 0,5 mol L⁻¹; HCl 30 mmol L⁻¹; EDTA 50 mmol L⁻¹; KCl 0,1 mol L⁻¹; DTT 40 mmol L⁻¹] e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. À solução adicionou-se 750 µL de fenol equilibrado (*Invitrogen*), e após 15 minutos de agitação contínua em vortex, as fases foram separadas por centrifugação a 12.000 rpm por 5

minutos a 26°C em microcentrífuga. A fase fenólica foi reextraída 2 vezes com mesmo volume de tampão de extração. As proteínas foram precipitadas da fase fenólica por adição de 5 volumes de acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol. Após incubação por no mínimo 2 horas a -20°C, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C, e o precipitado lavado 2 vezes com acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em metanol e com acetona 80% (v/v). O sedimento foi secado ao ar e solubilizado em 30 a 100 µL de tampão de lise [uréia 9,5 mol L⁻¹; Igepal 2% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v)]. As amostras foram mantidas a -20°C. As proteínas foram quantificadas pelo método descrito no item I.6.2 e analisadas por eletroforese.

Para análise em 2D-PAGE, uma quantidade de 250 µg de proteínas do extrato total foi purificada por precipitação das proteínas com *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare), as quais foram suspensas em 25 µL de tampão de lise.

I.6.1.2. Proteínas de periplasma e de esferoplastos

Inicialmente, para isolamento das proteínas do periplasma utilizou-se o procedimento descrito por Van der Westen, Mayhew e Veeger (1978). As células (item I.2) foram suspendidas em um volume de pelo menos 50 µL da solução contendo Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) e EDTA 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e mantidas sob agitação a 37°C a 250 rpm por 30 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas de periplasma foi separado por centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos, seguindo-se a quantificação das proteínas e análise por eletroforese (item I.6.3).

Alternativamente, testou-se a extração de proteínas com clorofórmio segundo método descrito por Ames, Prody e Kustu (1984), com modificações. As células (item I.2) foram suspendidas em pelo menos 164 µL da solução contendo Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 9,0) e EDTA 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), e após adição de cerca de 16 µL de clorofórmio, as células foram mantidas por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante contendo as proteínas de periplasma foi obtido por centrifugação a 6.000 x *g* por 20 minutos. Os esferoplastos (sedimento) foram suspendidos em um volume de no mínimo 100 µL de tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) [Tris-HCl 0,0625 mol L⁻¹ (pH 6,8); SDS 2% (v/v); glicerol 10% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v)], e mantidos em banho fervente por 5 minutos para a lise. Após centrifugação,

as proteínas obtidas a partir do sobrenadante, foram quantificadas e analisadas por SDS-PAGE (item I.6.3).

Para análise em 2D-PAGE, o volume total do extrato periplasmático foi purificado por precipitação das proteínas com *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare), as quais foram suspendidas em 25 μL de tampão de lise [uréia 9,5 mol L^{-1} ; Igepal 2% (v/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v)]. As proteínas periplasmáticas foram quantificadas e aproximadamente 30 μg de proteínas foram analisadas por 2D-PAGE (item I.6.4).

I.6.2. Quantificação das proteínas

Alíquotas contendo proteínas celulares foram submetidas ao procedimento de quantificação utilizando-se *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (BRADFORD, 1976). O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de *Coomassie Brilliant Blue* G-250 em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%, para um volume final de 1 L, sendo a solução filtrada antes da utilização.

A curva-padrão foi obtida utilizando-se volumes de 10 a 25 μL de uma solução de soroalbumina bovina 0,5 g L^{-1} e completando-se para 100 μL com água. Após adição de 2 mL do reagente, a solução foi homogeneizada em vortex e mantida em repouso por 5 minutos. A leitura de absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro DU530 (Beckmann) ou 600S (FEMTO). A amostra foi submetida a tratamento análogo e sua concentração determinada a partir da curva-padrão.

I.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

As amostras de proteínas celulares foram incubadas a 100°C por 5 minutos em tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) [Tris-HCl 0,0625 mol L^{-1} (pH 6,8); SDS 2% (v/v); glicerol 10% (v/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v); Azul de Bromofenol 0,001% (m/v)] e colocadas em gelo. Após rápida centrifugação (1.000 x *g*, por 2-3 minutos), as amostras foram aplicadas no gel SDS-poliacrilamida 14%, utilizando-se tampão de corrida Tris-glicina [Tris-base 25 mmol L^{-1} ; glicina 192 mmol L^{-1} ; SDS 0,1% (m/v)] (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada no sistema *MINI-PROTEAN® II* (Bio-Rad) com aplicação de 110 V ou no sistema *Hoefer™ SE600* (GE Healthcare) com aplicação de 100-150 mA por gel.

I.6.4. Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

As amostras de proteínas foram separadas por 2D-PAGE usando o sistema de isoeletrofocalização *IPGphor™* (GE Healthcare) em *Immobiline™ DryStrip* (13 cm, linear, GE Healthcare) na faixa de pH 3-10 ou 4-7, conforme especificações do fabricante.

Um volume de 25 µL da solução protéica purificada foi adicionado a 170 µL de tampão de rehidratação [uréia 8 mol L⁻¹; Triton X-100 2% (v/v); Azul de Bromofenol 0,001% (m/v); DTT 2,8 mg mL⁻¹], 5 µL de *IPGbuffer* (GE Healthcare) e 50 µL de *DeStreak™ Rehydration Solution* (GE Healthcare). Testes prévios demonstraram que a adição de *DeStreak™ Rehydration Solution* permitiu melhor visualização das proteínas no gel, provavelmente devido a uma solubilização mais eficiente das mesmas. Para evitar evaporação foram adicionados 700 µL de *IPG Cover Fluid* (GE Healthcare) sobre cada tira. Depois de 10 horas de rehidratação (sem aplicação de potencial), a isoeletrofocalização foi conduzida com corrente de 50 µA por tira a 20°C por 500 V (1 hora), 1000 V (1 hora) e 16.000 Vh (para um total de 17.500 Vh).

Após a isoeletrofocalização a tira foi equilibrada por duas vezes durante 15 minutos cada com 3 mL do tampão de equilíbrio [Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8); uréia 6 mol L⁻¹; glicerol 30% (v/v); SDS 2% (m/v); Azul de Bromofenol 0,001% (m/v); DTT 10 mg mL⁻¹] (GIANAZZA et al., 1985; BJELLQVIST et al., 1993). A tira também foi equilibrada uma vez durante 15 minutos com 3 mL do tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida 25 mg mL⁻¹ ao invés de DTT.

As proteínas foram separadas na segunda dimensão em gel SDS-poliacrilamida 12,5% (18 x 16 cm) utilizando o sistema *Hoefer™ SE600* (GE Healthcare). A corrida foi realizada a 45 mA por gel em tampão de corrida Tris-glicina (LAEMMLI, 1970).

I.6.5. Coloração do gel

O gel obtido foi corado utilizando-se os seguintes métodos:

- *Coomassie Brilliant Blue* R-250: o gel foi mantido por 20 minutos em solução corante contendo metanol 54% (v/v), ácido acético glacial 13,5% (v/v) e *Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,27% (m/v). Em seguida, foi descorado em solução contendo

metanol 30% e ácido acético glacial 10%, sob agitação, até que as bandas de proteínas puderam ser visualizadas com nitidez.

- nitrato de prata: após fixação, por 1 hora, em solução contendo etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,03% (v/v), o gel foi desidratado por 3 vezes (20 minutos cada sob agitação) em etanol 50% (v/v). Após agitação com a solução de tiosulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,02% (m/v) por 1 minuto, o gel foi lavado com água destilada. A seguir, foi mantido (20 minutos, sob agitação) em solução de nitrato de prata 0,2% (m/v) contendo formaldeído 0,03% (v/v). Após novas lavagens com água destilada (3 vezes), o gel foi mantido no revelador [Na_2CO_3 6% (m/v); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0004% (m/v); formaldeído 0,02% (v/v)] até aparecimento das proteínas e a seguir transferido para solução fixadora [etanol 50% (v/v); ácido acético 12% (v/v); formaldeído 0,03% (v/v)].

I.6.6. Análise da imagem de 2D e comparação dos géis

As imagens dos géis de 2D foram adquiridas usando o *ImageScanner* (GE Healthcare) a 150 *dpi* de resolução. A intensidade de coloração dos *spots* (expressa como % volume), a massa molecular e o ponto isoelétrico foram estimados para cada proteína utilizando o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare).

Gráficos de dispersão de % volume vs. % volume de comparação entre as réplicas foram obtidos para verificar o grau de reprodutibilidade entre no mínimo três réplicas para cada experimento (controle, exposição à bornita ou a calcopirita). Valores de correlação da reta obtida por regressão linear superiores a 0,9 foram considerados como significativos para as análises. Somente proteínas consideradas típicas pela análise dos gráficos de dispersão foram analisadas quanto à expressão diferencial entre controle e bornita e/ou entre controle e calcopirita. Para a comparação das proteínas de periplasma de células livres (considerada como controle somente para essa análise) e de células aderidas à calcopirita, o grau de reprodutibilidade foi verificado entre apenas duas réplicas, porém cada uma delas obtida a partir de um *pool* de três experimentos independentes.

Proteínas induzidas ou reprimidas foram selecionadas para análise por espectrometria de massas somente quando a variação entre o controle/calcopirita e/ou controle/bornita foi estatisticamente significativa pelo Teste T de *Student* ($P < 0,05$), utilizando o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare).

I.6.7. Identificação das proteínas diferenciais por espectrometria de massas

Esta parte do trabalho foi realizada pelas colaboradoras Dra. Eliandre de Oliveira e Maria Antonia Odena da *Plataforma de Proteômica* (<http://www.pcb.ub.es/homePCB/live/es/p1249.asp>), *Parc Científic de Barcelona* - Universidade de Barcelona (Barcelona - Espanha).

I.6.7.1. Digestão trípica das proteínas

As proteínas diferencialmente expressas foram isoladas dos géis e digeridas com tripsina (*Sequencing grade modified, Promega*) (SHEVCHENKO et al., 1996) utilizando-se dispositivo automático *Investigator ProGest* (*Genomic Solutions*).

Para isto, a porção de gel contendo a proteína foi lavada seqüencialmente com tampão bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (ABC) e ACN. Em seguida, foi realizada a redução e a alquilação respectivamente por tratamento com DTT 10 mmol L⁻¹ durante 30 minutos a 56°C, e tratamento com iodoacetamida 55 mmol L⁻¹. Depois de lavagens seqüenciais com tampão ABC e ACN, as proteínas foram digeridas a 37°C com tripsina 0,27 nmol L⁻¹, por uma noite. Peptídeos trípticos foram extraídos da matriz do gel com ácido fórmico 10% (v/v) e ACN, e secos em centrífuga a vácuo.

I.6.7.2. Análise MS/MS

Os peptídeos trípticos foram analisados por MALDI-TOF-MS usando o espectrômetro de massas *4700 Proteomics Analyzer* (*Applied Biosystems*) e/ou ESI-MS/MS usando um sistema *Q-TOF Global* (*Micromass-Waters*)

- **Análise por MALDI-TOF-MS:** os peptídeos foram redissolvidos em 5 µL de TFA 0,1% (v/v) em ACN 50% (v/v). Uma alíquota de 0,5 µL foi misturada com o mesmo volume da solução da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 2 mg mL⁻¹ (*Waters*) em TFA 0,1% (v/v) e ACN 50% (v/v), e diretamente colocada na placa de MALDI. Os espectros de MS foram adquiridos em modo refletor positivo (potencial de 20 kV) e intensidade do laser variando de 5800 a 6200. Cerca de 500 *shots* por

espectro foram acumulados, e de 3 a 5 picos foram selecionados para serem caracterizados por análise MS/MS. Os espectros de MS/MS foram adquiridos usando dissociação induzida por colisão (CID), com ar atmosférico como gás de colisão. Um modo positivo MS-MS 1 kV foi usado. Espectros MS e MS/MS da mesma proteína foram combinados em um único arquivo com formato de texto compatível com o programa de buscas MASCOT (extensão mgf) para submissão dos dados para pesquisa em banco de dados.

- **Análise por ESI-MS/MS:** os peptídeos digeridos por tripsina foram analisados *online* por LC-MS/MS (*Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF*) (*CapLC, Micromass-Waters*). As amostras foram ressuspendidas em 15 mL da solução de ácido fórmico 1% e 4 mL foram injetados para separação cromatográfica na coluna capilar *RP C18* (75 mm de diâmetro interno e 15 cm de comprimento, *PepMap column, LC Packings*). Os peptídeos eluídos foram ionizados *via* injetores nano-ES (*PicoTip™, New Objective*). O potencial aplicado no capilar foi de 2000-3000 V e no cone foi de 80 V. A colisão durante a dissociação induzida por colisão (CID) foi de 20-35 eV e argônio foi usado como gás de colisão. Os dados foram gerados em formato de arquivo de texto (extensão pkl) e submetidos à pesquisa em banco de dados.

I.6.7.3. Pesquisa em banco de dados

Os arquivos pkl e mgf foram submetidos para pesquisa em banco de dados utilizando-se MASCOT. A pesquisa foi realizada contra as seqüências de proteínas anotadas do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>). Os parâmetros da pesquisa foram: 1 clivagem perdida, carbamidometil de cisteína como modificação fixa, oxidação da metionina e Piro-glu (N-term Q) como modificações variáveis. A tolerância de erro na massa molecular dos íons foi de 100 ppm e 0,25 Da, respectivamente para espectros MS e MS/MS.

O programa MASCOT envolve o cálculo e comparação de m/z (massa/carga) dos fragmentos teoricamente preditos para todos os peptídeos de um banco de dados com o valor de m/z dos fragmentos experimentais (CANTÚ et al., 2008). A probabilidade do valor de m/z do fragmento teórico e experimental coincidir, de maneira randômica, é calculada e expressa como sendo o negativo do logaritmo

desse número (*score*). Quanto maior for o valor do *score* obtido, maior é a probabilidade do resultado de identificação ser verdadeira (CANTÚ et al., 2008). Sendo assim, os peptídeos foram considerados como identificados quando o valor de acertos (*score*) excedeu o valor de homologia calculado por MASCOT.

I.7. Análise da expressão gênica diferencial em células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita

Experimentos de PCR em tempo real foram realizados a fim de se verificar a expressão em nível de transcrição de alguns genes de interesse. Tais genes foram os correspondentes a algumas proteínas diferenciais identificadas na análise proteômica em resposta à bornita (item I.6). A expressão gênica diferencial foi analisada em quadruplicata em células livres de *A. ferrooxidans* LR mantidas em exposição à calcopirita por 24 horas, comparativamente às células-controle (não expostas ao mineral).

Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Profa. Dra. Laura M. M. Ottoboni no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, pelo Pós-Doutorando Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz.

I.7.1. Extração de RNA

O RNA total de *A. ferrooxidans* foi isolado como descrito por Paulino, Mello e Ottoboni (2002). As células-controle e as células livres após exposição à calcopirita (item I.5.1) foram suspendidas em 800 µL de tampão de extração (EDTA 1 mmol L⁻¹; LiCl 0,1 mol L⁻¹; Tris 0,1 mol L⁻¹) e agitadas em vortex. À suspensão adicionou-se 800 µL da mistura de fenol equilibrado com Tris-HCl, clorofórmio e álcool isoamílico (proporção 25:24:1, v/v/v) contendo SDS 10% (m/v), e agitou-se em vortex, até o desaparecimento das células. Após centrifugação a 10.000 rpm por 4 minutos a 4°C (microcentrífuga *Microfuge® R. Beckman*), a fase aquosa foi recuperada e o processo de extração com fenol foi repetido por cerca de 8 vezes. O RNA foi precipitado a -70°C por 2 horas com acetato de potássio 2% (m/v) (pH 5,5) e etanol 100%. Após centrifugação a 10.000 rpm por 8 minutos a 4°C, lavou-se o sedimento

de RNA com 800 μL de etanol 70% (v/v). O sedimento foi seco a temperatura ambiente, e o RNA foi diluído com 40 μL de água tratada com DEPC. A integridade do RNA foi checada em gel de agarose 1% (m/v). O RNA foi tratado com DNase 1 U μL^{-1} (Invitrogen) por 15 minutos a 37°C e estocado a -80°C. Após quantificação (método espectrofotométrico-leitura a 260 nm), o RNA foi analisado em gel de agarose 1% (m/v).

I.7.2. Síntese de cDNA

A partir de 1,5 μg de RNA sintetizou-se cDNA utilizando-se o *kit ThermoScriptTM RT-PCR System* (Invitrogen), conforme especificações do fabricante. Ao RNA adicionou-se água DEPC para um volume final de 9 μL , 1 μL de *Random Primer* e 2 μL de *mix dNTPs* (10 mmol L^{-1}). Após incubação a 65°C por 5 minutos, acrescentou-se os reagentes do *kit*: 4 μL de tampão, 1 μL de DTT, 1 μL de água DEPC, 1 μL de *RNaseOUTTM* e 1 μL de transcriptase reversa. O programa de PCR foi de 25°C a 10 minutos, 50°C a 50 minutos e 85°C a 5 minutos. Depois da amplificação, adicionou-se 1 μL de RNase H (2 U μL^{-1}) e incubou-se a 37°C por 20 minutos. Após quantificação por espectrofotometria, o cDNA foi mantido a -20°C.

I.7.3. PCR em tempo real

A caracterização da expressão dos genes selecionados foi realizada por meio de RTq-PCR (*Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*). Os pares de *primers* específicos para cada gene utilizado nos experimentos de PCR em tempo real estão listados na Tabela 3 e foram desenhados para uma temperatura *melting* (T_m) de 60°C utilizando-se o programa *Primer3 v.0.4.0* (ROZEN; SKALETISKY, 2007) com base nas seqüências nucleotídica disponíveis no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>) (Anexo A, p. 168). A especificidade dos *primers* foi confirmada por PCR usando DNA genômico isolado de *A. ferrooxidans* LR, de acordo com procedimento padrão (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 3. Seqüências de *primers* utilizados no experimento de PCR em tempo real para amplificação das regiões centrais do cDNA de interesse.

Nº de acesso *	Função Predita	Primer direto (seqüência 5'→3')	Primer reverso (seqüência 5'→3')	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
AFE_0358	Choque térmico HslU	GCGGCATAGTCTTCATCGAC	CAGAAGATCGCGTTGTACTCC	101
AFE_0942	Ribulose bifosfato carboxilase	TTGGCCTTTCTGGTAGATGG	CGCGGTGATAGTGCAGGTA	94
AFE_0952	Ribossomal L25	CCTGGTGGAAGTAGAAGTGGA	CAGATGCAGGCTATCACCAA	97
AFE_1640	Ribossomal S2	ATGGCACCATGGAAAACTC	CAGACCGTTCATGTCCTTGAT	104
AFE_2062	Antioxidante, família AhpC/Tsa	ACTCCCATTTACCCATCTG	GCGATGCTCTTGGAGAGGT	103
AFE_3085	Frutose-bifosfato aldolase	GTATCGACCGGATCAAGGAA	ACCGAATTCGTGGATGATCT	110

* Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

O experimento de PCR em tempo real foi normalizado usando o gene endógeno *ala* que codifica para alanil RNAt sintetase (YARZÁBAL et al., 2004). Em experimentos prévios, a expressão do gene *ala* não se alterou após exposição das células aos minerais.

As reações foram realizadas em triplicata usando o *kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)*, seguindo as instruções do fabricante com modificações. As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de cDNA, 6,25 µL de *Platinum® SYBR® Green*, 1 µL de cada *primer* (5 µmol L⁻¹, reverso e direto), 0,25 µL corante de referência *Rox (Applied Biosystems)* e água MilliQ em quantidade suficiente para um volume final de 12,5 µL.

A reação foi incubada a 50°C por 2 minutos, seguido da desnaturação a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento do *primer* a 60°C por 20 segundos, e extensão do *primer* a 72°C por 32 segundos. Em seguida foi realizada uma etapa adicional de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos), para verificar a especificidade das amplificações do PCR em tempo real (ausência de artefatos como a formação de dímeros e produtos de PCR não específicos).

Os dados foram coletados no equipamento *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)* e processados com o *Sequence Detection Software v4.3.4 (Applied Biosystems)*. O padrão da expressão relativa dos genes de interesse foi

calculado baseado no método de comparação ou limiar comparativo ($\Delta\Delta C_T$), previamente descrito por Livak e Schmittgen (2001). O número de C_T serve como base de comparação entre as amostras, pois se refere ao número de ciclos no qual a curva de amplificação de cada amostra atinge o *threshold* (ponto de referência no qual todas as amostras possuem a mesma intensidade de fluorescência). A média dos valores do ciclo (C_T) para os genes de interesse e para o gene endógeno foi determinada no controle (crescimento em Fe^{2+}) e na condição testada (exposição à calcopirita). Para a normalização, os valores de delta C_T (ΔC_T) foram então calculados como a diferença entre o valor de C_T para os genes de interesse e o valor de C_T para o gene endógeno. O valor de $\Delta\Delta C_T$ para cada gene foi determinado como uma diferença entre o valor de ΔC_T obtido nas condições testadas e o valor de ΔC_T obtido da condição controle. A mudança no nível do RNAm dos genes de interesse nas condições testadas, normalizada com o gene endógeno e a condição controle, foi dada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os experimentos foram validados usando diluições seriais de cDNA, assegurando-se que a eficiência de amplificação dos genes de interesse e do gene endógeno foi aproximadamente equivalente. A variação entre os experimentos foi estatisticamente comprovada pelo Teste T de *Student*, com nível de confiança de 0,05 ou menos.

PARTE II. Proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína: expressão em *E. coli*, purificação e avaliação do efeito da proteína recombinante sobre a oxidação bacteriana da calcopirita

Essa parte do trabalho teve como objetivo avaliar se a adição de uma proteína contendo cisteína poderia auxiliar a oxidação bacteriana da calcopirita. Para isto, a seqüência nucleotídica da região codificadora de uma proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR contendo 8% dos aminoácidos em cisteína (denominada PCys) foi clonada para superexpressão em *E. coli* Rosetta, sendo purificada por cromatografia de afinidade e utilizada em ensaios respirométricos de oxidação de calcopirita na presença de *A. ferrooxidans* LR.

Os quarenta aminoácidos iniciais da proteína putativa apresentam identidade com os quarenta aminoácidos iniciais de uma proteína hipotética anotada de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. A *ORF* correspondente a essa proteína putativa foi originalmente identificada como parte de um fragmento de DNA pertencente a uma biblioteca genômica de *A. ferrooxidans* LR e foi utilizada na transformação de *E. coli* DH5 α (NOVO, 1993). O clone de *E. coli* transformado com tal fragmento apresentou um aumento da sua tolerância ao manganês em comparação com a *E. coli* não recombinante (NOVO, 1993).

A clonagem da *ORF* da proteína putativa em vetor de expressão, bem como a padronização inicial do protocolo de expressão em *E. coli* foram realizadas pelo Mestrando Guilherme Rodrigo Reis Monteiro dos Santos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, no Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os resultados aqui apresentados de expressão e purificação foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos da Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do IQ-UNESP, segundo modificações do protocolo inicial.

II.1. Clonagem da região codificadora da proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR em vetor de expressão

Células de *A. ferrooxidans* LR foram submetidas à extração de DNA genômico como descrito por Novo et al. (1996), o qual foi utilizado para a amplificação da região codificadora da proteína. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência de nucleotídeos (Figura 4) (Novo, M. T. M., comunicação pessoal).

Para a PCR foi utilizada a enzima *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Gibco BRL), além dos oligonucleotídeos direto (5'-CATATGCCTATTTTCGATTACCA-3') e reverso (5'-GGATCCTTAATGCTTCGTAAATTGCC-3') contendo os sítios para as enzimas *NdeI* e *BamHI* (sítios sublinhados), respectivamente. O produto amplificado foi purificado com o auxílio do kit *GFX™ DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), digerido com as enzimas citadas e utilizado para a ligação no vetor de expressão pET28a (Novagen) (Figura 5) entre os sítios dessas mesmas enzimas.

II.2. Expressão da proteína PCys em *E. coli*

O vetor recombinante pET28a (contendo a *ORF* de PCys) foi utilizado na transformação da linhagem de *E. coli* para a produção da proteína recombinante fusionada a uma cauda de poli-His, segundo procedimento a seguir.

Células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com o plasmídeo pET28a-PCys e selecionadas em meio 2YT [triptona 1,6% (m/v); extrato de levedo 1,0% (m/v); NaCl 0,5% (m/v); glicose 0,2% (m/v)] contendo canamicina 30 µg mL⁻¹. Algumas colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT contendo canamicina 30 µg mL⁻¹ e incubadas a 37°C, 200 rpm, por uma noite.

Um volume de 1 mL da cultura foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL do meio 2YT e canamicina 30 µg mL⁻¹, o qual foi incubado a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica de 0,6 a 0,8 a 600 nm. À cultura foi adicionado volume de IPTG de modo a atingir concentração final de 0,1 mmol L⁻¹. A cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm, e ao final de 4 horas, as células foram coletadas por centrifugação (20.000 x g, 10 minutos, 4°C) e ressuspensas em

(A) 339 pares de bases

ATGCCTATTTTCGATTACCATTGTTGCGATTGCGACGCCGACTTTGAATTGCTGGT
CATGAATTCAACCATCCCAAACCTGCCCCGCAATGTGGCAGCCAACACCTGGAAAA
GCAGATTTTCGCCGCGTAGCCGCACCTGGTCGCAGTGCTGGACTGAAGGCGCGTGC
TCGTGCACAAGCGGCGAAGGAGGGGCATTTGAGCAATTTTCCGCCCCGCCGAGCG
CAAATTGCCGTGACTCGGCAGGCATCGTTTCACCCCACCGACTTTTGGGAATAAC
ACCAGCGAGGATTTATCATGAGTGGTTTTTTCATGGATTTGGATGGCAATTTACG
AAGCATTGA

(B) 112 aminoácidos

MPIFDYH**CCDC**DADFELLVMNSTIPN**CPQC**GSQHLEKQISPRSRWSQ**CW**TEGAC**CS**CTSG
EGGAFEQFFRPPSAN**CR**DSAGIVSPHRLFGITPARIYHEWFFHGFQFTKH

Figura 4. Seqüência de nucleotídeos (A) e de aminoácidos (B) da região codificadora da proteína putativa PCys (contendo 8% de cisteína) de *A. ferrooxidans* LR. Os nove resíduos de cisteína estão em negrito.

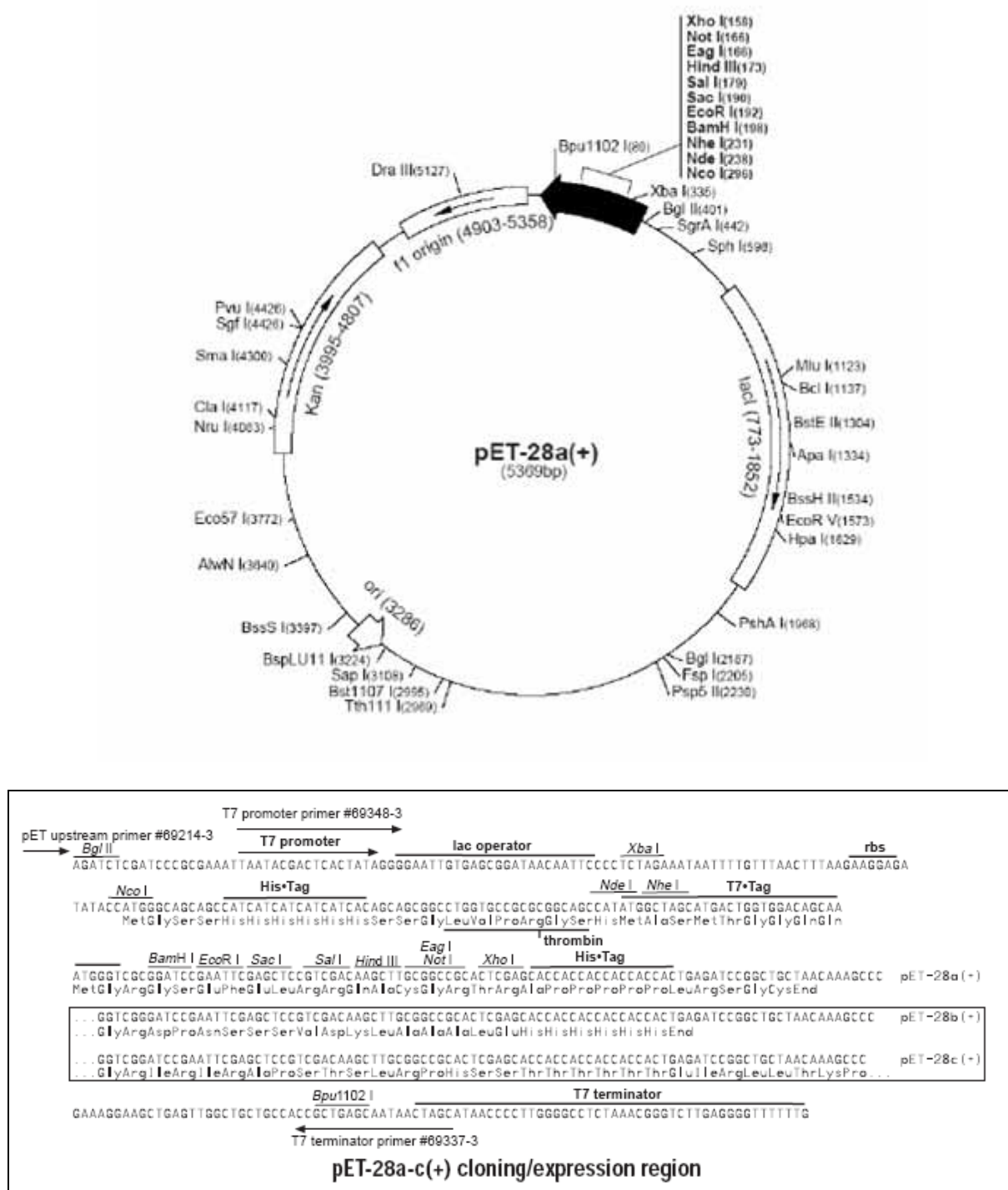


Figura 5. Representação do vetor de expressão pET28a (Novagen) e de sua região de policlonagem.

10 mL de tampão contendo NaCl 500 mmol L⁻¹, Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0) e imidazol 30 mmol L⁻¹. As células foram lisadas por sonicação durante 4,5 minutos em sonificador *Vibracell* (*Sonics*).

Em seguida, o lisado celular foi centrifugado durante 20 minutos a 22.000 x *g* a 4°C, o sobrenadante foi reservado e o precipitado ressuspenso em 10 mL do tampão contendo NaCl 500 mmol L⁻¹, Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), imidazol 5 mmol L⁻¹ e uréia 6 mol L⁻¹. Proteínas das amostras do precipitado e sobrenadante foram analisadas através de SDS-PAGE (item I.6.3) para verificar se a proteína recombinante estava solúvel (presente no sobrenadante) ou insolúvel (presente no precipitado).

II.3. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade e diálise

A proteína PCys recombinante (rPCys) foi purificada por meio de cromatografia de afinidade utilizando coluna de níquel *HiTRap Chelating* de 5 mL (*Amersham Pharmacia*) com o auxílio do *Akta Prime Protein Purification System* (*Amersham Pharmacia*). A ativação e o equilíbrio da coluna foram realizados conforme instruções do fabricante.

Após o equilíbrio da coluna, aplicou-se a amostra a um fluxo de 0,5 mL minuto⁻¹, recolhendo-se a fração que passou pela coluna. A coluna foi em seguida lavada com tampão de lavagem [NaCl 500 mmol L⁻¹; Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0); imidazol 5 mmol L⁻¹], recolhendo-se também essa fração. A proteína rPCys foi eluída a partir da coluna com um gradiente linear de imidazol 5-500 mmol L⁻¹ preparado no mesmo tampão de lavagem. A coluna foi regenerada conforme instruções do fabricante e as frações coletadas durante a purificação foram analisadas por SDS-PAGE (item I.6.3).

Para garantir a purificação da proteína, após a eluição foram realizadas diálises por aproximadamente 10 horas cada a 4°C em diferentes tampões: (1) Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), NaCl 250 mmol L⁻¹, imidazol 250 mmol L⁻¹; (2) Tris-HCl 25 mmol L⁻¹ (pH 8,0), NaCl 100 mmol L⁻¹, imidazol 100 mmol L⁻¹; (3) Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8,0), NaCl 50 mmol L⁻¹, imidazol 50 mmol L⁻¹; (4) 2 vezes no tampão Tris-HCl 10 mmol L⁻¹ (pH 8,0), imidazol 10 mmol L⁻¹. Após diálise, a proteína foi quantificada

segundo método descrito por Hartree (1972) (item I.4.1) e utilizada nos testes de respirometria.

II.4. Avaliação do efeito da proteína rPCys e de aminoácidos livres sobre a atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* LR em calcopirita

II.4.1. Ensaios respirométricos na presença da proteína rPCys

Para testar o efeito da proteína rPCys sobre a atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* LR na calcopirita, um volume de 500 µL de suspensão celular (contendo 600 µg mL⁻¹ de proteína celular total) foi utilizado para cada ensaio respirométrico. Os experimentos foram realizados com células de *A. ferrooxidans* LR na presença do mineral, e na presença ou ausência da rPCys. Frascos-controle (mineral na presença da rPCys, células na presença da rPCys e apenas o mineral) foram realizados em paralelo, nas mesmas condições dos anteriores. No compartimento principal do frasco foram colocados 200 mg da calcopirita, tampão glicina 0,2 mol L⁻¹ (em H₂SO₄; pH 2,2), e a proteína rPCys (1x10⁻⁵ mol L⁻¹) para um volume final de 3 mL (incluindo o volume de suspensão celular).

Os ensaios foram conduzidos em um equipamento de *Warburg* (Figura 3) em frascos de 25 mL com um reservatório lateral contendo as células. Após adição das células no reservatório principal, o consumo de oxigênio (µL) foi monitorado e expresso como uma média dos valores das triplicatas em cada intervalo de tempo (minutos).

II.4.2. Ensaios respirométricos na presença de cisteína livre e outros aminoácidos

Para testar o efeito do aminoácido cisteína sobre a atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* LR na calcopirita, um volume de 500 µL de suspensão celular (contendo 600 µg mL⁻¹ de proteína celular total) foi utilizado para cada ensaio respirométrico. Os experimentos foram realizados com células de *A. ferrooxidans* LR na presença do mineral, e na presença ou ausência de cisteína. Frascos-controle (mineral na presença do aminoácido, células na presença do aminoácido e apenas o

mineral) foram realizados em paralelo, nas mesmas condições dos anteriores. No compartimento principal do frasco foram colocados 200 mg da calcopirita, tampão glicina $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (em H_2SO_4 ; pH 2,2), e cisteína em concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ou $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em volume final de 3 mL (incluindo o volume de suspensão celular). Os experimentos foram conduzidos como descrito no item II.4.1.

O mesmo teste foi realizado na presença de outros aminoácidos, entre eles, alanina, serina, metionina ou histidina na concentração de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (ou $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e valina, isoleucina ou leucina na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

RESULTADOS

PARTE I: Expressão diferencial de proteínas e genes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos minerais calcopirita e bornita

I.1. Atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* na presença dos sulfetos minerais

Testes exploratórios de respirometria foram realizados para avaliar a atividade oxidativa de doze linhagens de *A. ferrooxidans* (Tabela 1) sobre os sulfetos minerais calcopirita e bornita (Figura 6). A velocidade inicial de oxidação, dada pela tangente das curvas (resultados não mostrados), indica que no geral a linhagem LR foi uma das mais eficientes na oxidação para ambos os minerais (Figura 6). O consumo de oxigênio foi resultado principalmente do metabolismo bacteriano, já que na ausência de células de *A. ferrooxidans* o consumo devido à oxidação química foi mínimo (Figura 6).

A atividade oxidativa de *A. ferrooxidans* LR sobre os minerais foi detectada também por meio do monitoramento do potencial de óxido-redução (Eh/mV vs. Ag/AgCl saturado) por aproximadamente 25 dias (Figura 7).

I.2. Análise da expressão protéica diferencial em *A. ferrooxidans*

I.2.1. Padronização da extração de proteínas totais

As proteínas totais de *A. ferrooxidans* LR foram obtidas pela lise das células por sonicação (Figura 8A) ou por extração com fenol (Figura 8B). O método de extração por fenol permitiu a detecção de um maior número de proteínas e por isso foi escolhido para ser utilizado nas extrações.

A isoeletrofocalização foi realizada nas faixas de pH de 3-10 (Figura 8A) e de 4-7 (Figura 8B), sendo a última escolhida para os experimentos a serem realizados, pois possibilitou melhor resolução das proteínas. Nesta faixa de pH de 4-7, aproximadamente 300 a 400 proteínas puderam ser detectadas por meio de coloração com *Coomassie Brilliant Blue* R-250, em cada condição testada (no controle ou após exposição aos minerais).

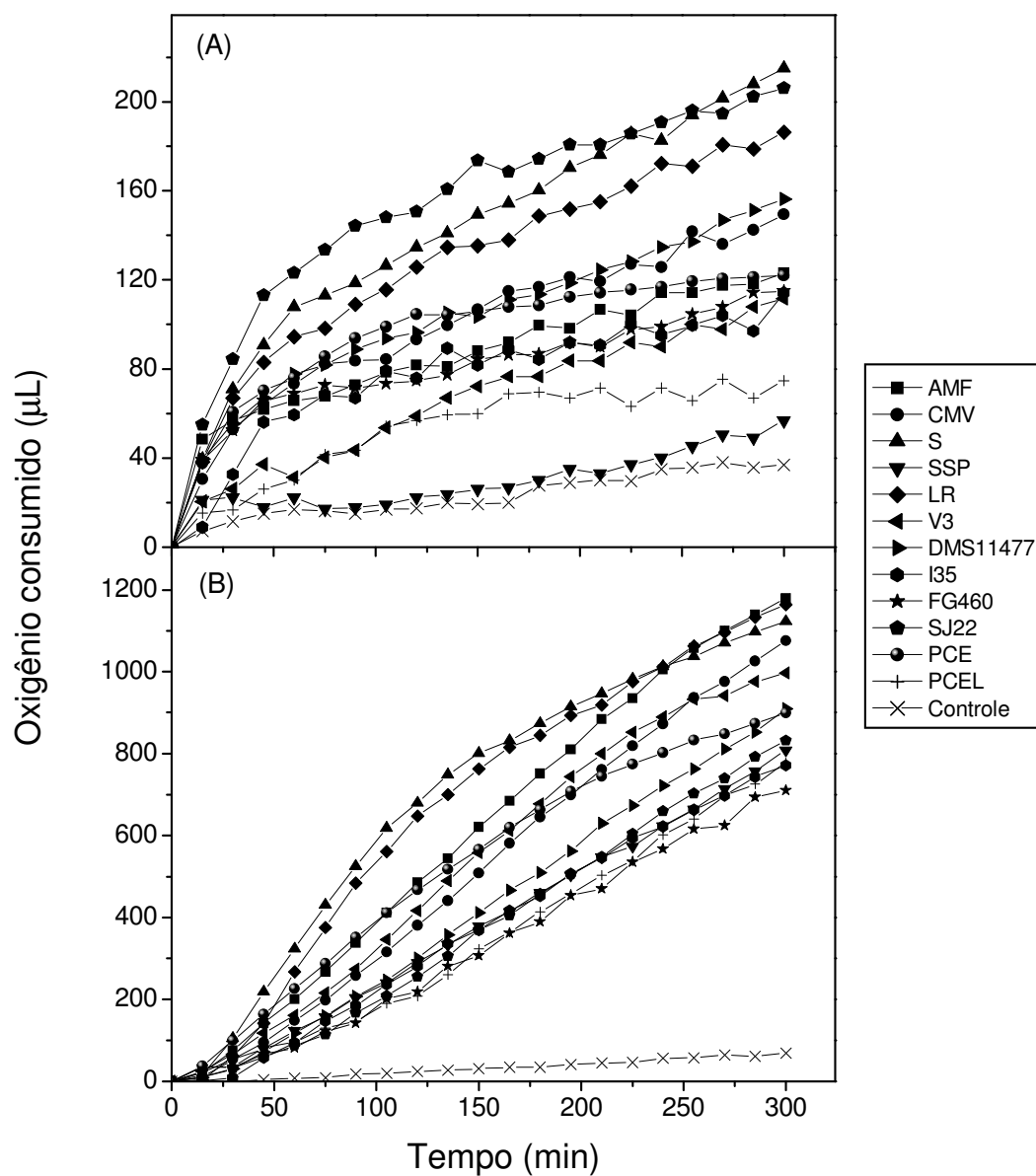


Figura 6. Consumo de oxigênio por doze linhagens de *A. ferrooxidans* na presença de calcopirita (A) ou bornita (B) durante ensaios respirométricos. Os minerais foram adquiridos da empresa *Ward's Natural Science Establishment*. O consumo de oxigênio (µL) foi medido, em duplicata, depois que as células foram adicionadas à amostra mineral. O controle foi realizado para cada um dos minerais, na ausência de células.

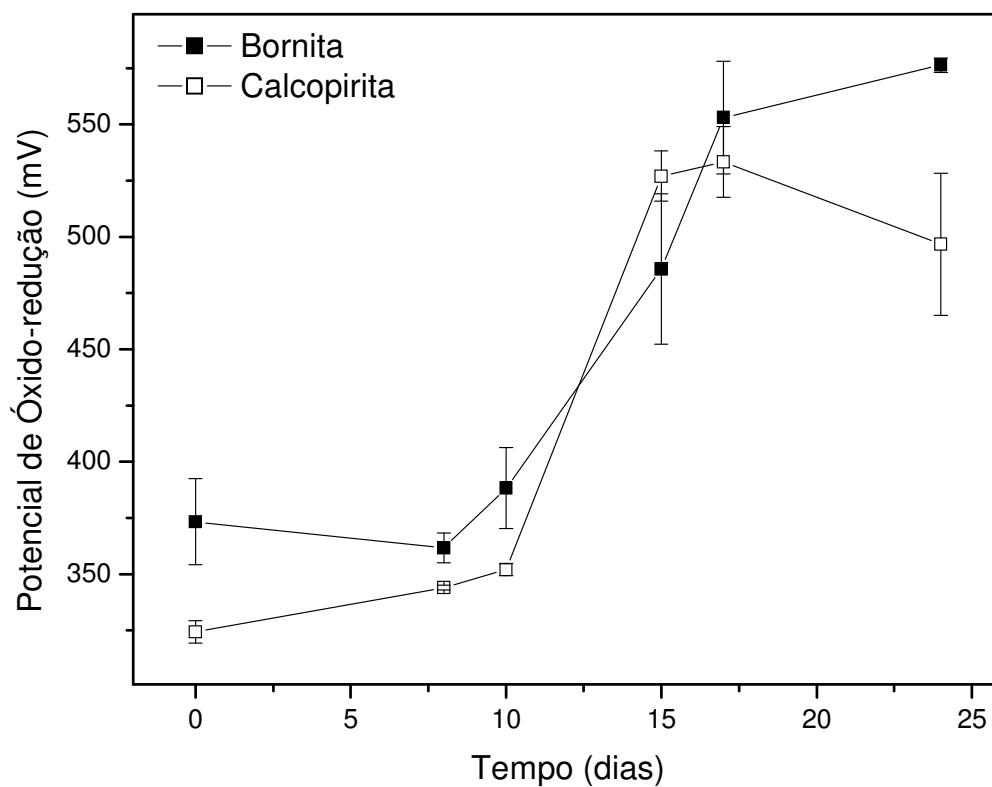


Figura 7. Variação do potencial de óxido-redução durante crescimento de *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita ou bornita [2,5% (m/v) de mineral em meio T&K sem íons Fe^{2+}]. Cada ponto representa a média aritmética e o desvio-padrão do potencial de óxido-redução de experimentos realizados em triplicata.

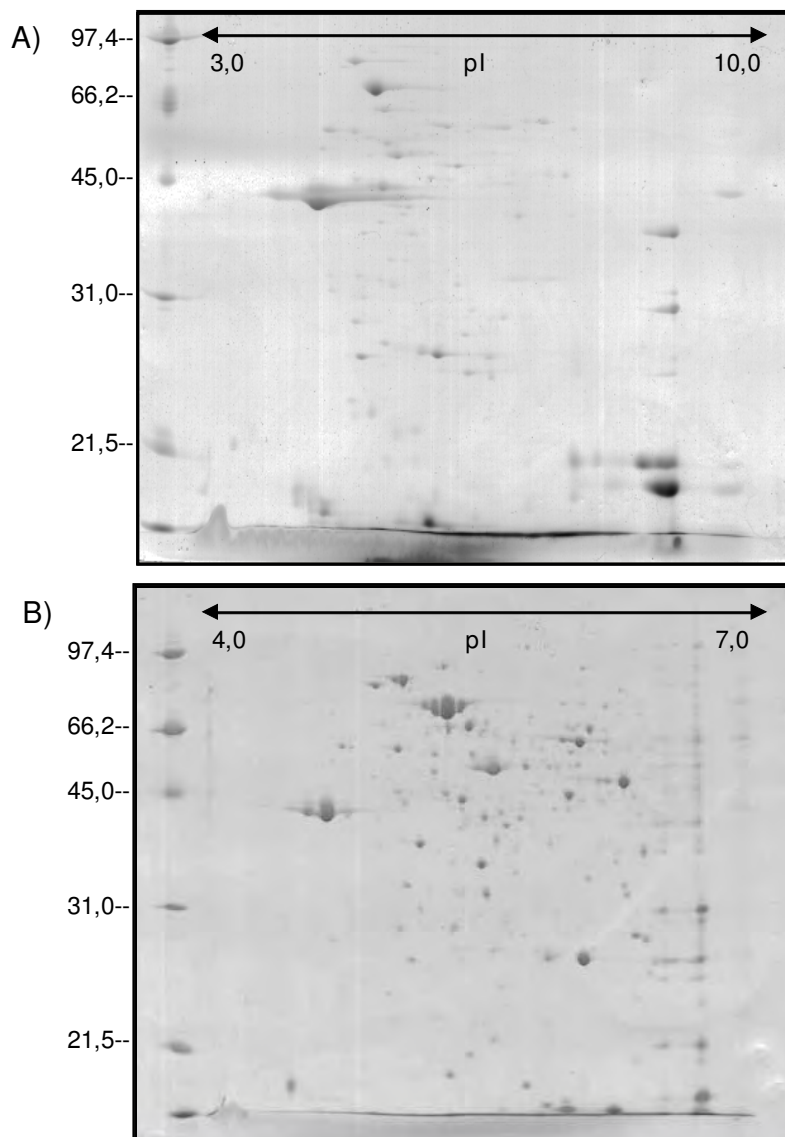


Figura 8. 2D-PAGE de proteínas totais de *A. ferrooxidans* LR para padronização da metodologia de extração das proteínas. As proteínas totais das células foram obtidas após lise celular por sonicação (A) ou após extração com fenol (B). Os números à esquerda representam padrões de massa molecular (kDa). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

I.2.2. Expressão protéica diferencial de células livres em resposta à calcopirita ou bornita

I.2.2.1. Experimentos preliminares de exposição bacteriana à calcopirita por 24, 72 ou 144 horas

Inicialmente fez-se uma análise preliminar dos perfis das proteínas totais de células de *A. ferrooxidans* em diferentes tempos de contato com a calcopirita, por 24, 72 ou 144 horas, comparativamente às células não expostas ao mineral. Algumas proteínas tiveram alteração na sua síntese em resposta à presença de calcopirita, como observado por SDS-PAGE (Figura 9).

Para a análise da expressão protéica diferencial de *A. ferrooxidans* LR em resposta aos minerais optou-se pelo menor tempo de exposição para o qual as alterações da expressão foram significativas (Figura 9). Adicionalmente ao tempo de 24 horas, optou-se também por avaliar a expressão protéica após 48 horas de exposição aos minerais.

I.2.2.2. Exposição bacteriana à bornita ou calcopirita por 24 ou 48 horas

Os experimentos de exposição das células aos minerais foram realizados no mínimo em triplicata. Após aquisição das imagens por meio do *ImageScanner*, os géis foram analisados utilizando-se o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0*, sendo a intensidade de cada *spot* quantificada em relação à intensidade total das proteínas no gel (% volume).

A reprodutibilidade dos experimentos a cada duas réplicas foi verificada por gráficos de dispersão relacionando o parâmetro % volume para a mesma proteína em cada gel (% volume vs. % volume). Os resultados são apresentados entre as réplicas para as três condições testadas: controle (Figura 10A), após exposição à bornita (Figura 10B) ou a calcopirita (Figura 10C) por 24 horas. Resultados similares foram obtidos após a exposição das células aos minerais por 48 horas (Figura 11). Somente as proteínas que foram típicas pela análise dos gráficos de dispersão (cuja regressão linear teve correlação maior que 0,9) foram consideradas para a análise estatística pelo *software*.

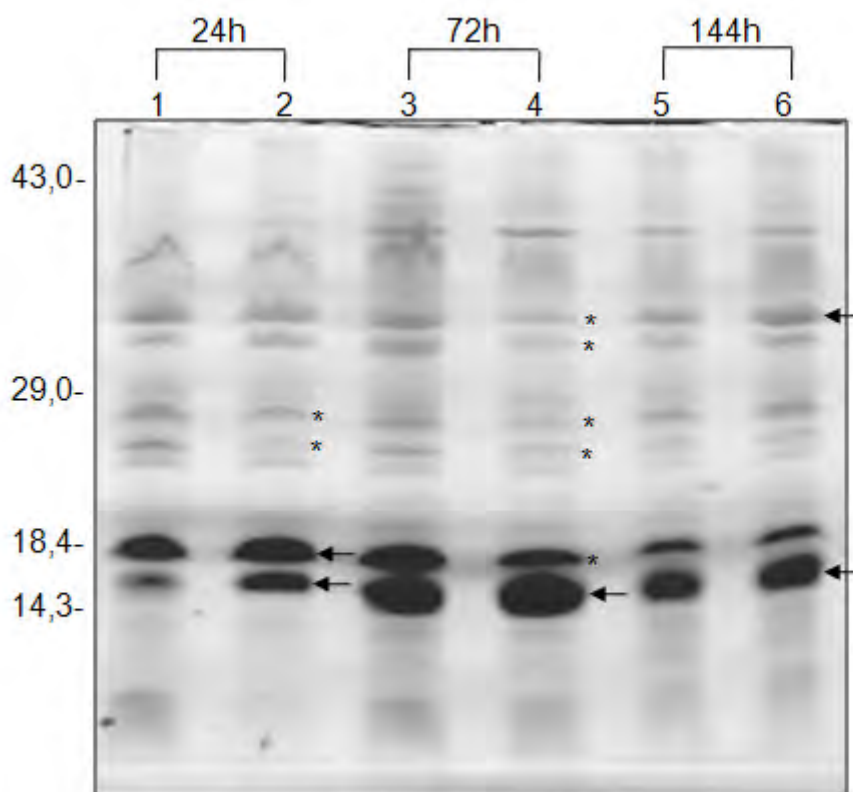


Figura 9. SDS-PAGE de proteínas totais (20 µg) de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempo. As células foram crescidas na presença de íons Fe^{2+} (meio T&K) e em seguida incubadas na ausência (1, 3, 5) ou na presença de 2,5% (m/v) de calcopirita (2, 4, 6) por 24, 72 ou 144 horas, sob agitação a 150 rpm. Setas e asteriscos indicam algumas das proteínas que tiveram sua síntese aumentada ou diminuída após exposição ao mineral, respectivamente, comparativamente ao controle correspondente (ausência de mineral). Os números à esquerda representam padrões de massa molecular (kDa). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

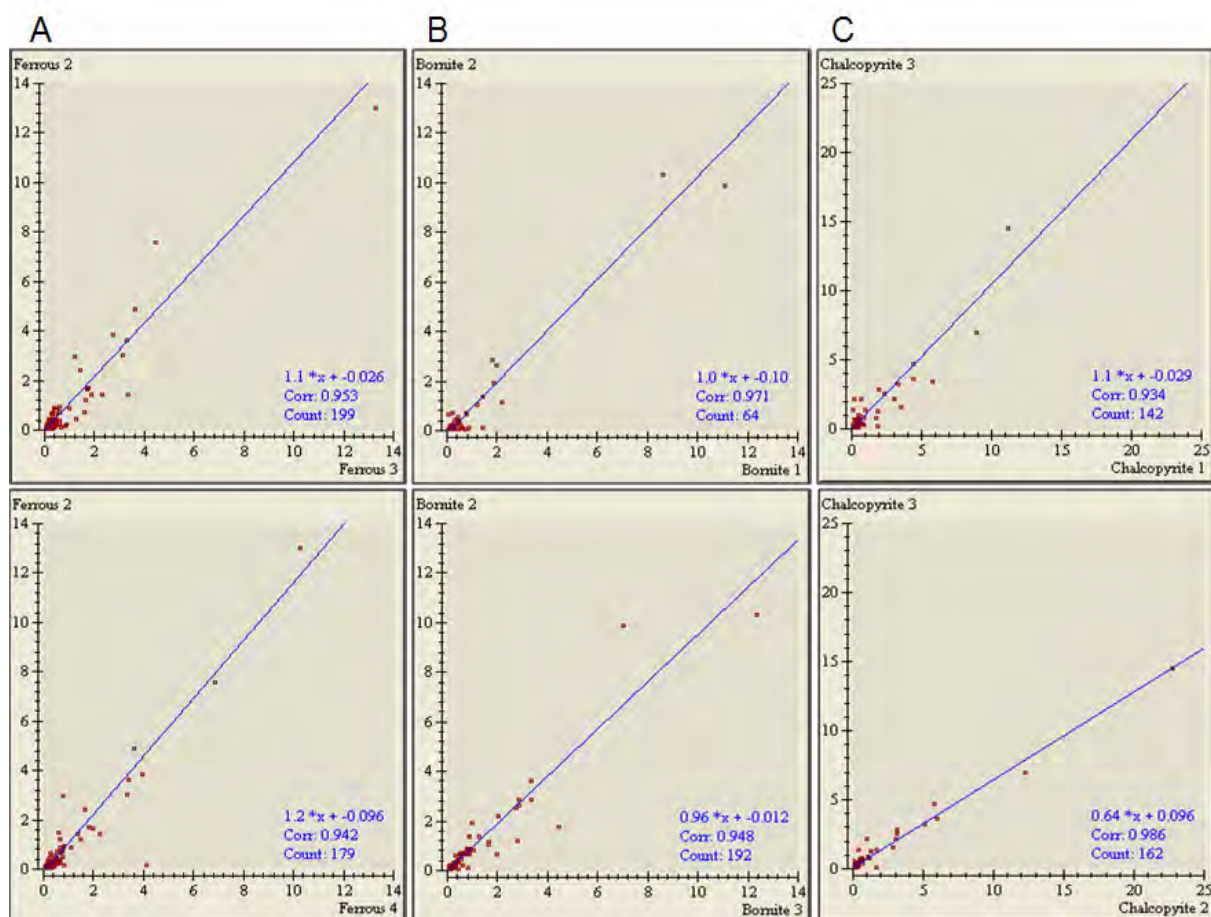


Figura 10. Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas totais de células de *A. ferrooxidans* após exposição aos minerais por 24 horas. Gráfico de dispersão (% volume vs. % volume de cada proteína) para cada dois géis, nas seguintes condições: controle (A), e após exposição à bornita (B) ou calcopirita (C) por 24 horas.

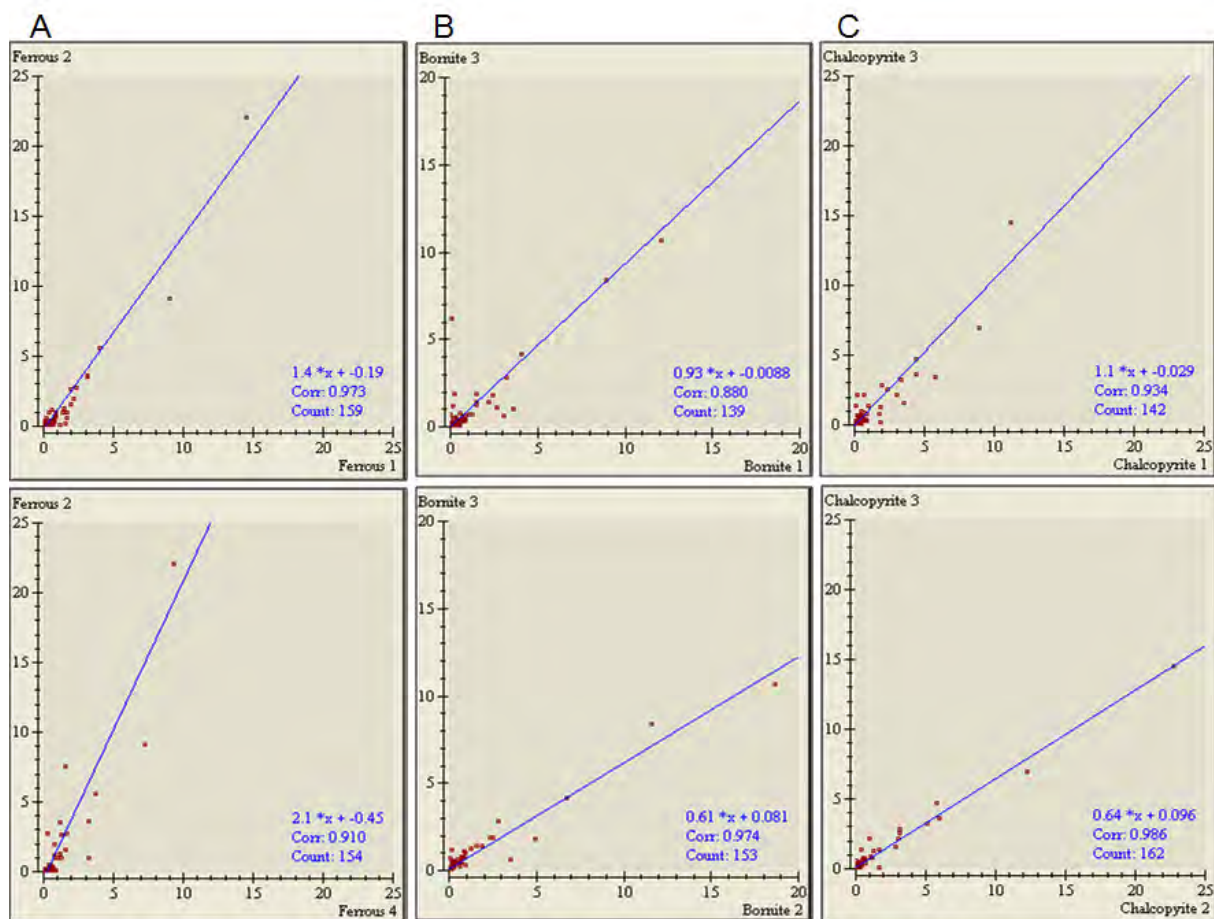


Figura 11. Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas totais de células de *A. ferrooxidans* após exposição aos minerais por 48 horas. Gráfico de dispersão (% volume vs. % volume de cada proteína) para cada dois géis, nas seguintes condições: controle (A), e após exposição à bornita (B) ou calcopirita (C) por 48 horas.

Alterações na intensidade (% volume) de proteínas típicas em bornita ou calcopirita (após exposição por 24 ou 48 horas) foram avaliadas pelo Teste T de *Student*, sendo que as alterações foram significativas apenas para bornita ($P < 0,05$).

A resposta de *A. ferrooxidans* LR aos sulfetos minerais foi analisada por 2D-PAGE pela comparação do perfil protéico total obtido de células não expostas aos minerais (controle) e de células expostas por 24 ou 48 horas à bornita ou calcopirita (Figuras 12 e 13, respectivamente). O perfil protéico após 24 horas (Figura 12) foi muito semelhante ao observado para as células expostas aos minerais por 48 horas. (Figura 13). Todas as proteínas com expressão diferencial significativa tiveram o valor de ponto isoelétrico (pI) entre 5 e 6,5, e a massa molecular (MM) variando de 20 kDa a 70 kDa (Figuras 12 e 13).

Experimentos prévios com células de *A. ferrooxidans* LR mostraram que a agitação realizada durante a exposição das células aos minerais (de 150 ou 250 rpm) não provocou por si só alteração significativa no perfil de proteínas totais. Células antes e após agitação em meio T&K (sem Fe^{2+} , sem calcopirita ou bornita) apresentaram o mesmo perfil por 2D-PAGE (resultados não mostrados).

A quantificação relativa (% volume) de proteínas que tiveram a sua expressão diferencial significativa em bornita (após exposição por 24 ou 48 horas) e os desvios-padrão entre as triplicatas são apresentados na Figura 14. Essas proteínas foram isoladas do gel e digeridas com tripsina para análise por espectrometria de massas.

Os espectros obtidos por espectrometria de massas foram submetidos à pesquisa no banco de proteínas anotadas a partir do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, utilizando-se o programa MASCOT (Tabela 4). O Anexo B (p. 174) mostra os peptídeos trípticos de cada proteína de *A. ferrooxidans* LR analisada por espectrometria de massas e a sequência da proteína correspondente no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Os valores de massa molecular das proteínas de *A. ferrooxidans* LR (deduzidas pelo gel 2D, Figura 14) em geral correspondeu ao tamanho predito para a proteína no banco de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Somente para algumas proteínas (de número 4, 7, 8 e 9) a massa molecular foi de aproximadamente 5 a 10 kDa menor (Tabela 4) do que o valor estimado do gel (Figura 14).

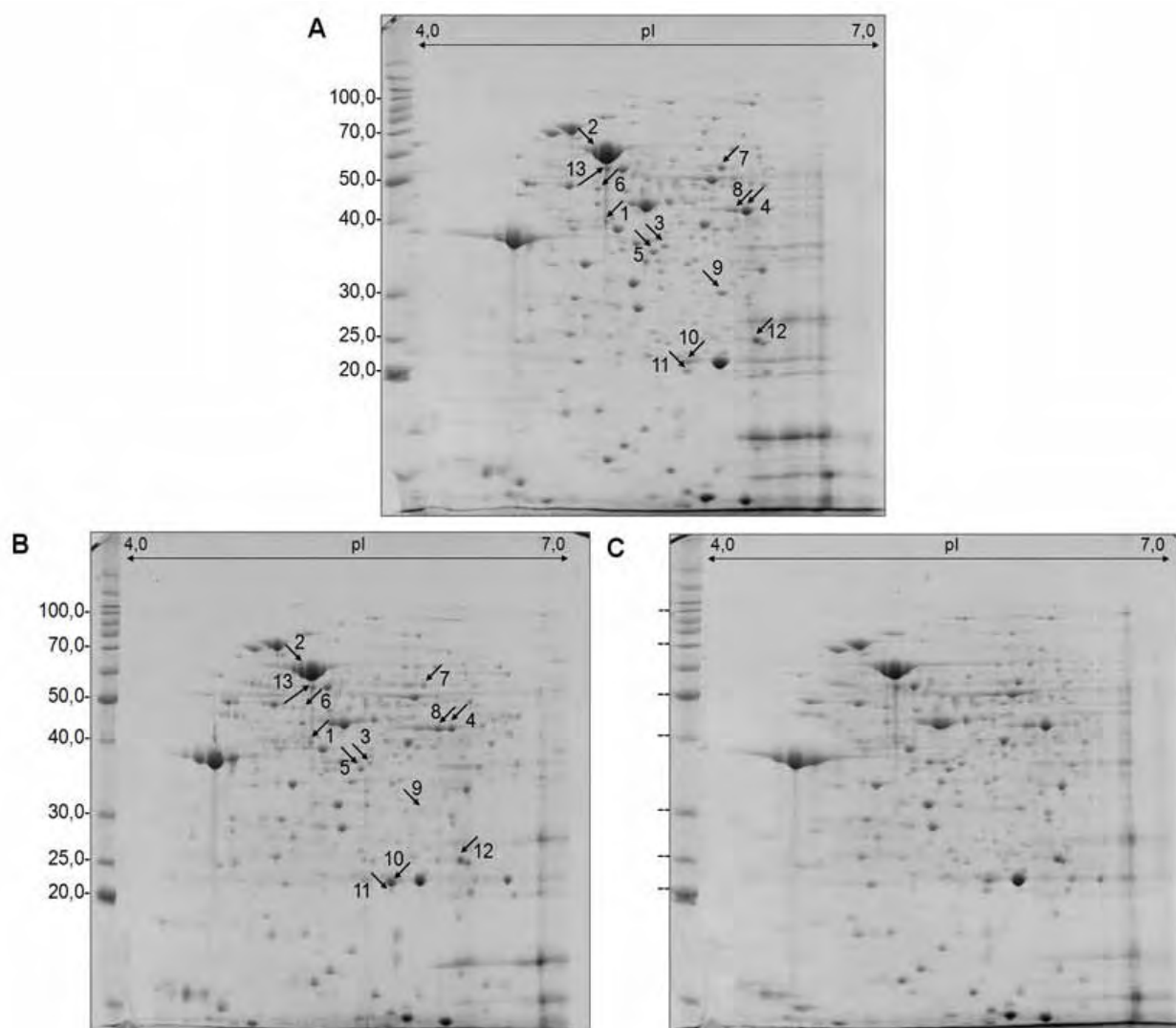


Figura 12. 2D-PAGE de proteínas totais (250 µg) de *A. ferrooxidans* LR após exposição aos sulfetos minerais por 24 horas. As proteínas foram extraídas de células não expostas aos minerais (A) e após exposição a 2,5% (m/v) de bornita (B) ou 2,5% (m/v) de calcopirita (C) por 24 horas. Setas representam proteínas que induziram ou reprimiram após exposição à bornita (B), comparativamente ao controle (A) e que foram validadas pelo Teste T de *Student* ($P < 0,05$). Proteínas diferencialmente expressas após exposição à calcopirita não foram validadas pela análise estatística, não sendo assinaladas no gel (C). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo dos géis. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-250.

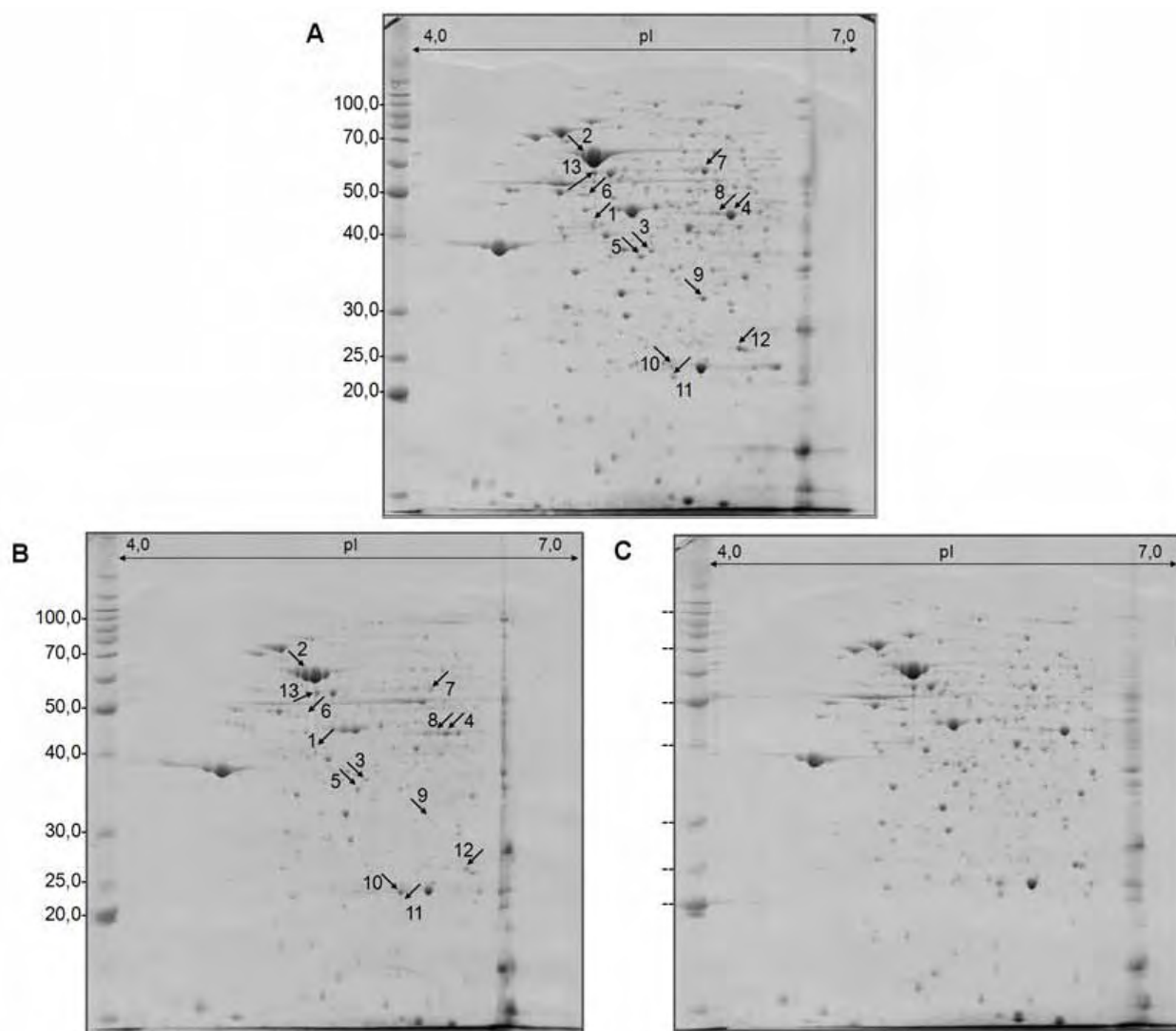


Figura 13. 2D-PAGE de proteínas totais (250 μ g) de *A. ferrooxidans* LR após exposição aos sulfetos minerais por 48 horas. As proteínas foram extraídas de células não expostas aos minerais (A) e após exposição a 2,5% (m/v) de bornita (B) ou 2,5% (m/v) de calcopirita (C) por 48 horas. Setas representam proteínas que induziram ou reprimiram após exposição à bornita (B), comparativamente ao controle (A) e que foram validadas pelo Teste T de *Student* ($P < 0,05$). Proteínas diferencialmente expressas após exposição à calcopirita não foram validadas pela análise estatística, não sendo assinaladas no gel (C). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo dos géis. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

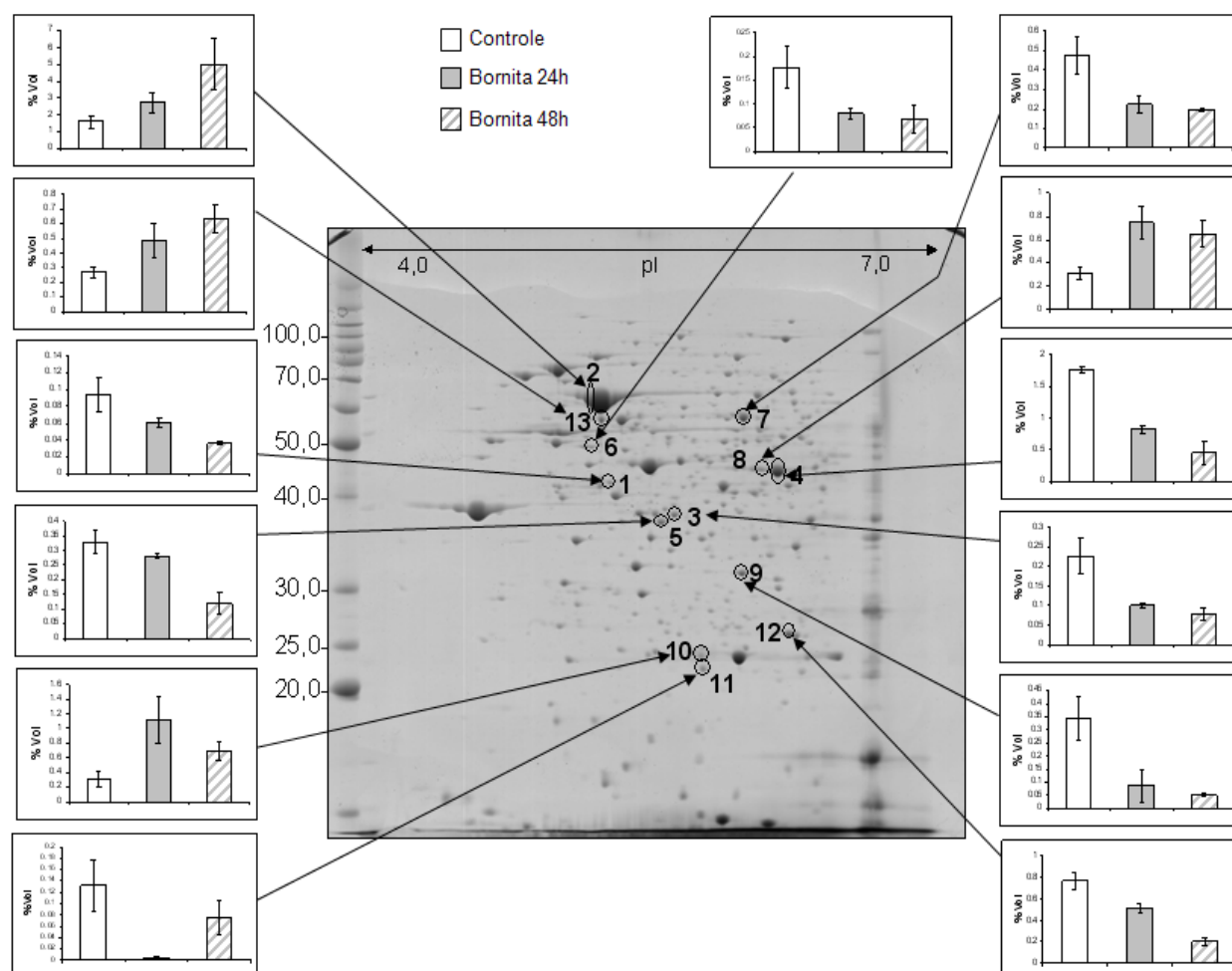


Figura 14. Quantificação relativa (% volume) de proteínas diferencialmente expressas por *A. ferrooxidans* LR em resposta à bornita após separação do extrato protéico total (250 µg) por 2D-PAGE. Círculos representam proteínas que foram significativamente diferenciais ($P < 0,05$ pelo Teste T de *Student*) entre células controle e células após exposição à bornita. Histogramas representam a média do volume (expresso como % volume) e os respectivos desvios-padrão entre as triplicatas para cada proteína diferencialmente expressa antes da exposição ao mineral (controle) e após a exposição à bornita por 24 ou 48 horas. Os números associados com as proteínas também denotam a sua identidade na Tabela 4.

Tabela 4. Proteínas diferencialmente expressas em *A. ferrooxidans* LR após exposição à bornita ou calcopirita.

Nº Proteína	Nº Acesso	Função celular (TIGR-CMR)	Expressão relativa	MM / pI	Score	Matched peptide	Sequence Coverage %		
		¹³	Bornita 24h / 48h	Teórico	⁷	⁸	⁹		
1	AFE_0559	Função desconhecida: enzimas de especificidade desconhecida	- / -	SA	Proteína de domínio radical SAM	43.818 / 5,17	261	18	63
2	AFE_2496	Direcionamento de proteínas: enovelamento protéico e estabilização	+ / +	SA	Chaperonina (groEL)	58.651 / 5,20	817	28	68
3	AFE_2837	Metabolismo energético: glicólise/ gliconeogênese	- / -	SA	Frutose-1-6-bifosfatase (fbp)	37.347 / 5,50	589	15	64
4	AFE_3085	Metabolismo energético: glicólise/ gliconeogênese	- / -	SA	Frutose-bifosfato aldolase classe II (fba)	38.594 / 5,76	673	18	67
5	AFE_2508	Metabolismo energético: açúcar	- / -	SA	Carboidrato quinase (PfkB)	34.735 / 5,41	666	14	60
6	AFE_0358	Direcionamento de proteínas: enovelamento protéico e estabilização	- / -	SA	Proteína HslU, subunidade ATPase da proteína de choque térmico HslVU,	48.834 / 5,14	202	14	35
7	AFE_0942	Metabolismo energético: quimioautotrofismo	- / -	SA	Ribulose bifosfato carboxilase subunidade maior 2 (cbbL2)	50.522 / 5,69	191	13	32
8	AFE_3085	Metabolismo energético: glicólise/ gliconeogênese	+ / +	SA	Frutose-bifosfato aldolase classe II (fba)	38.594 / 5,76	412	16	61
9	AFE_1640	Proteína ribossomal: síntese e modificação	- / -	SA	Ribossomal S2 (rpsB)	28.117 / 5,71	290	9	53
10	AFE_2062	Processo celular: detoxificação	+ / +	SA	Antioxidante, AhpC/Tsa	22.534 / 5,69	268	9	59
11	-	-	- / -	SA	Sem identificação	-	-	-	-
12	AFE_0952	Proteína ribossomal: síntese e modificação	- / -	SA	Ribossomal L25 (rplY)	22.238 / 5,86	302	11	55
13	AFE_0965	Metabolismo energético: fermentação	+ / +	SA	Aldeído desidrogenase (NAD)	55.781 / 5,13	230	18	50

¹¹ Definido de acordo com a posição das proteínas no gel de 2D (nº correspondente ao da Figura 14);¹² Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (TIGR-CMR, <http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>);¹³ Função predita por TIGR-CMR;¹⁴ Expressão de proteínas após a exposição ao mineral por 24 ou 48 horas relativamente ao controle (ausência de minerais). +: síntese induzida, -: síntese reprimida, SA: sem alteração significativa (P>0,05 pelo Teste T de Student);¹⁵ Nome de cada proteína que foi identificada por comparação com o banco de proteínas anotadas a partir do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270;¹⁶ MM: massa molecular teórica em Da. pI: ponto isoeletrico teórico;¹⁷ Referente ao programa MASCOT derivado da pesquisa de espectrometria de massas;¹⁸ Número de peptídeos que apresentam correspondência com a sequência da proteína identificada (nº de peptídeos observados);¹⁹ Porcentagem de aminoácidos encontrados experimentalmente em relação ao total de aminoácidos da proteína anotada.

A proteína de número 11 não foi identificada pela pesquisa em bancos de dados e teve sua síntese reprimida por bornita, principalmente depois de 24 horas de exposição (Figura 14). Mesmo com a alta qualidade dos espectros MS/MS, a identificação dessa proteína não foi possível utilizando-se o banco de proteínas anotadas da linhagem *A. ferrooxidans* ATCC 23270 ou banco de outros organismos (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>), provavelmente porque essa proteína deve ser específica da linhagem em estudo (LR). Conseqüentemente a função dessa proteína não pode ser inferida por pesquisa em banco de dados.

Das treze proteínas diferencialmente expressas, quatro tiveram a síntese induzida após exposição à bornita por 24 ou 48 horas, sendo essas: chaperonina (groEL) (proteína 2), frutose-bifosfato aldolase (proteína 8), antioxidante da família AhpC/Tsa (proteína 10) e aldeído desidrogenase (NAD) (proteína 13). As demais proteínas tiveram a síntese reprimida após exposição à bornita por 24 ou 48 horas em comparação ao controle (Tabela 4).

Todas as proteínas diferencialmente expressas na presença de bornita apresentaram o mesmo padrão de alteração (em relação ao controle) quando comparados os tempos de exposição de 24 ou de 48 horas (Tabela 4). Em geral, a alteração observada na síntese de proteínas após 24 horas de exposição ao mineral foi mantida ou intensificada após 48 horas de exposição, principalmente para proteínas reprimidas (Figuras 14 e 15). Aproximadamente metade das proteínas diferencialmente expressas em resposta à bornita está relacionada ao metabolismo energético em *A. ferrooxidans* (Tabela 4).

A predição da localização celular de proteínas diferencialmente expressas foi realizada utilizando-se os programas *PSORT Prediction* (<http://psort.hgc.jp/form.html>) e *Signalp 3.0 Server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), o que revelou que todas essas proteínas não são secretadas e estão provavelmente localizadas no citoplasma ou na membrana interna da bactéria (Tabela 5).

Tabela 5. Localização celular predita de proteínas diferencialmente expressas em células de *A. ferrooxidans* LR expostas à bornita.

Nº proteína ^{*1}	Nº Acesso ^{*2}	Descrição protéica ^{*3}	Localização celular predita por <i>PSORT Prediction</i> / <i>Signalp 3.0 Server</i> ^{*4}
1	AFE_0559	Proteína de domínio radical SAM	Citoplasma / Não secretada
2	AFE_2496	Chaperonina (groEL)	Citoplasma / Não secretada
3	AFE_2837	Frutose-1-6-bifosfatase (fbp)	Membrana interna / Não secretada
4	AFE_3085	Frutose-bifosfato aldolase classe II (fba)	Citoplasma / Não secretada
5	AFE_2508	Carboidrato quinase (PfkB)	Membrana interna / Não secretada
6	AFE_0358	Proteína HslU, subunidade ATPase da proteína de choque térmico HslVU,	Citoplasma / Não secretada
7	AFE_0942	Ribulose bifosfato carboxilase subunidade maior 2 (cbbL2)	Citoplasma / Não secretada
8	AFE_3085	Frutose-bifosfato aldolase classe II (fba)	Citoplasma / Não secretada
9	AFE_1640	Ribossomal S2(rpsB)	Membrana interna / Não secretada
10	AFE_2062	Antioxidante, AhpC/Tsa	Citoplasma / Não secretada
11	-	Sem identificação	-
12	AFE_0952	Ribossomal L25 (rplY)	Citoplasma / Não secretada
13	AFE_0965	Aldeído desidrogenase (NAD)	Membrana interna / Não secretada

^{*1} Definido de acordo com a posição das proteínas no gel de 2D (nº correspondente ao da Figura 14);

^{*2} Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270;

^{*3} Nome de cada proteína que foi identificada por comparação com o banco de proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270;

^{*4} Predição da localização celular das proteínas identificadas por *PSORT Prediction* e *Signalp 3.0 Server*.

I.2.3. Expressão protéica diferencial de células aderidas à calcopirita

Experimentos foram realizados para padronizar a metodologia de obtenção de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita, a fim de se obter quantidade suficiente de células, o que é altamente desejável para a análise proteômica diferencial de frações celulares (por exemplo, periplasmática).

A Figura 16 mostra o perfil de proteínas totais de células aderidas à calcopirita obtidas após tratamento do mineral com Triton X-100 0,05% (v/v) ou DTT 5 mmol L⁻¹. Ambos os tipos de estratégia para obtenção de células aderidas apresentaram o efeito desejado e independentemente do método utilizado, os perfis foram bastante similares, sendo o tratamento com Triton X-100 0,05% (v/v) escolhido para obtenção de células aderidas à calcopirita.

O perfil de proteínas totais de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita por 24 horas foi analisado por SDS-PAGE, comparativamente às células-controle e às células não aderidas ao mineral (Figura 17). Devido ao fato de no extrato total praticamente não ter sido detectada expressão protéica diferencial visível por SDS-PAGE, a fração periplasmática foi isolada e analisada por essa mesma técnica.

Proteínas da fração periplasmática foram obtidas de células-controle, células não aderidas e aderidas após exposição à calcopirita por 24 horas, sendo que esses resultados preliminares mostraram principalmente indução de algumas proteínas em células aderidas, em comparação ao controle e às células não aderidas (Figura 18).

Uma análise do tipo *time course* foi realizada para verificar as alterações nos perfis de proteínas periplasmáticas de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita em intervalos de tempos variáveis de até 24 horas. Essa análise foi realizada sob agitação lenta (60 rpm) para facilitar a adesão nos primeiros momentos de exposição à calcopirita. Para essa análise, realizou-se nova padronização da extração de proteínas periplasmáticas a fim de se obter uma maior quantidade de proteínas dessa fração.

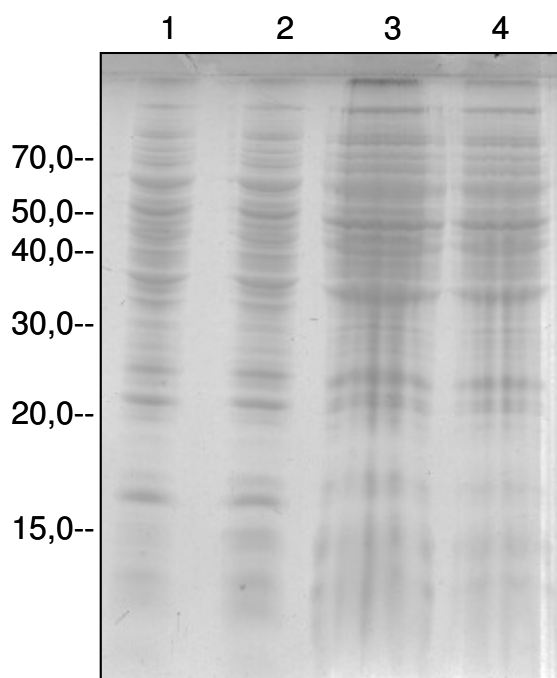


Figura 16. SDS-PAGE de proteínas totais de células *A. ferrooxidans* LR para padronização da metodologia de obtenção de células aderidas à calcopirita. As proteínas totais (20 µg) de *A. ferrooxidans* LR foram obtidas de células-controle não expostas ao mineral (1), de células não aderidas (2) e de células aderidas à calcopirita após exposição por 24 horas (3 e 4). As células aderidas foram retiradas do mineral por tratamento com Triton X-100 0,05% (v/v) (3) ou com DTT 5 mmol L⁻¹ (4). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

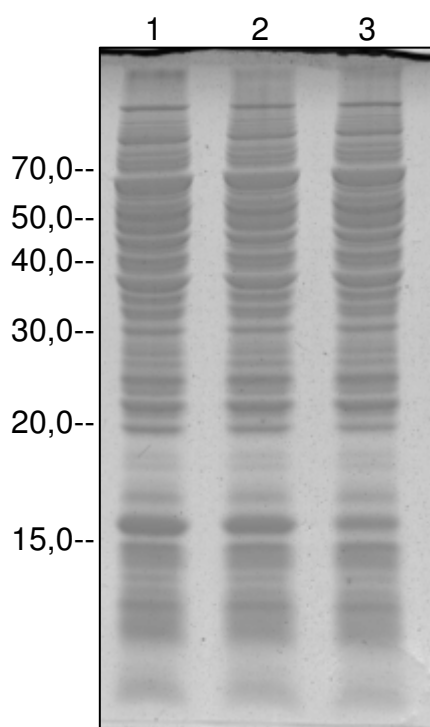


Figura 17. SDS-PAGE de proteínas totais (20 µg) de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas e não aderidas à calcopirita após exposição por 24 horas. Proteínas totais de células-controle (1), não aderidas (2) e aderidas à calcopirita (3) foram obtidas após exposição por 24 horas. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

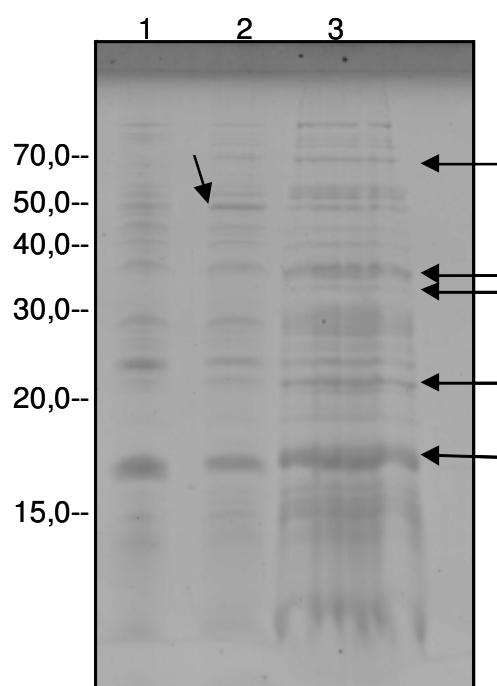


Figura 18. SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 µg) de células de *A. ferrooxidans* LR aderidas e não aderidas à calcopirita após exposição por 24 horas. Proteínas periplasmáticas de células-controle (1), não aderidas (2) e aderidas à calcopirita (3) foram obtidas após exposição por 24 horas, sem agitação. Setas indicam algumas das proteínas que tiveram a síntese induzida em células não aderidas e aderidas à calcopirita, em comparação ao controle. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

A Figura 19 mostra o perfil protéico obtido pelos métodos descrito por Van der Westen, Mayhew e Veeger (1978) e Ames, Prody e Kustu (1984), sendo que a segunda utiliza clorofórmio e permitiu obter aproximadamente o dobro de proteínas periplasmáticas (resultados não mostrados), e foi portanto utilizada para as extrações.

As Figuras 20 e 21 mostram o perfil de proteínas periplasmáticas (Figura 20) e de esferoplastos (Figura 21) de células-controle (não expostas ao mineral), de células não aderidas e de células aderidas à calcopirita após exposição sob agitação de 60 rpm, por diferentes intervalos de tempo. Essa análise preliminar mostra diferenças entre proteínas periplasmáticas de células-controle, aderidas e não aderidas ao mineral, e entre os tempos de contato. Induções e repressões são evidentes já no menor intervalo de tempo testado, ou seja, após 2 horas de exposição à calcopirita, momento em que o perfil protéico das células não aderidas aparentemente não evidencia ainda alterações significativas. As diferenças foram menos evidentes na síntese de proteínas de esferoplastos (Figura 21).

Proteínas periplasmáticas foram extraídas de células não aderidas e aderidas à calcopirita após exposição por 2 horas sob agitação a 60 rpm e separadas por 2D-PAGE (pH 3-10). A análise das proteínas periplasmáticas foi realizada em duplicata, sendo que para cada uma delas três experimentos de exposição à calcopirita por 2 horas foram realizados de maneira independente. Cada réplica, portanto, consistiu de um *pool* de proteínas oriundas de três experimentos independentes, com o objetivo de garantir quantidade de proteínas suficiente para a separação por eletroforese 2D.

Os géis de 2D foram analisados utilizando-se o *software ImageMaster™ 2D Platinum 6.0*, sendo a intensidade de cada *spot* quantificada em relação à intensidade total das proteínas no gel (% volume). A reprodutibilidade entre as réplicas foi verificada por gráficos de dispersão relacionando o parâmetro de % volume (% volume vs. % volume) (Figura 22), para células não aderidas (Figura 22A) e aderidas (Figura 22B) à calcopirita. Somente as proteínas que foram típicas pelas análises dos gráficos de dispersão (correlação > 0,9) foram consideradas para a análise estatística pelo *software*.

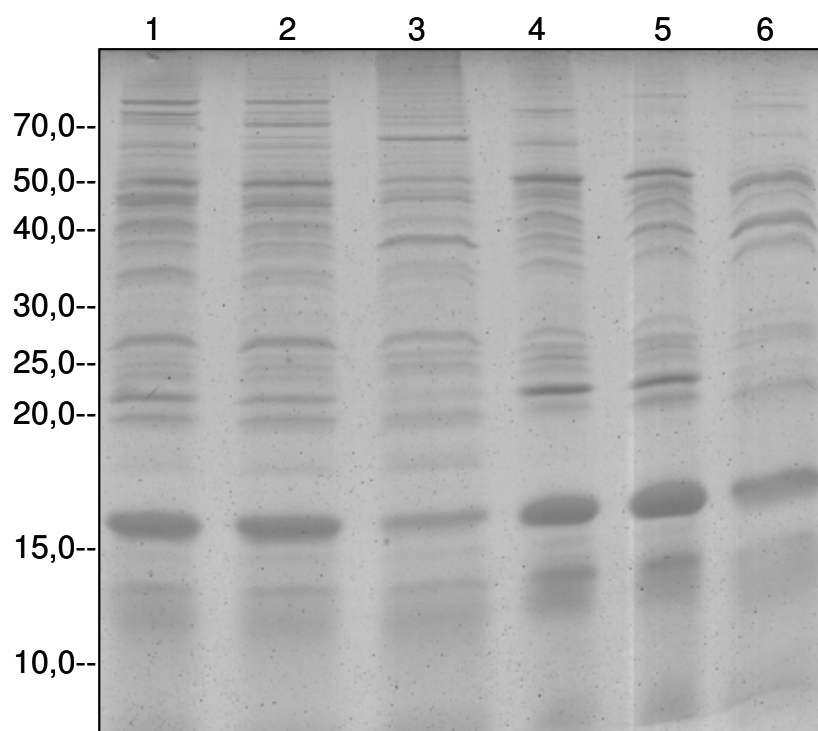


Figura 19. SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 μ g) de *A. ferrooxidans* LR para padronização da metodologia de extração de proteínas. Células-controle (1 e 4), não aderidas (2 e 5) e aderidas à calcopirita (3 e 6) após exposição por 6 horas a 60 rpm. As proteínas de periplasma foram extraídas segundo o método descrito por Van der Westen, Mayhew e Veeger (1978) (1 a 3) e por Ames, Prody e Kustu (1984) (4 a 6). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

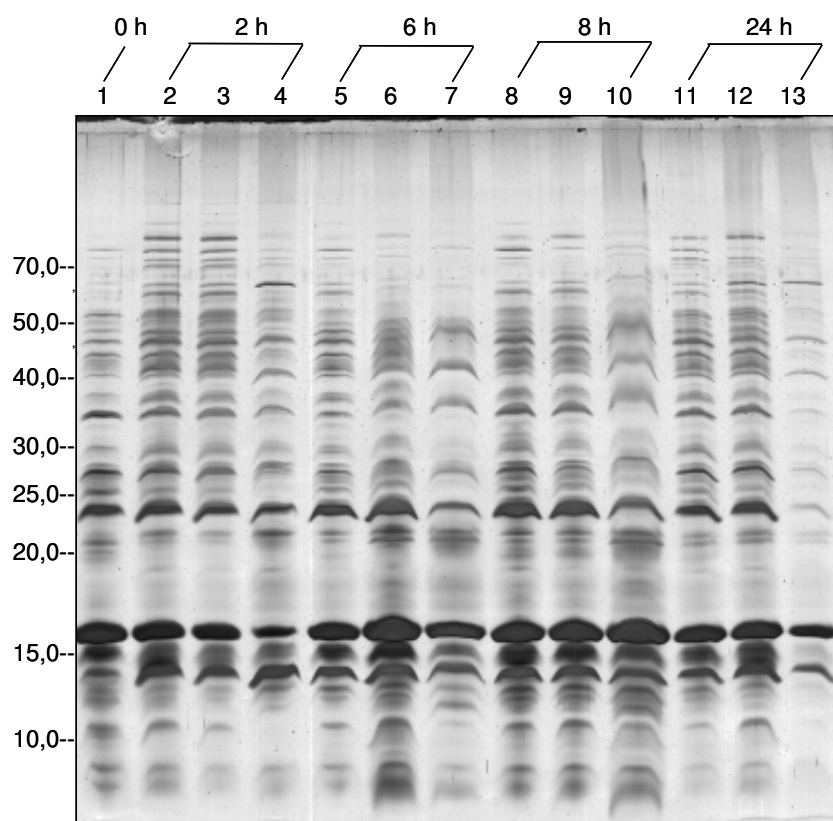


Figura 20. SDS-PAGE de proteínas de periplasma (3 μ g) de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempo. Células-controle no tempo inicial (1); células-controle na ausência de mineral que permaneceram sob agitação para os respectivos intervalos de tempo (2, 5, 8, 11); não aderidas (3, 6, 9, 12) e aderidas à calcopirita (4, 7, 10, 13) após exposição a 60 rpm em diferentes intervalos de tempo (2, 6, 8 e 24 horas). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com nitrato de prata.

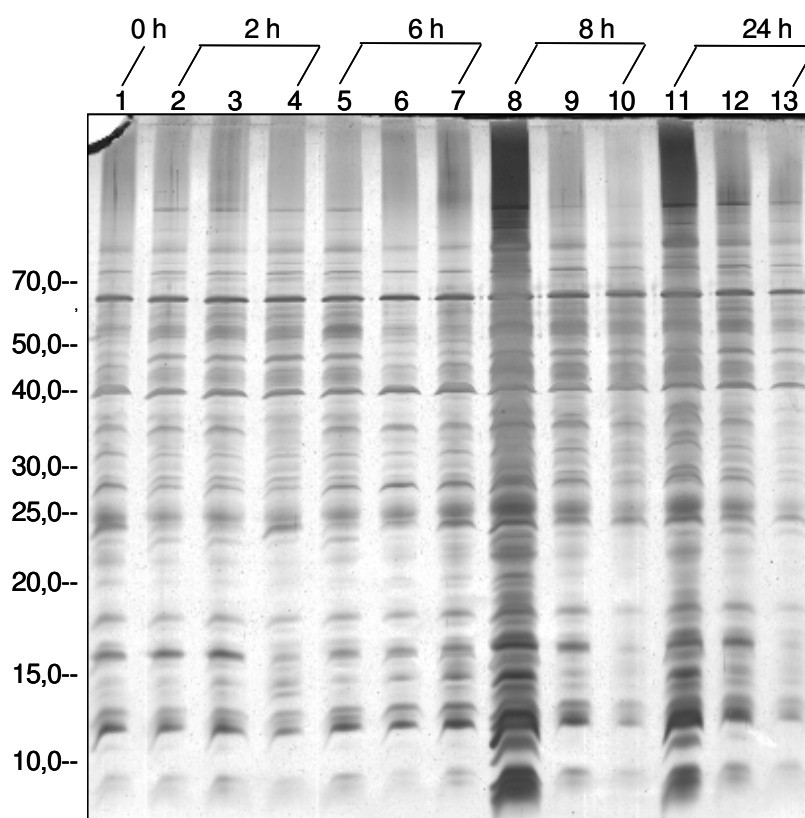


Figura 21. SDS-PAGE de proteínas de esferoplastos (3 μ g) de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita em diferentes intervalos de tempo. Células-controle no tempo inicial (1); células-controle na ausência de mineral que permaneceram sob agitação para os respectivos intervalos de tempo (2, 5, 8, 11); não aderidas (3, 6, 9, 12) e aderidas à calcopirita (4, 7, 10, 13) após exposição a 60 rpm em diferentes intervalos de tempo (2, 6, 8 e 24 horas). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel. O gel foi corado com nitrato de prata.

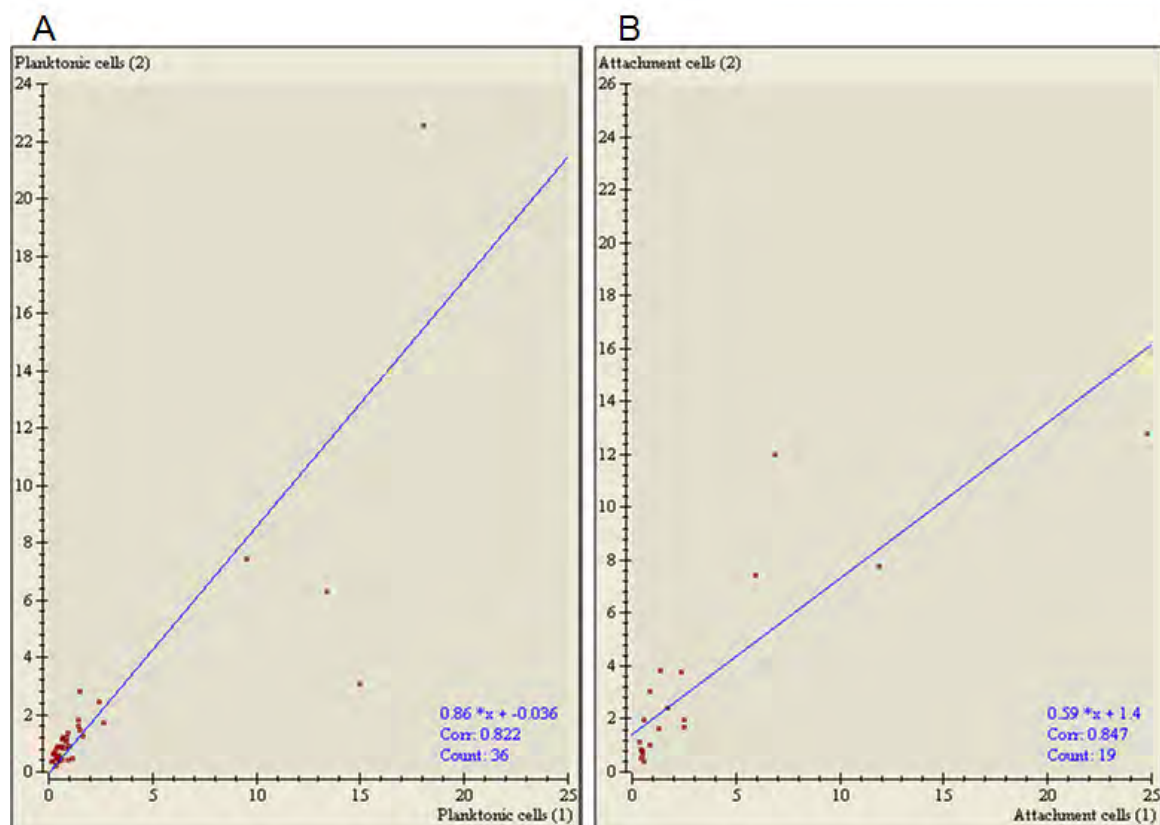


Figura 22. Gráfico de dispersão entre duplicatas de géis 2D-PAGE de proteínas periplasmáticas de células de *A. ferrooxidans* após exposição à calcopirita por 2 horas. Gráfico de dispersão (% volume vs. % volume de cada proteína) dos géis nas seguintes condições: células livres (A) e aderidas após exposição à calcopirita (B) por 2 horas.

A Figura 23 mostra o perfil de proteínas periplasmáticas de células não aderidas (Figura 23A) e aderidas à calcopirita (Figura 23B) após exposição ao mineral por 2 horas. Alterações na intensidade (% volume) de proteínas típicas em células aderidas à calcopirita, em relação às células não aderidas (após exposição por 2 horas) foram avaliadas pelo Teste T de *Student*.

A quantificação relativa (% volume) de proteínas que tiveram expressão diferencial significativa, os desvios-padrão entre as duplicatas e o 2D-PAGE em detalhe das proteínas periplasmáticas diferencialmente expressas após exposição à calcopirita por 2 horas são apresentados na Figura 24. Essas proteínas foram isoladas do gel e digeridas com tripsina para análise por espectrometria de massas.

Os espectros obtidos por espectrometria de massas foram submetidos à pesquisa no banco de proteínas anotadas a partir do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, utilizando-se o programa MASCOT (Tabela 6). O Anexo C (p. 186) mostra os peptídeos trípticos de cada proteína de *A. ferrooxidans* LR analisada por espectrometria de massas e a sequência da proteína correspondente no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Foram detectadas quatro proteínas periplasmáticas que apresentaram alterações significativas na sua síntese em células aderidas à calcopirita, relativamente às células não aderidas (Tabela 6). Para a identificação por espectrometria de massas, as proteínas de número 1 e 2 foram isoladas de um gel obtido a partir de células não aderidas, enquanto as proteínas de número 3 e 4 foram isoladas das duas réplicas de géis obtidos de células aderidas.

Das quatro proteínas diferencialmente expressas, duas tiveram a síntese reprimida, sendo ambas identificadas como superóxido dismutase, e duas tiveram a síntese induzida após exposição ao mineral, uma proteína que liga simples fita de DNA (*single strand binding, SSB*) e a proteína *PspA/IM30* (Tabela 6). Outros experimentos deveriam ser repetidos para obtenção de células aderidas em maior quantidade a fim de que os géis 2D possam apresentar maior número de proteínas periplasmáticas.

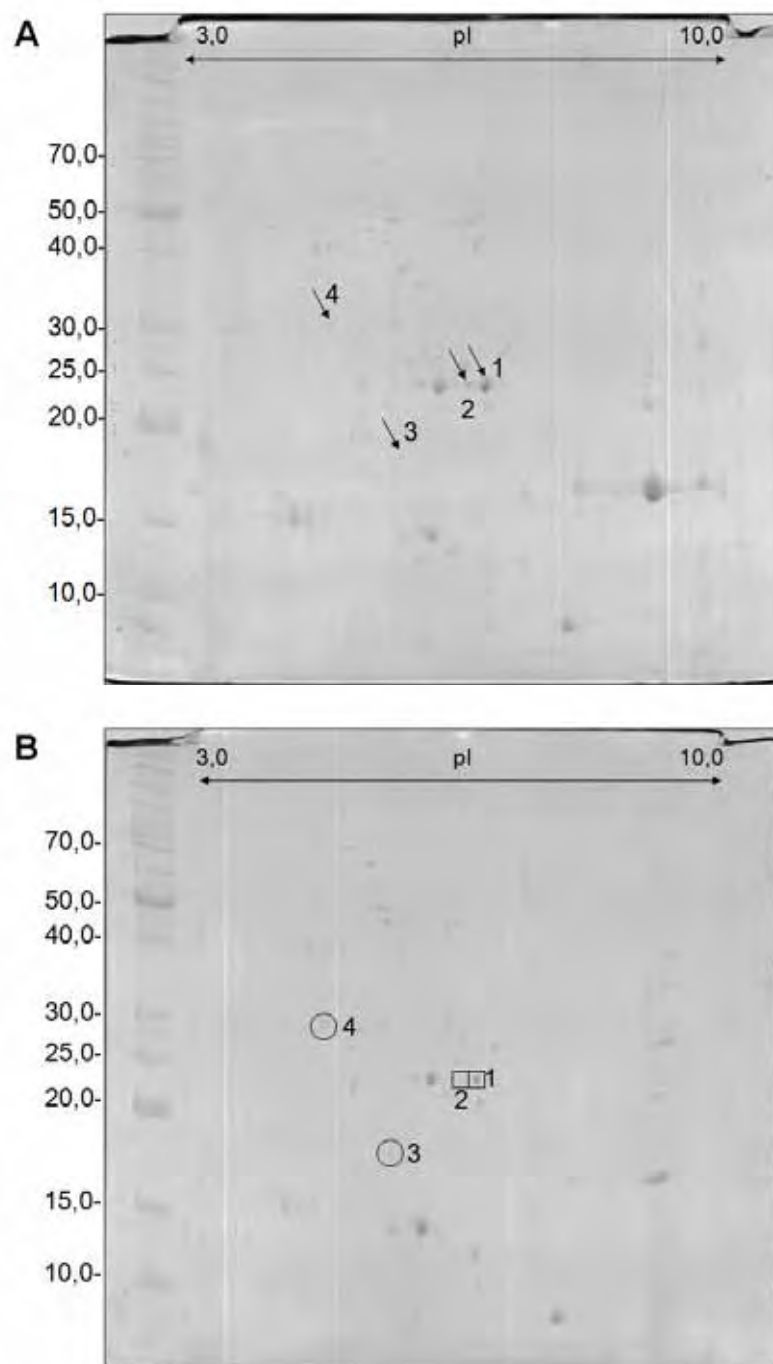


Figura 23. 2D-PAGE de proteínas de periplasma (30 μ g) de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita por 2 horas. As proteínas foram extraídas de células não aderidas (A) e aderidas à calcopirita (B) após exposição por 2 horas sob agitação a 60 rpm. Setas em (A) representam proteínas que tiveram a síntese diferencialmente expressa entre células não aderidas e aderidas. Círculos e quadrados representam proteínas que foram induzidas ou reprimidas, respectivamente, em células aderidas (B) após exposição à calcopirita, comparativamente ao controle (A). O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo dos géis. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

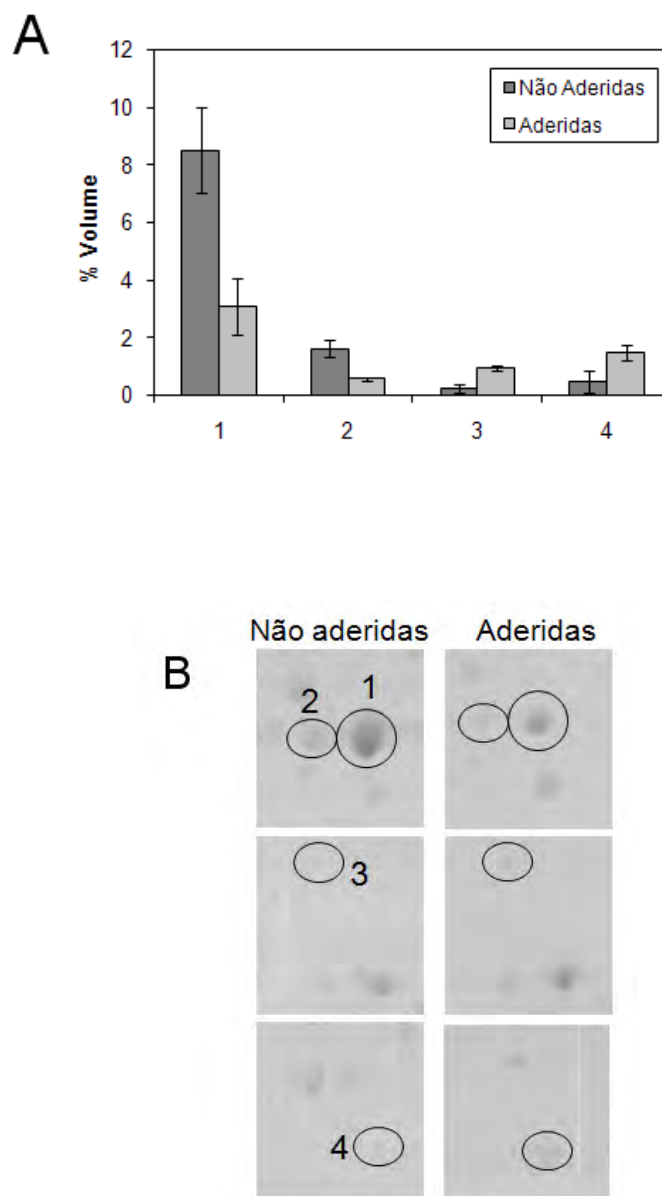


Figura 24. Quantificação relativa (% volume) de proteínas diferencialmente expressas por células de *A. ferrooxidans* LR aderidas e não aderidas à calcopirita (2 horas de exposição) após separação do extrato periplasmático por 2D-PAGE. Histogramas representam a média do volume (expresso como % volume) e os respectivos desvios-padrão entre a duplicata para cada proteína diferencialmente expressa entre células aderidas e não aderidas à calcopirita (A). 2D-PAGE em detalhe de proteínas diferencialmente expressas após exposição ao mineral (B). Os números associados com as proteínas também denotam sua identidade na Tabela 6.

Tabela 6. Proteínas periplasmáticas diferencialmente expressas em células de *A. ferrooxidans* LR aderidas à calcopirita por 2 horas.

Nº Proteína ¹	Nº Acesso ²	Função celular (<i>TIGR-CMR</i>) ³	Expressão relativa às células não aderidas ⁴	Descrição proteica ⁵	MM / pI ⁶ Teórico	Score ⁷	Matched peptide ⁸	Sequence Coverage % ⁹
1	AFE_1188	Processo celular: detoxificação	-	Superóxido dismutase	22.934 / 6,05	271	4	20
2	AFE_1188	Processo celular: detoxificação	-	Superóxido dismutase	22.934 / 6,05	154	2	15
3	AFE_0263	Metabolismo do DNA: replicação, recombinação e reparo	+	Proteína que liga simples fita de DNA (SSB-1)	16.910 / 5.31	189	3	22
4	AFE_1077	Processo celular: adaptação a condições atípicas	+	PspA/IM30	26.454 / 4.87	103	2	8

¹ Definido de acordo com a posição das proteínas no gel de 2D (nº correspondente a Figura 23);

² Número de acesso no banco de dados da *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (*TIGR-CMR*) (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>);

³ Função predita por *TIGR-CMR*;

⁴ Expressão de proteínas em células aderidas após exposição à calcopirita por 2 horas relativamente às células não aderidas. +: síntese induzida, -: síntese reprimida;

⁵ Nome de cada proteína que foi identificada por comparação com o banco de proteínas anotadas a partir do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270;

⁶ Massa molecular teórica em Da. pI: ponto isoeletrico teórico;

⁷ Referente ao programa MASCOT derivado da pesquisa por espectrometria de massas;

⁸ Número de peptídeos que apresentam correspondência com a sequência da proteína identificada (nº de peptídeos observados);

⁹ Porcentagem de aminoácidos encontrados experimentalmente em relação ao total de aminoácidos da proteína anotada.

I.3. Análise da expressão gênica diferencial em células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita

Os genes selecionados para análise da expressão por PCR em tempo real codificam para algumas proteínas que foram diferencialmente expressas em células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição à bornita (Tabela 4). Como não foi observada mudança significativa na síntese protéica de células livres após exposição à calcopirita, optou-se por investigar nessas células a expressão de genes que codificam algumas proteínas responsivas à bornita.

A especificidade dos *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real (Tabela 3) foi confirmada por PCR utilizando DNA genômico isolado de *A. ferrooxidans* LR, como mostra a Figura 25. A integridade do RNA, antes e após o tratamento com DNase, extraído de células de *A. ferrooxidans* LR crescidas em Fe^{2+} e após exposição à calcopirita foi checada por eletroforese (Figura 26).

Os níveis de expressão para cada gene em relação ao controle (definido como nível de expressão igual a 1) foram obtidos para células expostas à calcopirita por 24 horas (Figura 27). Os resultados indicaram que após a exposição das células ao mineral apenas os genes que codificam para as proteínas ribossomais S2 e L25 tiveram sua expressão induzida (nível de expressão maior que 1). Esses resultados foram estatisticamente confirmados pelo Teste T de *Student*, com nível de confiança de 0,05 ou menos. Os demais genes analisados tiveram a expressão inalterada após exposição à calcopirita por 24 horas (nível de confiança maior que 0,05 pelo Teste T de *Student*).

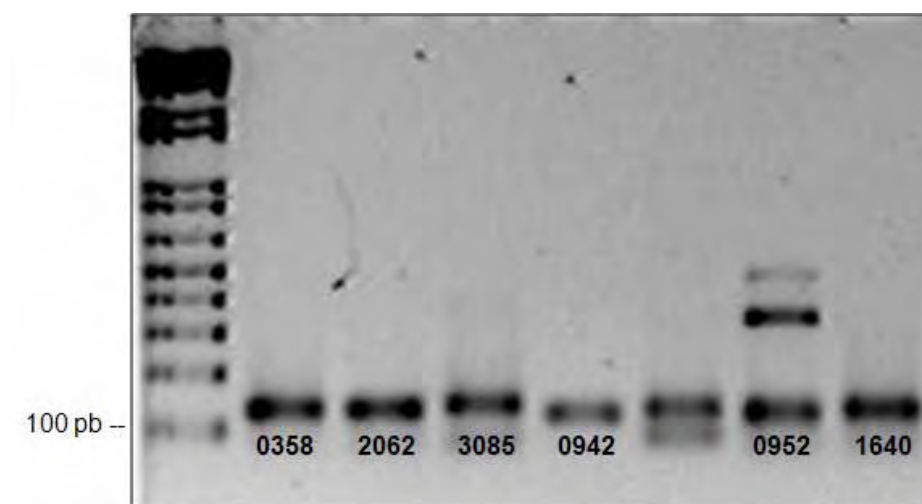


Figura 25. Análise da especificidade dos *primers* por PCR a partir do DNA genômico de *A. ferrooxidans* LR e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose. Os genes estão indicados na abscissa pelos números de acesso no genoma da *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabela 3), sendo eles: AFE_0358 subunidade HslU da proteína de choque térmico HslVU; AFE_2062 antioxidante, família AhpC/Tsa; AFE_3085 frutose-bifosfato aldolase; AFE_0942 ribulose bifosfato carboxilase; AFE_0952 proteína ribossomal L25; AFE_1640 proteína ribossomal S2.

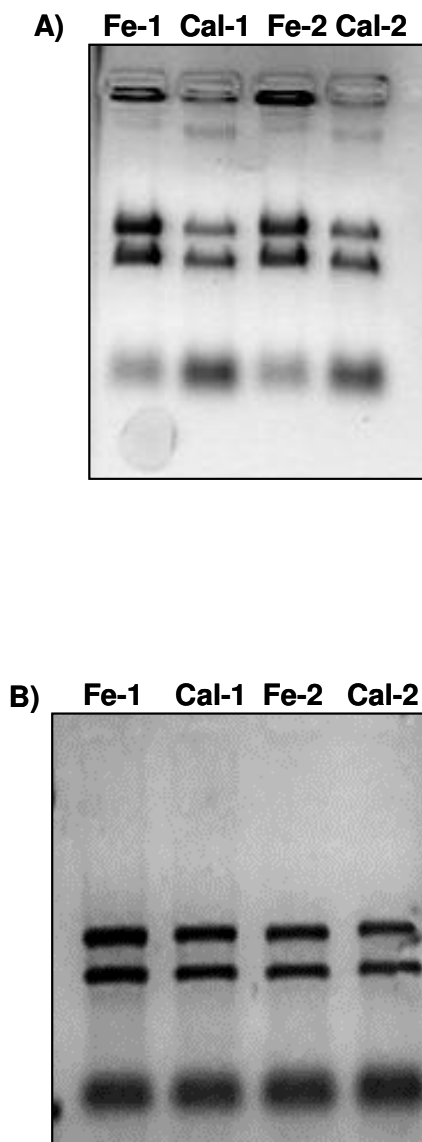


Figura 26. Análise da extração de RNA de células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita por 24 horas. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, mas apenas duas réplicas são mostradas. O RNA foi extraído de células crescidas em íons Fe^{2+} (Fe-1 e Fe-2) e de células livres após exposição à calcopirita (Cal-1 e Cal-2) por 24 horas. As amostras de RNA total (A), foram tratadas com DNase (B) e fracionadas em gel de agarose 1% (m/v) contendo formaldeído 6% (v/v).

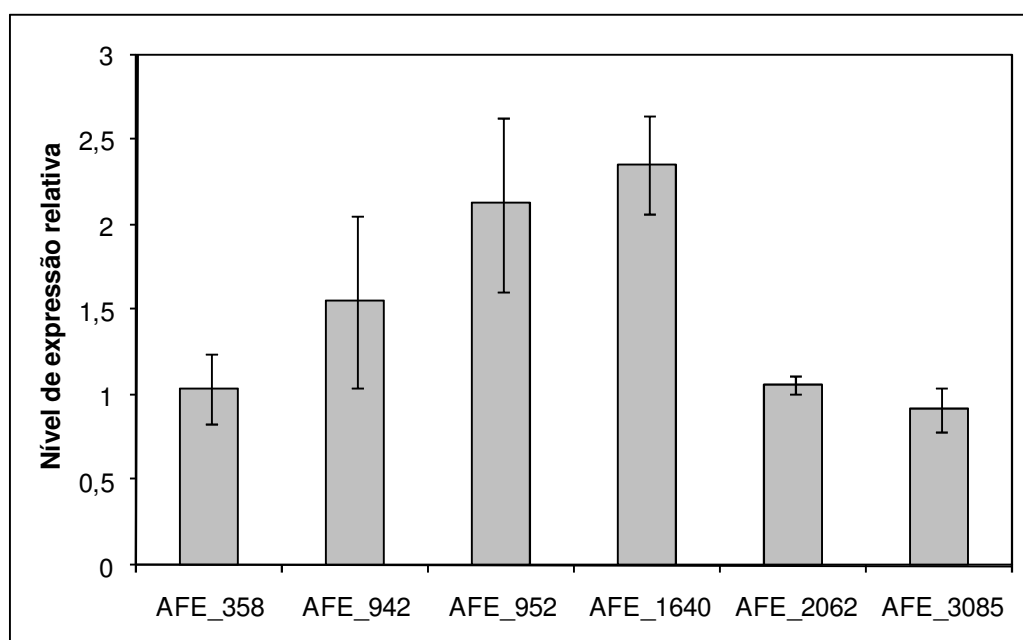


Figura 27. Quantificação da expressão de genes por PCR em tempo real de células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita por 24 horas, em comparação ao controle (íons Fe^{2+}). Os genes estão indicados na abscissa pelos números de acesso no genoma da *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabela 3), sendo eles: AFE_0358 subunidade HslU da proteína de choque térmico HslVU; AFE_0942 ribulose bifosfato carboxilase; AFE_0952 proteína ribossomal L25; AFE_1640 proteína ribossomal S2; AFE_2062 antioxidante, família AhpC/Tsa; AFE_3085 frutose-bifosfato aldolase.

PARTE II. Efeito de uma proteína putativa recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína sobre a oxidação bacteriana da calcopirita

Uma proteína de *A. ferrooxidans* LR (PCys), cujo gene correspondente conferiu um aparente aumento da tolerância de *E. coli* a íons manganês (NOVO, 1993), foi avaliada quanto ao efeito na oxidação bacteriana da calcopirita. Tal escolha se deveu ao fato da proteína possuir um conteúdo razoável em cisteína e pelo fato da sua região codificadora já estar clonada em vetor de expressão. A seqüência nucleotídica e de aminoácidos da PCys está mostrada na Figura 4. O clone de *E. coli* contendo a região codificadora da proteína inserida em vetor de expressão pET28a foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva (Departamento de Genética e Evolução-UFSCar).

Após indução da sua expressão por IPTG e lise celular, a proteína recombinante (rPCys) foi detectada, na sua maior parte, na fração solúvel (sobrenadante) (Figura 28), o que facilitou a sua purificação (Figura 29).

O efeito da rPCys na oxidação da calcopirita por *A. ferrooxidans* LR foi verificado por experimentos de respirometria (Figura 30). A atividade oxidativa bacteriana na presença da rPCys (aproximadamente 400 µL de oxigênio consumido) aumentou significativamente quando comparada à atividade bacteriana na ausência da mesma (aproximadamente 300 µL de oxigênio consumido) (Figura 30).

Além da proteína recombinante, testou-se o efeito de alguns aminoácidos (alanina, cisteína, serina, metionina, histidina, valina, leucina ou isoleucina) na oxidação da calcopirita (Figuras 30, 31 e 32). A atividade oxidativa da calcopirita pela bactéria na presença de alguns aminoácidos (concentração 1×10^{-5} mol L⁻¹) não foi maior do que a atividade oxidativa na ausência dessas biomoléculas (controle) (Figura 30). A Figura 31 mostra que a atividade oxidativa bacteriana foi superior quando os aminoácidos cisteína, alanina e serina foram testados na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹, quando comparada ao controle (ausência de aminoácidos). Esse aumento na atividade oxidativa da calcopirita pela bactéria não foi observado na presença de metionina, histidina, valina, leucina e isoleucina na concentração 1×10^{-4} mol L⁻¹, sendo o consumo de oxigênio na presença do mineral e desses aminoácidos menor do que na situação controle (ausência de aminoácidos) (Figuras 31 e 32).

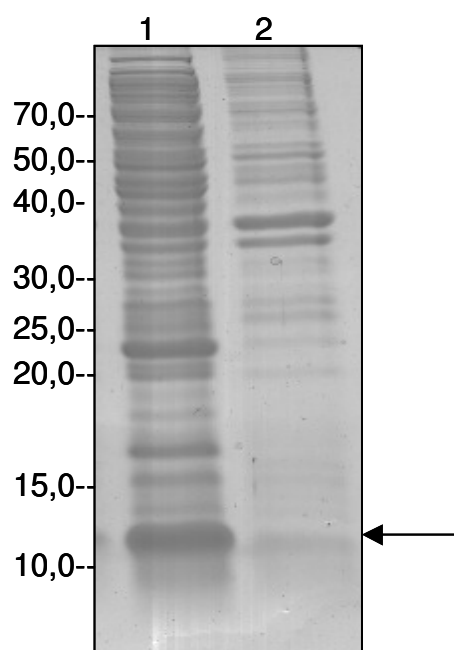


Figura 28. SDS-PAGE da fração solúvel e do precipitado após indução e lise celular do clone recombinante de *E. coli* para detecção da rPCys. O volume de 20 μ L da fração do sobrenadante (1) e da fração do precipitado (2) foi separado por eletroforese em gel 14%, o qual foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250. A seta indica a banda correspondente à rPCys. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel.

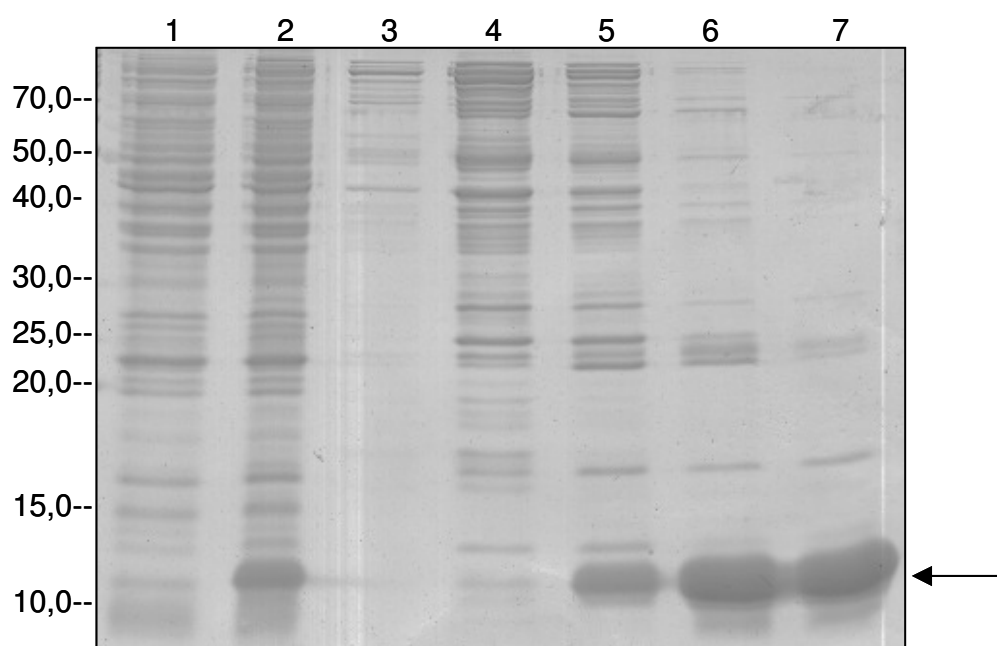


Figura 29. SDS-PAGE das frações eluídas durante a purificação da rPCys por cromatografia de afinidade. As frações coletadas foram: 1 - lavagem I (fração que passou pela coluna após aplicação da amostra); 2 - lavagem II (lavagem com tampão antes da eluição da amostra); 3-7, frações do eluato. 20 μ L das diferentes frações foram aplicados no gel. A seta indica a banda correspondente à rPCys. Eletroforese em gel (SDS-PAGE 14%), corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo do gel.

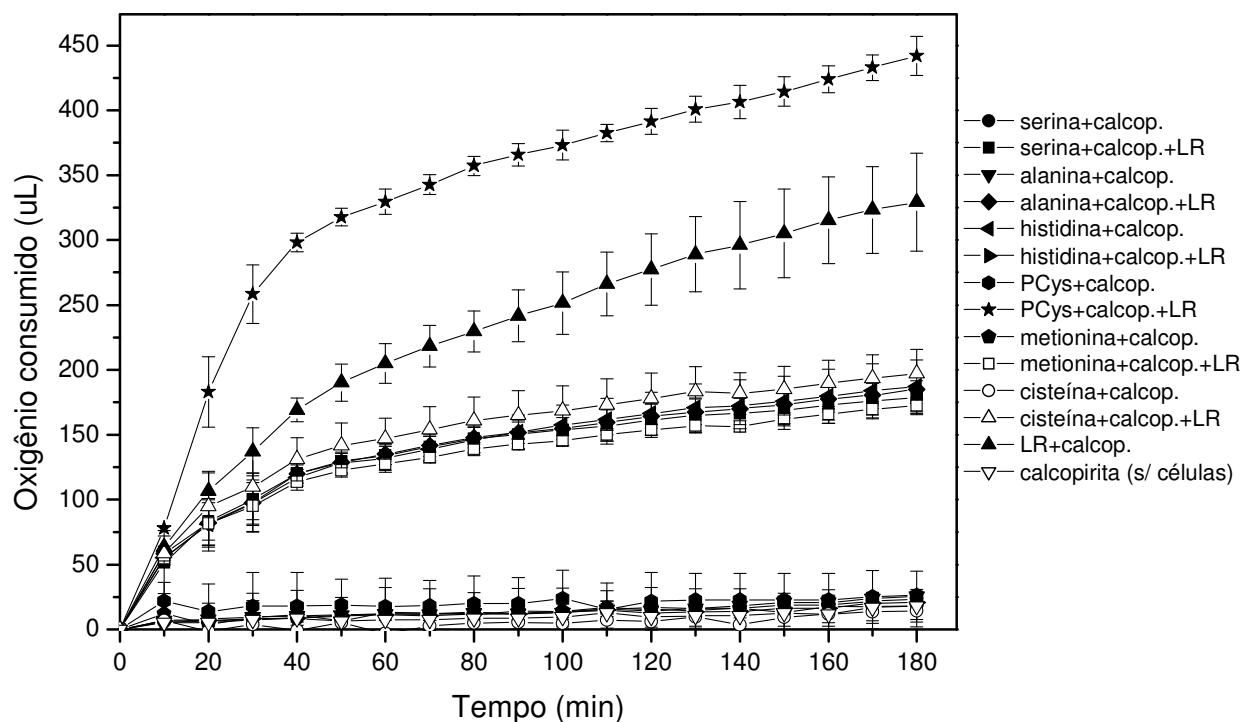


Figura 30. Efeito da rPCys e de alguns aminoácidos no consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita, durante ensaios respirométricos. Tanto a rPCys quanto os aminoácidos (cisteína, alanina, serina, metionina ou histidina) foram testados na concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O consumo de oxigênio (μL) foi medido depois que as células foram adicionadas à amostra mineral (fornecida pela Vale). O controle foi realizado na ausência de células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

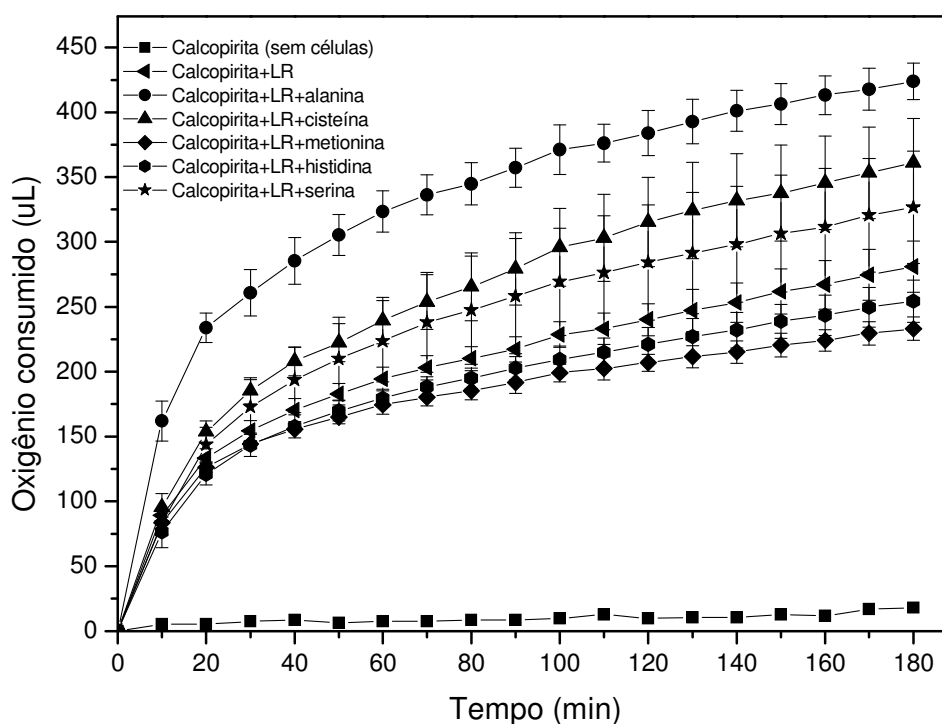


Figura 31. Efeito dos aminoácidos alanina, cisteína, metionina, histidina ou serina (concentração 1×10^{-4} mol L⁻¹) no consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita, durante ensaios respirométricos. O consumo de oxigênio (μL) foi medido depois que as células foram adicionadas à amostra mineral (fornecida pela Vale). O controle foi realizado na ausência de células e de aminoácidos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

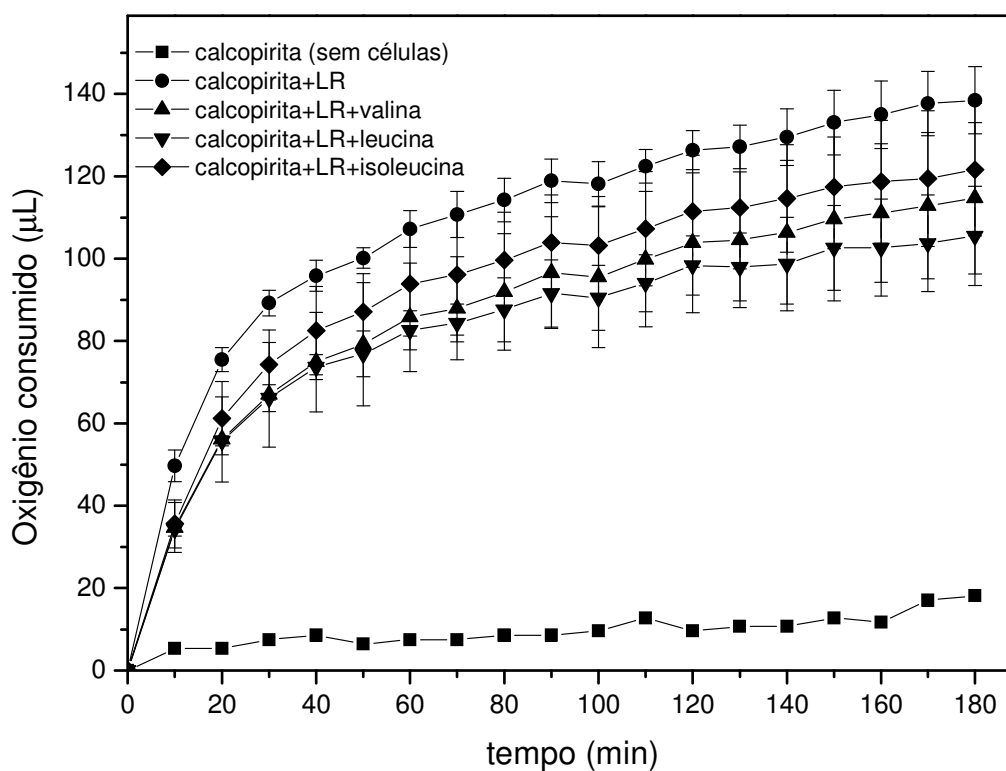


Figura 32. Efeito dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) no consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* LR na presença de calcopirita durante ensaios respirométricos. O consumo de oxigênio (μL) foi medido depois que as células foram adicionadas à amostra mineral (fornecida pela Vale). O controle foi realizado na ausência de células e de aminoácidos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

DISCUSSÃO

A bornita (Cu_5FeS_4) é um sulfeto de cobre com a mesma constituição elementar da calcopirita (CuFeS_2), contudo a diferença na estrutura cristalina dos minerais é responsável pela susceptibilidade distinta à oxidação por *A. ferrooxidans*. A calcopirita é freqüentemente caracterizada como o mineral mais refratário ao ataque químico ou bacteriano (THIRD; CORD-RUWISCH; WATLING, 2000; ARCE; GONZÁLEZ, 2002; AKCIL; CIFTCI; DEVECI, 2007). A refratariedade da calcopirita pode ser atribuída à ocorrência de uma camada passiva na superfície do mineral composta de enxofre elementar, precipitado de íons Fe^{3+} ou intermediários de polissulfetos de cobre (PRICE; WARREN, 1986; LÁZARO et al., 1995).

Nos experimentos de respirometria celular a atividade oxidativa bacteriana sobre a calcopirita e bornita foi observada desde o início da exposição aos minerais, para praticamente todas as linhagens testadas, tendo sido superior à oxidação química observada na condição controle (sem bactéria). Foram observadas diferenças na atividade oxidativa das linhagens sobre os minerais, o que evidencia uma variabilidade entre as linhagens em relação à capacidade de utilização ou de resposta à presença desse tipo de substrato.

A linhagem LR foi uma das mais eficientes na oxidação de ambos os minerais calcopirita e bornita pelos experimentos de respirometria. Embora sua atividade sobre os minerais tenha sido comparável a de algumas outras linhagens, a LR foi escolhida para a análise proteômica por ser uma das que apresentou maior tolerância a íons cobre (NOVO et al., 2000), o íon metálico constituinte dos minerais aqui estudados (calcopirita e bornita), o qual é liberado durante a oxidação dos mesmos. Também foi escolhida por ser, dentre as linhagens testadas, uma linhagem já utilizada em vários outros trabalhos (GARCIA JUNIOR, 1991; NOVO, 1993; BEVILAQUA, 1999; NOVO et al., 2000; BEVILAQUA et al., 2002; FELÍCIO et al., 2003, 2007; NOVO; GARCIA JUNIOR; OTTOBONI, 2003).

O principal objetivo do presente trabalho foi estudar a resposta de *A. ferrooxidans* LR à mudança do substrato solúvel Fe^{2+} para um sulfeto mineral pouco solúvel (calcopirita ou bornita), visando compreender melhor os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta aos minerais. Diferentemente de outros trabalhos relatados na literatura, o objetivo aqui proposto foi analisar a resposta imediata de *A. ferrooxidans* à substituição do Fe^{2+} pelo sulfeto mineral do que a

alteração da síntese devido ao crescimento bacteriano na presença do mineral. Para isto, uma análise proteômica diferencial foi realizada em células de *A. ferrooxidans* após exposição à calcopirita ou bornita por 24 ou 48 horas, tempo este provavelmente insuficiente para atingir a fase exponencial de crescimento, que se iniciou após cerca de 8 dias na presença dos minerais. Os tempos de exposição, 24 e 48 horas, possivelmente corresponderam à fase *lag* de crescimento, sendo detectada uma resposta metabólica significativa, ao menos para a bornita, evidenciada pela síntese protéica diferencial. Em geral, as diferenças observadas foram relativas a proteínas já detectadas no controle, não sendo observadas proteínas sintetizadas exclusivamente após exposição aos minerais.

Um comportamento diferencial foi claramente observado entre células expostas à calcopirita ou bornita. A síntese de proteínas em células livres foi somente alterada por bornita, pelo menos para proteínas que puderam ser detectadas pela abordagem experimental adotada, e que possuem ponto isoelétrico entre 4 e 7. Porém Ferraz et al., usando RNA *arbitrarily primed* PCR (RAP-PCR) e PCR em tempo-real, puderam detectar expressão diferencial de alguns genes em resposta à calcopirita. Estes genes foram relacionados à degradação/modificação de proteínas e sistema de transporte (Ferraz et al., manuscrito em preparação).

Neste trabalho, após exposição das células à bornita, observou-se a indução da síntese da proteína chaperonina groEL, de uma proteína antioxidante da família AhpC/Tsa e em menor escala para a proteína aldeído desidrogenase, enquanto que a síntese de tais proteínas permaneceu inalterada quando as células foram colocadas em presença de calcopirita.

A proteína groEL conhecida como chaperona molecular, media a reação de enovelamento de proteínas (WEISSMAN et al., 1994), bloqueando associação e evitando a formação de agregados protéicos (AGARD, 1993; YOUNG et al., 2004). Em bactérias a síntese da proteína groEL é induzida por estresse, como choque térmico (SEGAL; RON, 1998).

A proteína antioxidante AhpC/Tsa pertence a uma família de peroxidases altamente conservadas em procariotos e eucariotos que agem por reduzir hidroperóxidos com elétrons doados por NADPH via tioredoxina ou outros intermediários contendo grupos tiol (RODRIGUEZ-MONTELONGO et al., 1993; LEE et al., 1999). A proteína antioxidante AhpC/Tsa age como um mecanismo de defesa

na resposta celular adaptativa a estresse oxidativo (DEMPLE; AMÁBILE-CUEVAS, 1991).

A proteína aldeído desidrogenase pertence ao grupo de várias isoenzimas que são importantes na defesa celular contra aldeídos exógenos e endógenos tóxicos como aqueles derivados da peroxidação de lipídeos, usando NAD^+ e NADH como aceptor e doador de elétrons, respectivamente (LINDAHL, 1992; MARCHITTI; DEITRICH; VASILIOU, 2007). Aldeídos são compostos tóxicos devido a sua reatividade química (SUNKAR; BARTELS; KIRCH, 2003).

A indução de tais proteínas como resposta apenas à presença de bornita aparentemente sugere que a exposição de *A. ferrooxidans* a este mineral deve representar uma situação de maior estresse oxidativo para a bactéria do que o crescimento em íons Fe^{2+} . Esse efeito provavelmente se deve aos íons cobre liberados durante a exposição das células à bornita, um mineral mais solúvel. Sabe-se que em altas concentrações os íons cobre provocam um efeito tóxico em vários microrganismos, pois podem agir como um oxidante e também formar quelatos com moléculas orgânicas, incluindo DNA e proteínas (THURMAN; GERBA, 1989). Este efeito pode envolver inativação de enzimas, produção de radicais hidróperóxidos livres pela ligação de cobre com a membrana, e alterações na integridade da membrana (RODRIGUEZ-MONTELONGO et al., 1993; NIES, 1999).

Um padrão de repressão foi principalmente observado para proteínas envolvidas no metabolismo energético em geral, tais como frutose-1-6-bisfosfatase (fbp), carboidrato quinase (PfkB) e ribulose bifosfato carboxilase subunidade maior 2 (cbbL2). A repressão também foi observada para proteínas ribossomais S2 e L25, sugerindo uma diminuição na síntese proteica, provavelmente devido à situação de maior escassez de energia (bornita) em comparação aos íons Fe^{2+} (fonte de energia solúvel). Conseqüentemente, as proteínas cuja síntese foi induzida (chaperonina groEL, antioxidante AhpC/Tsa, aldeído desidrogenase) devem se constituir em proteínas essenciais à resposta celular em presença de bornita.

A repressão na síntese também foi observada para uma proteína HslU subunidade da proteína de choque térmico HslVU, proteína de domínio radical SAM e uma proteína não identificada de 23 kDa (proteína 11) (Tabela 4), provavelmente específica da linhagem LR. A proteína HslVU (também chamada de HslUV ou ClpYQ) é uma protease oligomérica ATP-dependente do citossol bacteriano composta por duas proteínas de choque térmico, a peptidase HslV 19 kDa e ATPase

HslU 50 kDa (CHUANG et al., 1993; YOO et al., 1997). Proteínas de choque térmico são definidas como aquelas cuja expressão é induzida em resposta a elevação da temperatura, presença de metais pesados ou estresse oxidativo (YOUNG et al., 2004).

A proteína de domínio radical SAM inclui um grande número de enzimas bacterianas que são caracterizadas pela presença de *cluster* ferro-enxofre (Fe-S) e pelo envolvimento na clivagem redutiva de S-adenosilmetionina (SAM) para gerar um radical 5'-deoxiadenosil (SOFIA et al., 2001). Esta espécie de radical é usada para iniciar reações em vários substratos, de acordo com a especificidade funcional de cada enzima (NICOLET; DRENNAN, 2004). Proteína de domínio radical SAM catalisa diversas reações, incluindo oxidação, metilação, isomerização e ciclização oxidativa (FREY, 2001; SOFIA et al., 2001). O *cluster* Fe-S funciona como centro redox em reações de transferências de elétrons, centro catalítico de enzimas não-redox, e como sensores de Fe, O₂, e O₂⁻ na regulação de processos metabólicos (STICHT; RÖSCH 1998; TAKAHASHI; NAKAMURA, 1999). A subunidade HslU da proteína de choque térmico HslVU e enzima domínio radical SAM parecem não ser proteínas essenciais na resposta de *A. ferrooxidans* LR à bornita.

Entre as proteínas relacionadas ao metabolismo energético, a repressão foi observada para frutose-bifosfato aldolase, uma proteína de 39 kDa (proteína 4) (Tabela 4). No entanto, outra proteína que possui o mesmo peso molecular, mas um ponto isoelétrico menor e que também foi identificada como frutose-bifosfato aldolase, teve sua síntese induzida na presença de bornita (proteína 8) (Tabela 4).

As duas formas da enzima frutose-bifosfato aldolase (proteínas 4 e 8) podem ser duas isoenzimas com diferentes valores de ponto isoelétrico. De fato, há mais de uma *ORF* no genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 anotada como frutose-bifosfato aldolase. Contudo, as análises por espectrometria de massas indicaram que as duas proteínas (4 e 8) correspondem inequivocadamente à mesma *ORF* AFE_3085 (Tabela 4). Além disso, o valor de *score* calculado pelo programa MASCOT foi alto para as proteínas identificadas como frutose-bifosfato aldolase (Tabela 4). Uma segunda hipótese é que uma das duas formas de frutose-bifosfato aldolase tenha sido originada por uma modificação pós-traducional da enzima, como por exemplo, fosforilação protéica. Outros experimentos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

Embora a modificação covalente de proteínas por fosforilação tenha sido descrita inicialmente para eucariotos, exemplos desta modificação pós-traducional em procariotos têm sido freqüentes na literatura desde 1980 (NIMMO, 1984; COZZONE, 1988; KENNELLY, 2002; MACEK et al., 2008). Em suporte à hipótese de eventos de fosforilação em *A. ferrooxidans*, Novo et al. (2000) detectaram fosforilação de proteínas do citossol (uma delas com peso molecular de 40 kDa) na mesma linhagem utilizada neste trabalho (LR). Esta fosforilação foi observada em resposta aos íons cobre (NOVO et al., 2000), o mesmo metal liberado durante a solubilização da bornita (um mineral mais solúvel do que a calcopirita). Embora não se conheçam trabalhos sobre a modificação covalente ou outros mecanismos regulatórios para frutose-bifosfato aldolase em *A. ferrooxidans*, modificação pós-traducional desta enzima foi reportada para *E. coli* (BABUL; FRAENKEL, 1988). A fosforilação pode ativar ou inibir enzimas, direcionar proteínas para degradação, ou afetar a interação de proteínas com outros componentes celulares (KLEIN; DARTIGALONGUE; RAINA, 2003). A fosforilação de proteínas tem, inclusive, um papel regulatório, principalmente na resposta celular a mudanças ambientais (DEUTSCHER; SAIER, 2005).

A fructose-bifosfato aldolase é uma enzima essencial das vias metabólicas glicólise e gliconeogênese, pois catalisa a clivagem da frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxicetona-fosfato ou a reação inversa (RUTTER, 1964). Esta enzima participa também do Ciclo de Calvin (APPIA-AYME et al., 2006), catalisando o terceiro passo do ciclo, a regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP). Contudo, este ciclo parece não estar ativado na presença de bornita, devido ao fato da síntese da ribulose bifosfato carboxilase (cbbL2) ou RuBisCO, a primeira enzima do Ciclo de Calvin, estar reprimida (Tabela 4).

A forma I da RuBisCO, mais complexa, consiste de 8 subunidades maiores (CbbL) e 8 menores (CbbS), que são codificadas pelos genes *cbbL* e *cbbLS* (HEINHORST et al., 2002). Kusano et al. (1991) descreveram a ocorrência de 2 cópias idênticas de *cbbLS* na linhagem *A. ferrooxidans* Fe1. A subunidade CbbL da ribulose bifosfato carboxilase também teve a síntese reprimida em células de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crescidas em enxofre, um substrato insolúvel, quando comparada a células crescidas em íons Fe^{2+} (RAMÍREZ et al., 2004). Além disso, sendo o Ciclo de Calvin dependente de energia (NADPH e ATP), é compreensível que o mesmo seja inibido numa situação em que a bactéria se depara com a menor

disponibilidade de substrato oxidável (comparativamente aos íons Fe^{2+}). Segundo Shively, Van Keulen e Meijer (1998), a expressão de enzimas do Ciclo de Calvin varia consideravelmente em organismos quimiolitotróficos dependendo do substrato a ser oxidado. Nesses organismos, quando compostos inorgânicos oxidáveis estão presentes, ocorre a produção de equivalentes redutores tais como NADH e NADPH. Essa produção de coenzimas reduzidas pela oxidação de substratos inorgânicos está em acordo com o esquema da cadeia respiratória de *A. ferrooxidans* apresentado em revisão de Rawlings (2005) e por Bruscella et al. (2007). O aumento na concentração intracelular de NADPH nas células favorece a formação do complexo NADPH-CbbR, aumentando a afinidade do regulador transcricional CbbR pelos promotores dos genes do ciclo de Calvin (operon *cbb*), o que ativa a transcrição dos mesmos (SHIVELY; VAN KEULEN; MEIJER, 1998). No entanto, quando as células são colocadas em bornita esses eventos não devem ocorrer.

Se considerada a hipótese de que a forma mais ativa da enzima frutose-bifosfato aldolase é a forma induzida em bornita (com ponto isoelétrico menor, proteína 8), a atuação desta proteína deve portanto estar voltada para as vias metabólicas da glicólise ou da gliconeogênese em *A. ferrooxidans*, já que o Ciclo de Calvin parece estar menos ativo em bornita. Provavelmente a gliconeogênese também está menos ativada nesta situação, pois esta é uma via dependente de energia. Além do mais, a frutose-1-6-bifosfatase, uma importante enzima desta via, que cataliza a reação de hidrólise da frutose 1,6-bifosfato em frutose 6-fosfato, também teve sua síntese reprimida após exposição à bornita.

Portanto a atividade da frutose-bifosfato aldolase nesta situação estaria envolvida na via glicolítica para gerar ATP necessário aos processos celulares, sugerindo que esta via pode ter sido ativada na bactéria autotrófica, desde que o substrato orgânico requerido (glicose 6-fosfato) esteja disponível para oxidação. Uma possibilidade é que tal substrato seria fornecido pela ativação da degradação de glicogênio (glicogenólise), mas os resultados obtidos neste trabalho não evidenciaram alteração na síntese de enzimas envolvidas na glicogenólise. Pouco se sabe sobre o metabolismo do glicogênio em *A. ferrooxidans*, embora genes candidatos relacionados à sua quebra e biossíntese tenham sido identificados no seu genoma por Appia-Ayme et al. (2006).

Possivelmente, durante o crescimento em íons Fe^{2+} (antes da exposição à bornita) a fixação mais eficiente do CO_2 pelo Ciclo de Calvin (possibilitada pela maior

disponibilidade de energia) possa ter permitido canalizar o carbono assimilado para o armazenamento de glicogênio, comparativamente ao que ocorre em células heterotróficas que realizam glicogênese quando os nutrientes orgânicos oxidáveis estão mais abundantes (BARRETO; JEDLICKI; HOLMES, 2005).

A mudança de íons Fe^{2+} para bornita pode ter ativado a glicogenólise, a qual estaria menos ou não ativada durante a oxidação desses íons (devido à alta disponibilidade de coenzimas redutoras NADPH e NADH produzidas pela oxidação do substrato inorgânico na cadeia respiratória) (RAWLINGS, 2005). Em organismos heterotróficos é conhecida a atuação inibitória dessas coenzimas nas vias catabólicas. Este fato poderia talvez explicar o “silenciamento” (ou baixo funcionamento) dessas vias de degradação de composto orgânico endógeno em *A. ferrooxidans*, quando íons Fe^{2+} ou outros compostos inorgânicos estão altamente disponíveis. Até onde se sabe, não há nada descrito na literatura sobre material orgânico estocado em *A. ferrooxidans*. Contudo, genes que codificam para glicogênio sintase, maltooligosil trealose sintase, várias enzimas de ramificação, glicano- e glicosil-transferase em *Thiobacillus denitrificans* sugerem que essa espécie sintetiza um produto estocado de poliglicose (BEUDEKER; KERVER; KUENEN, 1981).

Pouco se sabe sobre o funcionamento da via glicolítica aeróbia e do Ciclo de Krebs em organismos quimioautotróficos obrigatórios, porém algumas enzimas dessas vias, tais como glicose-6-fosfato isomerase, piruvato quinase, fosfoglicerato quinase, citrato sintase, fumarato hidratase, succinil-CoA sintetase e isocitrato desidrogenase, têm sido identificadas nas seqüências de proteínas anotadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Smith, London e Stainer (1967) consideram que organismos quimioautotróficos obrigatórios possuem um Ciclo de Krebs incompleto, o qual aparentemente funciona somente na biossíntese, enquanto que Martin e Rittenberg (1971) propuseram a atuação catabólica do Ciclo de Krebs para gerar energia em thiobacilli mixotróficos e heterotróficos. Uma vez que os organismos quimioautotróficos não utilizam glicose exógena como fonte de energia, tais vias provavelmente estão pouco operantes quando há o substrato inorgânico oxidável. Portanto, pode-se supor a indução das enzimas do Ciclo de Krebs em *A. ferrooxidans* para obtenção de fonte adicional de energia na situação em que é mais escasso o substrato inorgânico. Nesse caso o composto orgânico a ser oxidado na via glicolítica/Ciclo de Krebs durante a exposição à bornita seria endógeno, oriundo

da quebra de glicogênio, caso esse realmente tenha sido sintetizado anteriormente (na presença de íons Fe^{2+}).

Na situação inicial de mudança para o substrato mineral pouco solúvel provavelmente a célula deve priorizar a síntese de enzimas essenciais, uma vez que a própria biossíntese de proteínas é um processo que requer ATP, o qual deve ser poupado. Enzimas essenciais nesse momento possivelmente seriam aquelas necessárias para disponibilizar energia a partir de estoque interno, como comentado, por exemplo, no caso do glicogênio, mas também do próprio mineral, ou ainda para permitir a tolerância bacteriana aos íons cobre liberados durante a oxidação da bornita. No geral, a diminuição da síntese protéica, comparativamente ao controle (íons Fe^{2+}) parece realmente ter ocorrido na presença do mineral, o que foi evidenciado pela repressão de proteínas ribossomais.

A proteína carboidrato quinase, que teve sua síntese reprimida após contato com bornita, provavelmente está envolvida no metabolismo de carboidratos, transferindo um grupo fosfato de um composto de alta energia para um composto aceptor. Não foi possível identificar, por pesquisa nas seqüências de proteínas anotadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, exatamente qual o tipo de carboidrato quinase, bem como entender o papel desta proteína na exposição à bornita. Mas foi possível identificar pela análise por *Blastp* (*National Center for Biotechnology Information*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) diferentes *ORFs* anotadas em seqüências genômicas de outros microrganismos que correspondem a carboidrato quinase família PfkB, mas que diferem na seqüência de aminoácidos.

Apesar das informações contidas na literatura serem insuficientes para explicar o papel das proteínas diferencialmente expressas detectadas em *A. ferrooxidans* após exposição à bornita, o trabalho aqui apresentado pode ser uma contribuição no entendimento das respostas bioquímicas da bactéria aos sulfetos minerais.

O perfil diferencial de expressão protéica após exposição à bornita e a ausência de expressão diferencial em calcopirita parece sugerir que, no geral, os mesmos afetam de maneira distinta o metabolismo de *A. ferrooxidans* LR. É possível, no entanto, que parte da resposta da expressão diferencial após exposição à bornita seja também devido ao fato da cinética de solubilização dos minerais ser diferenciada, sendo mais lenta na presença de calcopirita. No entanto, os resultados são importantes para evidenciar alguns aspectos desconhecidos do metabolismo e

para o início do entendimento das respostas celulares desencadeadas após exposição a cada um dos minerais.

Poucos trabalhos têm sido realizados sobre a identificação de agentes bioquímicos envolvidos na adesão e oxidação bacteriana de minerais. De acordo com Devasia et al. (1993), componentes constituintes da superfície de *A. ferrooxidans* podem ter um papel importante na adesão bacteriana aos sulfetos minerais. Ohmura et al. (1996) consideram que *A. ferrooxidans* crescida em substratos insolúveis sintetiza componentes específicos para a adesão aos sulfetos. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 produz uma proteína de 40 kDa encontrada no flagelo bacteriano que se liga a enxofre quando as células crescem nessa fonte de energia mas não quando crescem em íons Fe^{2+} . Essa proteína contém grupos tiol, os quais aderem fortemente ao enxofre (substrato sólido) (OHMURA et al., 1996).

A investigação de proteínas envolvidas na adesão e conseqüente oxidação da superfície da calcopirita por células de *A. ferrooxidans* ali aderidas poderá permitir um maior conhecimento de como otimizar o processo e/ou indicar proteínas-chave envolvidas na interação mineral-bactéria.

A subfração de proteínas periplasmáticas de *A. ferrooxidans*, investigada neste trabalho por análise proteômica, é de grande interesse, pois contém proteínas envolvidas na cadeia respiratória (RAWLINGS, 2005) e pode conter proteínas que poderão ser exportadas para o meio extracelular a fim de atuarem na oxidação, ou mesmo na adesão ao substrato mineral insolúvel. O envolvimento de proteínas secretadas para formação de biofilme bacteriano tem sido descrito em bactéria patogênica (CAMPISANO et al., 2006). Considerando que a formação de biofilme também tem sido descrita para *A. ferrooxidans*, é possível que proteínas secretadas pelo microrganismo tenham um papel importante na formação do mesmo. A fração de periplasma está situada na região entre as membranas externa e citoplasmática, por onde podem passar as proteínas a serem inseridas na membrana (CHI et al., 2007) e que podem estar envolvidas no mecanismo de oxidação da calcopirita.

Com o propósito de investigar proteínas que possam estar envolvidas na adesão/oxidação bacteriana à calcopirita, a análise da expressão diferencial de proteínas periplasmáticas foi realizada em células aderidas ao mineral, comparativamente às não aderidas (controle) após exposição por 2 horas. O tempo inicial de 2 horas foi suficiente para alterar a síntese protéica em células aderidas à

calcopirita, sem que alterações visíveis fossem observadas nas células não aderidas.

Pela análise proteômica foi possível detectar a indução de duas proteínas periplasmáticas e a repressão de outras duas em células aderidas, comparando-se com células não aderidas. Entre as proteínas diferencialmente expressas, duas proteínas com o mesmo peso molecular (23 kDa) mas com ponto isoelétrico distinto, sofreram repressão em células aderidas à calcopirita e foram identificadas como sendo a proteína superóxido dismutase. Essa proteína compreende um grupo de metaloenzimas que tem sua atividade alterada sob diferentes condições ambientais (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992). Ramírez et al. (2004) identificaram em *A. ferrooxidans* ATCC 19859 uma proteína que mostrou similaridade com a superóxido dismutase, sendo que sua síntese protéica foi reprimida após crescimento em enxofre, em comparação ao crescimento em íons Fe^{2+} .

As proteínas periplasmáticas que sofreram indução em células aderidas à calcopirita foram identificadas como sendo uma proteína que liga simples fita de DNA (*single strand binding*, *SSB*) envolvida no metabolismo de DNA (replicação, recombinação e reparo) e a proteína *PspA* (*phage-shock-protein A*)/IM30, envolvida em processos celulares de adaptação a condições atípicas.

A proteína *SSB* de *E. coli* desempenha um papel importante na célula, pois participa do metabolismo do DNA: replicação, reparo e recombinação (MEYER; LAINE, 1990). Essa proteína possui diferentes funções na replicação do DNA, como por exemplo, aumentar a desestabilização da hélice por DNA helicase, prevenir o reanelamento de fitas simples, proteger contra digestão por nucleases e organizar, e estabilizar as origens de replicação (MEYER; LAINE, 1990). A proteína *SSB* de *E. coli* pode se ligar a simples fita do DNA exibindo diversas propriedades, como cooperatividade (LOHMAN; FERRARI, 1994). Além do mais, é requerida na bactéria para reparo de pareamento irregular de bases direcionado por metil e reparo na recombinação (MEYER; LAINE, 1990).

O sistema *phage-shock-protein* (*Psp*) está envolvido no estresse extracitoplasmático ocasionado por condições atípicas (DARWIN, 2005). A proteína *PspA*, a mais abundante das proteínas *Psp*, pode estar envolvida na manutenção da integridade da membrana citoplasmática e/ou na força próton-motriz (DARWIN, 2005). A proteína *PspA* de *E. coli*, uma proteína periférica da membrana de 25,3 kDa, pode assumir o papel de manter o potencial da membrana e é induzida sob

condições de estresse como, por exemplo, a presença de etanol ou Triton X-100 (KOBAYASHI; SUZUKI; YOSHIDA, 2007).

Embora indução e repressão na síntese protéica tenham sido observadas pela análise proteômica na resposta de *A. ferrooxidans* aos minerais, experimentos adicionais seriam necessários para complementar essa análise no sentido de medir a atividade de proteínas expressas diferencialmente, bem como confirmar a sua expressão por experimentos de *Western blot*, por exemplo.

Outros experimentos de padronização da obtenção de células aderidas à calcopirita seriam necessários para garantir maior quantidade de proteínas periplasmáticas, permitindo assim confirmar a expressão diferencial das quatro proteínas detectadas, além de identificar outras proteínas expressas diferencialmente em células aderidas ao mineral.

Como não foram observadas alterações na síntese de proteínas em células livres de *A. ferrooxidans* após exposição à calcopirita, foi analisado o padrão de expressão de alguns dos genes que codificam proteínas diferencialmente expressas em resposta à bornita (Tabela 4) por PCR em tempo real (em nível de RNAm) a partir de células livres expostas à calcopirita. Os resultados mostram que os genes que codificam para as proteínas ribossomais S2 e L25 sofreram indução após exposição à calcopirita, enquanto que os demais genes analisados não sofreram alteração significativa na expressão após exposição ao mineral.

Os genes que codificam para as proteínas ribossomais S2 e L25 tiveram a expressão gênica induzida enquanto que para a síntese protéica não foi detectada alteração significativa após exposição à calcopirita. Essa não correspondência entre síntese protéica e gênica pode sugerir importantes mecanismos de regulação nos níveis de transcrição e tradução. Appya-Ayme et al. (2006) observaram, por PCR em tempo real, que alguns genes do operon *cbb* do metabolismo de carboidratos tiveram sua síntese induzida em células de *A. ferrooxidans* após crescimento em enxofre. Esses resultados conflitam com análises proteômicas que sugerem que algumas proteínas de *A. ferrooxidans* codificadas por genes do operon *cbb* tiveram sua síntese reprimida em enxofre (RAMÍREZ et al., 2004). Diante da diferença encontrada entre síntese gênica e protéica, Appya-Ayme et al. (2006) sugerem que a expressão de proteínas deve ser controlada por mecanismos de regulação em nível de tradução.

De acordo com Gygi et al. (1999), evidências sugerem que a expressão de RNAm é necessária mas insuficiente para uma descrição quantitativa dos sistemas biológicos. Segundo os autores, essas evidências incluem descobertas de mecanismos pós-transcrição que controlam a taxa de tradução das proteínas, a meia vida de proteínas específicas ou do RNAm, a localização intracelular e a associação molecular de proteínas. De acordo com Agnetti et al. (2007), alguns mecanismos biológicos causam discrepâncias quando se tenta correlacionar expressão gênica (RNAm) e protéica. Em termos gerais isto significa que um aumento nos níveis de proteínas pode não ser um reflexo do aumento nos níveis de RNAm (Agnetti et al., 2007).

Neste trabalho realizou-se também, em uma segunda parte, uma investigação preliminar do efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR na atividade de oxidação bacteriana sobre a calcopirita. Utilizou-se uma proteína putativa de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína, aminoácido este que pode ter sido determinante para detecção de um aumento na atividade oxidativa bacteriana da calcopirita, em comparação à ausência da proteína, nos testes de respirometria.

Experimentos complementares utilizando aminoácidos livres foram realizados para verificar o efeito destes na oxidação bacteriana da calcopirita. Em relação aos aminoácidos testados, cisteína, alanina ou serina, em concentração 1×10^{-4} mol L⁻¹, também proporcionaram um aumento na oxidação bacteriana da calcopirita, em comparação ao controle (ausência das biomoléculas). Os demais aminoácidos testados não provocaram o mesmo efeito, sendo inclusive menor o consumo de oxigênio.

Deve-se ressaltar também que a expressão da proteína no vetor pET28a acarreta a adição de uma cauda de histidina na proteína recombinante produzida em *E. coli* (com o objetivo de facilitar a purificação em coluna de afinidade), o que poderia ter influenciado os resultados. No entanto, a adição de histidina livre parece não ter tido qualquer efeito positivo na atividade oxidativa da bactéria sobre a calcopirita, conforme os ensaios respirométricos realizados.

Embora o efeito da proteína recombinante, cisteína ou de outros aminoácidos na oxidação bacteriana da calcopirita ainda não possa ser explicado satisfatoriamente, alguns trabalhos procuraram identificar agentes bioquímicos que possam ativar o processo da oxidação bacteriana de outros minerais como, por exemplo, a pirita (FeS₂, sulfeto mineral susceptível a ação química e bacteriana).

Rojas-Chapana e Tributsch (2000) verificaram a formação de um complexo ferro-cisteína, de um complexo cisteína-pirita (ligado via ponte de enxofre) e de uma interface de grupos SH na superfície da pirita, durante a oxidação deste mineral na presença de cisteína exógena. Os dados apresentados pelos autores indicaram que a interação e complexação da cisteína com pirita enfraqueceram e quebraram ligações químicas no mineral. O complexo cisteína-pirita se reorganiza e promove a liberação de um complexo ferro-enxofre-cisteína, que é supostamente um carregador de energia química para o *A. ferrooxidans*, com um ciclo de renovação de cisteína e Fe^{3+} (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000). Resíduos de cisteína, quando liberados da superfície da parede celular bacteriana, podem agir espontaneamente com o sulfeto e ativar o processo de corrosão similar com o observado com a cisteína exógena (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000). A corrosão da pirita em solução de cisteína pode refletir em um mecanismo para a bactéria obter energia de fontes de sulfetos insolúveis, os quais não podem ser oxidados por extração de elétrons via íons Fe^{3+} (ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000).

Os grupos SH de proteínas da parede celular de *A. ferrooxidans* podem ser fundamentais não somente para o metabolismo bacteriano, mas também para as propriedades de lixiviação, pois podem interagir com a superfície dos minerais, via exopolissacarídeos (ROJAS-CHAPANA; GIER SIG; TRIBUTSCH, 1995; ROJAS-CHAPANA; GIER SIG; TRIBUTSCH, 1996; GEHRKE et al., 1998). Os exopolissacarídeos formam um colóide de enxofre que serve como um reservatório temporário de energia até espécies de enxofre ser transportadas para o interior da célula (ROJAS-CHAPANA; GIER SIG; TRIBUTSCH, 1995; ROJAS-CHAPANA; GIER SIG; TRIBUTSCH, 1996; TRIBUTSCH et al., 1998). Os grupos SH de polipeptídios e polissacarídeos encontrados na superfície bacteriana podem influenciar a adesão aos sulfetos minerais (OHMURA et al., 1996; ROJAS-CHAPANA; TRIBUTSCH, 2000).

Outros experimentos, como por exemplo, de lixiviação ou físico-químicos, seriam necessários para confirmar e esclarecer o efeito da proteína putativa ou dos aminoácidos na oxidação da calcopirita por *A. ferrooxidans*. Além desta proteína recombinante, outras proteínas candidatas a auxiliaadoras da oxidação bacteriana da calcopirita poderiam ser selecionadas entre proteínas das frações de periplasma e/ou de membrana externa que tiverem sua expressão induzida em *A. ferrooxidans*.

LR após adesão e/ou exposição à calcopirita. A fração protéica de membrana celular de *A. ferrooxidans* possivelmente desempenha papel-chave na adesão/interação com o mineral em células aderidas e é uma fração que também desperta interesse.

Proteínas auxiliares da biolixiviação poderiam ser produzidas por engenharia genética em *E. coli* para serem adicionadas à calcopirita. Ou ainda, a expressão dos genes correspondentes a essas proteínas poderia ser de alguma maneira induzida em uma linhagem de *A. ferrooxidans* melhorada geneticamente para fins de lixiviação da calcopirita, o que será possível no momento em que estiver disponível um sistema genético de transformação desse microrganismo.

CONCLUSÕES

✓ Dentre doze linhagens testadas, *A. ferrooxidans* LR foi umas das linhagens mais eficientes na oxidação da calcopirita e bornita por experimentos de respirometria, apresentando também atividade oxidativa nesses sulfetos minerais durante o crescimento bacteriano;

✓ A exposição de *A. ferrooxidans* LR à bornita ou calcopirita como único substrato energético levou à alteração da síntese protéica em células livres apenas na presença de bornita. Em geral, alteração caracterizada por repressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético, e indução de proteínas possivelmente relacionadas ao estresse oxidativo causado por íons cobre provenientes da solubilização da bornita;

✓ O perfil diferencial de expressão protéica em células livres após exposição à bornita e a ausência de expressão diferencial em calcopirita parece sugerir que, no geral, os mesmos afetam de maneira distinta o metabolismo de *A. ferrooxidans* LR;

✓ A exposição à calcopirita por 2 horas foi suficiente para provocar alterações na síntese de proteínas periplasmáticas de células aderidas ao mineral, evidenciando a importância dessa fração celular em eventos de adesão/oxidação do mineral;

✓ A exposição à calcopirita por 24 horas provocou em células livres de *A. ferrooxidans* LR um aumento nos níveis de expressão gênica de proteínas ribossomais, enquanto que a correspondente expressão protéica não pôde ser verificada possivelmente devido a eventuais mecanismos de regulação pós-transcricionais;

✓ A proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR proporcionou um aumento na oxidação bacteriana da calcopirita ao ser adicionada ao mineral, o que pode eventualmente ser atribuído ao seu conteúdo em cisteína e/ou em alguns outros aminoácidos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M.; BEARD, S.; PONDE, J.; VERA, M.; MOBAREC, J. C.; JEREZ, C. A. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. **Omics**, v. 9, p. 13-28, 2005.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- AGARD, D. A. To fold or not to fold. **Science**, v. 260, p. 1903-1904, 1993.
- AGNETTI, G.; KANE, L. A.; GUARNIERI, C.; CALDARERA, C. M.; VAN EYK, J. E. Proteomic technologies in the study of kinases: novel tools for the investigation of PKC in the heart. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 6, p. 511-22, 2007.
- AITKEN, A.; LEARMONTH, M. Protein identification by in-gel digestion and mass spectrometry analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 95-97, 2002.
- AKCIL, A.; CIFTCI, H.; DEVECI, H. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopryrite concentrate. **Minerals Engineering**, v. 20, n. 3, p. 310-318, 2007.
- AMARO, A. M.; CHAMORRO, D.; SEEGER, M.; ARREDONDO, R.; PEIRANO, I.; JEREZ, C. A. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 910-915, 1991.
- AMES, G. F. L.; PRODY, C.; KUSTU, S. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. **Journal of Bacteriology**, v. 160, n. 3, p. 1181-1183, 1984.
- APPIA-AYME, C.; QUATRINI, R.; DENIS, Y.; DENIZOT, F.; SILVER, S.; ROBERTO, F.; VELOSO, F.; VALDÉS, J.; CÁDENAS, J. P.; ESPARZA, M.; ORELLANA, J.; JEDLICKI, E.; BONNEFOY, V.; HOLMES, D. S. Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1-4, p. 273-280, 2006.
- ARCE, E. M.; GONZÁLEZ, I. A comparative study of electrochemical behaviour of chalcopryrite, chalcocite and bornite in sulfuric acid solution. **International Journal of Mineral Processing**, v. 67, n. 1-4, p. 17-28, 2002.
- BABUL, J.; FRAENKEL, D. G. Phosphate modification of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 151, n. 3, p. 1033-1038, 1988.
- BARRETO, M.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2902-2909, 2005.
- BARRETO, M.; QUATRINI, R.; BUENO, S.; ARRAIGADA, C.; VALDÉS, J.; SILVER, S.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 97-105, 2003.

BERTHELOT, D.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. Temperatures studies of iron-oxidizing autotrophs and acidophilic heterotrophs isolated from uranium mines. **Canadian Journal Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 384-388, 1993.

BEUDEKER, R. F.; KERVER, J. W. M.; KUENEN, J. G. Occurrence, structure and function of intracellular polyglucose in the obligate chemolithotroph *Thiobacillus neapolitanus*. **Archives of Microbiology**, v. 129, p. 221-226, 1981.

BEVILAQUA, D. **Solubilização da calcopirita (CuFeS₂) e da bornita (Cu₅FeS₄) por *Thiobacillus ferrooxidans***. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v.38, p. 587-592, 2002.

BJELLQVIST, B.; PASQUALI, C.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. **Electrophoresis**, v. 14, p. 1357-1365, 1993.

BLAKE II, R. C.; SHUTE, E. A.; HOWARD, G. T. Solubilisation of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite and sulfur. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 3349-3357, 1994.

BLAKE II, R. C.; SASAKI, K.; OHMURA, N. Does aporusticyanin mediate the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite? **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 357-372, 2001.

BOON, M. The mechanism of “direct” and “indirect” bacterial oxidation of sulphide minerals. **Hydrometallurgy**, v. 62, n. 1, p. 67-70, 2001.

BOSECKER, K. Bioleaching metal solubilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 591-604, 1997.

BOUCHAL, P.; ZDRÁHAL, Z.; HELÁNOVÁ, S.; JANICZEK, O.; HALLBERG, K. B.; MANDL, M. Proteomics and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 6, p. 4278-4285, 2006.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRIERLEY, C. L. Bacterial leaching. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 207-262, 1978.

BROCK, T. D.; GUSTAFSON, J. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 567-571, 1976.

BRUSCELLA, P.; APPIA-AYME, C.; LEVICÁN, G.; RATOUCHEIAK, J.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S.; BONNEFOY, V. Differential expression of two *bc1* complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. **Microbiology**, v. 153, p. 102-110, 2007.

- BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 2, p. 165-173, 1987.
- CAMPISANO, A.; SCHROEDER, C.; SCHEMIONEK, M.; OVERHAGE, J.; REHM, B. H. PsID is a secreted protein required for biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 3066-3068, 2006.
- CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.
- CHI, A.; VALENZUELA, L.; BEARD, S.; MACKEY, A. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; JEREZ, C. A. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 12, 2239-2251, 2007.
- CHUANG, S. E.; BURLAND, V.; PLUNKETT III, G.; DANIELS, D. L.; BLATTNER, F. R. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hsITS/ibpSB* and *hsIVU* operon in *Escherichia coli*. **Genes**, v. 134, p. 1-6, 1993.
- COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.
- COZZONE, A. J. Protein phosphorylation in prokaryotes. **Annual Review of Microbiology**, v. 42, p. 97-125, 1988.
- CRUNDWELL, F. K. How do bacteria interact with minerals? **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 75-81, 2003.
- CURUTCHET, G.; DONATI, E. Iron-oxidizing and leaching activities of sulphur-grown *Thiobacillus ferrooxidans* cell on other substrates: effect of culture pH. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 1, p. 57-61, 2000.
- DARWIN, A. J. The phage-shock-protein response. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 621-628, 2005.
- DAS, A.; MODAK, J. M.; NATARAJAN, K. A. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Mineral Engineering**, v. 10, n. 7, p. 743-749, 1997.
- DE, G. C.; OLIVER, D. J.; PESIC, B. M. Effect of heavy metals on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 44, n. 1-2, p. 53-63, 1997.
- DE MOT, R.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 960-967, 1989.
- DEMPLE, B.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F. Redox redux: the control of oxidative stress responses. **Cell**, v. 67, p. 837-839, 1991.
- DEUTSCHER, J.; SAIER, M. H. Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria – for long time neglected, now well established. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 125-131, 2005.
- DEVASIA, P.; NATARAJAN, K. A.; SATHYANARAYANA, D. N.; RAO, G. R. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4051-4055, 1993.

DEW, D. W.; MUHLBAUER, R.; VAN BUUREN, C. Bioleaching of copper sulphide concentrates with mesophiles and thermophiles. In: ALTA 1999 COPPER SULPHIDES SYMPOSIUM, 1999, Brisbane. **[Proceedings...]**. Melbourne: Alta, 1999. CD-Rom.

DISPIRITO, A. A.; SILVER, M.; VOSS, L.; TUOVINEN, O. H. Flagella and pilli of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from a uranium mine in northern Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 1196-1200, 1982.

DREIER, J.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 21, n. 3, p. 237-254, 2007.

DUXBURY, T.; BICKNELL, B. Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 243-250, 1983.

EHRLICH, H. L. **Geomicrobiology**. New York: Marcel Dekker, 2002.

FELÍCIO, A. P.; GARCIA JUNIOR, O.; BETOLINI, M. C.; OTTOBONI, L. M. M.; NOVO, M. T. M. The effects of copper ions on the synthesis of periplasmic and membrane proteins in *Acidithiobacillus ferrooxidans* as analyzed by SDS-PAGE and 2D-PAGE. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 165-171, 2003.

FELÍCIO, A. P.; OLIVEIRA, E. de; ODENA, M. A.; GARCIA JUNIOR, O.; BETOLINI, M. C.; FERRAZ, L. F. C.; REIS, F. de C.; OTTOBONI, L. M. M.; NOVO, M. T. M. Chalcopyrite and bornite differentially affect protein synthesis in planktonic cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Advanced Materials Research**, v. 20-21, p. 461-464, 2007.

FEY, A.; EICHLER, S.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M. G.; GUSZMÁN, C. A. Establishment of a Real-Time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3618-3623, 2004.

FREY, P. A. Radical mechanisms of enzymatic catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 121-148, 2001.

GARCIA, A.; JEREZ, C. A. Changes on the solid-adhered populations of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* in leaching ores as determined by immunological analysis. In: JEREZ, C. A.; VARGAS T.; WIERTZ, J. V. **Biohydrometallurgical processing**. Santiago: University of Chile, 1995. p. 19-30.

GARCIA JUNIOR, O. Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 1-6, 1991.

GARCIA JUNIOR, O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 508-514, 1995a.

GARCIA JUNIOR, O.; BIGHAM, J. M.; TUOVINEN, O. H. Sphalerite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 578-584, 1995b.

- GEHRKE, T.; HALLMANN, R.; SAND, W. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. In: JEREZ, C. A.; VARGAS T.; WIERTZ, J. V. **Biohydrometallurgical processing**. Santiago: University of Chile, 1995. v. 1, p. 1-11.
- GEHRKE, T.; TELEGDI, J.; THIERRY, D.; SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2743-2747, 1998.
- GIANAZZA, E.; GIACON, P.; SAHLIN, B.; RIGHETTI, P. G. Non-linear pH courses with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 6, p. 53-56, 1985.
- GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.
- GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.
- GYGI, S. P.; CORTHALS, G. L.; ZHANG, Y.; ROCHON, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v. 97, n. 17, p. 9390-9395, 2000.
- HABASHI, F. **Chalcopyrite-its chemistry and metallurgy**. New York: MacGraw-Hill, 1978.
- HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.
- HE, Z.; HU, Y.; ZHONG, H.; HU, W.; XU, J. Preliminary proteomic analysis of *Thiobacillus ferrooxidans* growing on elemental sulphur and Fe^{2+} separately. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 3, p. 307-313, 2005a.
- HE, Z.; ZHONG, H.; HU, Y.; XIAO, S.; LIU, J.; XU, J.; LI, G. Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 545-549, 2005b.
- HEINHORST, S.; BAKER, S. H.; JOHNSON, D. R.; DAVIES, P. S.; CANNON, G. C.; SHIVELY, J. M. Two copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. **Current Microbiology**, v. 45, p. 115-117, 2002.
- HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 436.
- JENSEN, A. B.; WEBB, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 225-236, 1995.
- JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acidic mine waters. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 466-473, 2003.
- KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 511-516, 2000.

KENNELLY, P. J. Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 1-8, 2002.

KLEIN, G.; DARTIGALONGUE, C.; RAINA, S. Phosphorylation-mediated regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 269-285, 2003.

KOBAYASHI, R.; SUZUKI, T.; YOSHIDA, M. *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 100-109, 2007.

KOCK, D.; SCHIPPERS, A. Geomicrobiological investigation of two different mine waste tailings generating acid mine drainage. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1-4, p. 167-175, 2006.

KUSANO, T.; TAKESHIMA, T.; INOUE, C.; SUGAWARA, K. Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 7313-7323, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANDRY, F.; LOMBARDO, C. R.; SMITH, J. W. A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection. **Analytical Biochemistry**, v. 279, n. 1, p. 1-8, 2000.

LANE, D. J.; HARRISON, A. P.; STAHL, D.; PACE, B.; GIOVANNONI, S. J.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 269-278, 1992.

LÁZARO, I.; MARTÍNEZ-MEDINA, N.; RODRÍGUEZ, I.; ARCE, E.; GONZÁLEZ, I. The use of carbon paste electrodes with non-conducting binder for the study of minerals: chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 38, n. 3, p. 277-287, 1995.

LEDUC, L. G.; TREVORS, J. T.; FERRONI, G. D. Thermal characterization of different isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, n. 2, p. 189-194, 1993.

LEE, J.; SPECTOR, D.; GODON, C.; LABARRES, J.; TOLEDANO, M. B. A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 4537-4577, 1999.

LINDAHL, R. Aldehyde dehydrogenase and their role in carcinogenesis. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 283-335, 1992.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIZAMA H. M.; SUZUKI, I. Interaction of chalcopyrite and sphalerite with pyrite during leaching by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 304-311, 1991.

LOHMAN, T. M.; FERRARI, M. E. *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 527-570, 1994.

LUNDGREN, D. G.; SILVER, M. Ore leaching by bacteria. **Annual Reviews Microbiology**, v. 34, p. 263-283, 1980.

LUNDGREN, D. G.; MALOUF, E. E. Microbial extraction and concentrations of metals. **Advances in Biotechnological Processes**, v. 1, p. 223-249, 1983.

MACEK, B.; GNAD, F.; SOUFI, B.; KUMAR, C.; OLSEN, J. V.; MIJAKIVIC, I.; MANN, M. Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 299-307, 2008.

MacKINTOSH, M. W. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of General Microbiology**, v. 105, p. 215-218, 1978.

MAGNIN, J.; BAILLET, F.; BOYER, A.; ZLATEV, R.; LUCA, M.; CHERUY, A.; OZIL, P. Augmentation, par régénération électrochimique du substrat, de la production d'une biomasse (*Thiobacillus ferrooxidans* DSM583) pour un procédé biologique de récupération de métaux. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 76, p. 978-984, 1998.

MARCHITTI, S. A.; DEITRICH, R. A.; VASILIOU, V. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. **Pharmacological Reviews**, v. 59, p. 125-150, 2007.

MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 3, p. 669-678, 2005.

MATIN, A.; RITTENBERG, S. Enzymes of carbohydrate metabolism in *Thiobacillus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 107, p. 179-186, 1971.

MEYER, R. R.; LAINE, P. S. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. **Microbiology Review**, v. 54, n. 4, p. 342-380, 1990.

MURTHY, K. S. N.; NATARAJAN, K. A. The role of surface attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on the biooxidation of pyrite. **Minerals and Metallurgical Processing**, v. 9, p. 20-24, 1992.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic local alignment search tool**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 01 ago. 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Entrez, the life sciences search engine**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>>. Acesso em: 04 jul. 2006.

NICOLET, Y.; DRENNAN, C. L. AdoMet radical proteins-from structure to evolution-alignment of divergent protein sequences reveals strong secondary structure element conservation. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 13, p. 4015-4025, 2004.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 730-750, 1999.

- NIMMO, H. G. Control of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase: an example of protein phosphorylation on a prokaryote. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, n. 11, p. 475-478, 1984.
- NOVO, M. T. M. **Clonagem molecular do determinante genético de resistência ao manganês do *Thiobacillus ferrooxidans* em *Escherichia coli***. 1993. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Genética) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- NOVO, M. T. M.; GARCIA JUNIOR, O.; OTTOBONI, L. M. M. Protein profile of *Acidithiobacillus ferrooxidans* exhibiting different levels of tolerance to metal sulfates. **Current Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 492-496, 2003.
- NOVO, M. T. M.; SOUZA, A. P. de; GARCIA JUNIOR, O.; OTTOBONI, L. M. M. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 91-95, 1996.
- NOVO, M. T. M.; SILVA, A. C. da; MORETO, R.; CABRAL, P. C. P.; COSTACURTA, A.; GARCIA JUNIOR, O.; OTTOBONI, L. M. M. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 187-195, 2000.
- OHMURA, N.; TSUGITA, K.; KOIZUMI, J.; SAIKA, H. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5776-5780, 1996.
- OHMURA, N.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, N.; SAIKI, H. Anaerobic respiration using Fe^{3+} , S^0 , e H_2 in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 2081-2087, 2002.
- PAULINO, L. C.; MELLO, M. P.; OTTOBONI, L. M. M. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Electrophoresis**, v. 23, n. 4, p.520-527, 2002.
- PIVOVAROVA, T. A.; GOLOVACHEVA, R. S. Microorganisms important for hydrometallurgy: citology, physiology and biochemistry. In: KARAVAIKO, G. I.; GROUDEV, S. N. **Biogeochemistry of metals**. Moscow: Centre of International Projects, 1985. p. 27-55.
- PLATAFORMES TECNOLÒGIQUES. **Plataforma de Proteômica**. Disponível em <<http://www.pcb.ub.es/homePCB/live/es/p1249.asp>>. Acesso em: 25 jul. 2008.
- POGLIANI, C.; DONATI, E. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 88-92, 1999.
- PRICE, D. W.; WARREN, G. W. The influence of silver ion on the electrochemical response of chalcopyrite and other mineral sulfide electrodes in sulfuric acid. **Hydrometallurgy**, v. 15, n. 3, p. 303-324, 1986.
- PRONK, J. T.; LIEM, K.; BOS, P.; KUENEN, J. G. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2063-2068, 1991a.
- PRONK, J. T.; MEIJER, W. M.; HAZEU, W.; VAN DIJKEN, J. P.; BOS, P.; KUENEN, J. G. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 2057-2062, 1991b.

PSORT PREDICTION. **Prediction of protein sorting signals and localization sites in amino acid sequences**. Disponível em: <<http://psort.hgc.jp/form.html>>. Acesso em: 24 jan. 2007.

QUATRINI, R.; APPIA-AYME, C.; DENIS, Y.; RATOUCHNIAK, J.; VELOSO, F.; VALDES, J.; LEFIMIL, C.; SILVER, S.; ROBERTO, F.; ORELLANA, O.; DENIZOT, F.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D.; BONNEFOY, V. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1-4, p. 263-272, 2006.

RAMÍREZ, P.; TOLEDO, H.; GUILIANI, N.; JEREZ, C. A. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1837-1845, 2002.

RAMÍREZ, P.; GUILIANI, N.; VALENZUELA, L.; BEARD, S.; JEREZ, C. A. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4491-4498, 2004.

RAWLINGS, D. E. Nutritional requirements of the microorganisms active in the oxidation of ferrous iron in acid mine leach liquors. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 267-275, 1981.

RAWLINGS, D. E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 187-201, 2001.

RAWLINGS, D. E. Heavy metal mining using microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 65-91, 2002.

RAWLINGS, D. E. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 13, p. 1-15, 2005.

RODRÍGUEZ, Y.; BALLESTER, A.; BLASQUEZ, M. L.; GONZALEZ, F.; MUNOZ, J. A. New information on the chalcopirite bioleaching mechanism at low and high temperature. **Hydrometallurgy**, v. 71, n. 1-2, p. 47-56, 2003.

RODRIGUEZ-LEIVA, M.; TRIBUTSH, H. Morphology of bacterial leaching patterns by *T. ferrooxidans* on synthetic pyrite. **Archives of Microbiology**, v. 149, n. 5, p. 401-405, 1988.

RODRIGUEZ-MONTELONGO, L.; DE LA CRUZ-RODRIGUEZ, L.; FARIAS, R. N.; MASSA, E. M. Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1144, p. 77-84, 1993.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; TRIBUTSCH, H. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 815-824, 2000.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; GIERSIG, M.; TRIBUTSCH, H. Sulphur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation. **Archives of Microbiology**, v. 163, p. 352-356, 1995.

ROJAS-CHAPANA, J. A.; GIERSIG, M.; TRIBUTSCH, H. The path of sulfur during the bio-oxidation of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. **Fuel**, v. 75, n. 8, p. 923-930, 1996.

- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. **Primer3**: v.0.4.0 Pick primers from a DNA sequence. 2007. Disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/>>. Acesso em: 08 fev. 2007.
- RUTTER, W. J. Evolution of aldolase. **Federation Proceedings**, v. 23, p. 1248-1257, 1964.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3 th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAMPSON, M. I.; PHILLIPS, C. V.; BLAKE II, R. C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 4, p. 373-389, 2000.
- SAND, W.; GERKE, T.; HALLMANN, R.; SCHIPPERS, A. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism-a critical evaluation of bacterial leaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 961-966, 1995.
- SAND, W.; GERKE, T.; JORZA, P. G.; SCHIPPERS, A. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 159-175, 2001.
- SCHIPPERS, A.; NERETIN, L. N. Quantification of microbial communities in near-surface and deeply buried marine sediments on the Peru continental margin using real-time PCR. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1251-1260, 2006.
- SEEGER, M.; JEREZ, C. A. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1-3, p. 37-41, 1993.
- SEGAL, G.; RON, E. Z. Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annual of New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 147-151, 1998.
- SELKOV, E.; OVERBEEK, R.; KOGAN, Y.; CHU, L.; VONSTEIN, V.; HOLMES, D.; SILVER, S.; HASELKORN, R.; FONSTEIN, M. Functional analysis of gapped microbial genomes: amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n. 7, p. 3509-3514, 2000.
- SHARMA, P. K.; DAS, A.; RAO, K. H.; NATARAJAN, K. A.; FORSSBERG, K. S. E. Surface characterization of *Thiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. In: CIMINELLI, V. S. T.; GARCIA JUNIOR, O. **Biohydrometallurgy**: fundamentals, technology and sustainable development, part B: Biosorption and Bioremediation. Amsterdam: Elsevier, 2001. p. 589-598.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- SHIVELY, J. M.; VAN KEULEN, G.; MEIJER, W. G. Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 191-230, 1998.
- SIGNALP 3.0 SERVER. **Center for biological sequence analysis**. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>. Acesso em: 10 ago. 2007.
- SILVER, S.; TORMA, A. E. Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 141-147, 1974.

SIMPSON, R. J. **Proteins and proteomics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

SINGH, O. V.; NAGARAJ, N. S. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. **Briefings in Functional Genomic and Proteomic**, v. 4, n. 4, p. 355-362, 2006.

SMITH, A. J.; LONDON, J.; STAINER, R. Y. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and *Thiobacilli*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, p. 972-983, 1967.

SMITH, J. R.; LUTHY, G. R.; MIDDLETON, A. C. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 60, p. 518-530, 1988.

SOFIA, H. J.; CHEN, G.; HETZLER, B. G.; REYES-SPINDOLA, J. F.; MILLER, N. E. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 5, p. 1097-1106, 2001.

SOMASUNDARAN, P.; REN, Y.; RAO, M. Y. Applications of biological processes in mineral processing. **Colloid Surfaces A**, v. 133, p. 13-23, 1998.

STICHT, H.; RÖSCH, P. The structure of iron-sulfur proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 70, p. 95-136, 1998.

SUNKAR, R.; BARTELS, D.; KIRCH, H. H. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **Plant Journal**, v. 35, p. 452-464, 2003.

TAKAHASHI, Y.; NAKAMURA, M. Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. **Journal of Biochemistry**, v. 126, p. 917-926, 1999.

TETAZ, T. J.; LUKE, R. K. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 3, p. 1263-1268, 1983.

THE COMPREHENSIVE MICROBIAL RESOURCE. **Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270 Genome Page**. Disponível em: <<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>>. Acesso em: 20 ago. 2006.

THIRD, K. A.; CORD-RUWISCH, R.; WATLING, H. R. The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching. **Hidrometallurgy**, v. 57, n. 3, p. 225-233, 2000.

THURMAN, R. B.; GERBA, C. P. The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 18, p. 295-315, 1989.

TRIBUTSCH, H. Direct versus indirect bioleaching. **Hidrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 177-185, 2001.

TRIBUTSCH, H.; ROJAS-CHAPANA, J. A.; BÄRTELS, C. C.; ENNAOUI, A.; HOFMANN, W. Role of transient iron sulfide films in microbial corrosion of steel. **Corrosion**, v. 54, n. 3, p. 216-227, 1998.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membranes filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, v. 88, n. 4, p. 285-298, 1973.

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUSHUJA, H. M. Nitrogen requirements of iron- oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 954-958, 1979.

TUOVINEN, O. H.; BHATTI, T. M.; BIGHAM, J. M.; HALLBERG, K. B.; GARCIA JUNIOR, O.; LINDSTROM, E. B. Oxidative dissolution of arsenopyrite by mesophilic and moderately thermophilic acidophiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3268-3274, 1994.

UNLÜ, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, n. 11, p. 2071-2077, 1997.

VALDÉS, J.; PEDROSO, I.; QUATRINI, R.; HALLBERG, K. B.; VALENZUELA, P. D. T.; HOLMES, D. S. Insights into the metabolism and ecophysiology of three *Acidithiobacilli* by comparative genome analysis. **Advanced Materials Research**, v. 20-21, p. 439-442, 2007.

VAN DER WESTEN, H. M.; MAYHEW, S. G.; VEEGER, C. Separation of hydrogenase from intact cells from *Desulfovibrio vulgaris*. **FEBS Letters**, v. 86, n. 1, p. 122-126, 1978.

VAN DEN BERGH, G.; ARCKENS, L. Recent advances in 2D electrophoresis: an array of possibilities. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 2, p. 243-252, 2005.

VARELA, P.; JEREZ, C. A. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, n. 1-3, p. 149-153, 1992.

VAUGHAN, D. J.; CRAIG, J. R. **Mineral chemistry of metal sulfides**. Cambridge: Cambridge University Press, 1978.

VAUGHAN, D. J.; BECKER, U.; WRIGHT, K. Sulphide mineral surfaces: theory and experiment. **International Journal Mineral Processing**, v. 51, n. 1-4, p. 1-14, 1997.

VERA, M.; GUILIANI, N.; JEREZ, C. A. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Hydrometallurgy**, v. 71, p. 125-132, 2003.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**, v. 276, n. 1, p. 59-64, 1999.

VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. p. 268.

WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, n. 1-2, p. 81-88, 2006.

WEISSNAN, J. S.; KASHI, Y.; FENTON, W. A.; HORWICH, A. L. GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. **Cell**, v. 78, p. 693-702, 1994.

YARZÁBAL, A.; BRASSEUR, G.; BONNEFOY, V. Cytochromes c of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 189-195, 2002.

YARZÁBAL, A.; APPIA-AYME, C.; RATOUCCHNIAK, J.; BONNEFOY, V. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2113-2123, 2004.

YOO, S. J.; SHIM, Y. K.; SEONG, I. S.; SEOL, J. H.; KANG, M. S.; CHUNG, C. H. Mutagenesis of two N-terminal Thr and five Ser residues in HsIV, the proteolytic component of the ATP-dependent HsIVU protease. **FEBS Letters**, v. 412, p. 57-60, 1997.

YOUNG, J. C.; AGASHE, V. R.; SIEGERS, K.; HARTL, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 781-791, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo científico “Chalcopyrite and bornite differentially affect protein synthesis in planktonic cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*” publicado na Advanced Materials Research, v. 20-21 (Biohydrometallurgy: from the single cells to the environment), p. 461-464, 2007, Trans Tech Publications, Switzerland, <http://www.scientific.net>.

“Chalcopyrite and bornite differentially affect protein synthesis in planktonic cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*”

Ana P. Felício^{1,a}, Eliandre de Oliveira^{2,b}, Maria A. Odena^{2,c}, Oswaldo Garcia Jr^{1,d}, Maria C. Bertolini^{1,e}, Lúcio F.C. Ferraz^{3,f}, Fernanda C. Reis^{3,g}, Laura M.M. Ottoboni^{3,h} and Maria T.M. Novo^{4,i}

¹ Institute of Chemistry-São Paulo State University, Araraquara-SP, Brazil; ² Proteomics Platform-Barcelona Science Park, Barcelona, Spain; ³ Center of Molecular Biology and Genetic Engineering, Campinas State University, Campinas-SP, Brazil; ⁴ Department of Genetics and Evolution-São Carlos Federal University, São Carlos-SP, Brazil

^aanafelic@iq.unesp.br, ^beoliveira@pcb.ub.es, ^cmaodena@pcb.ub.es, ^doswaldo@iq.unesp.br, ^emcbertol@iq.unesp.br, ^fluc_ferraz@yahoo.com.br, ^greis@unicamp.br, ^hottoboni@unicamp.br, ⁱmarinovo@power.ufscar.br

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, chalcopyrite, bornite, two-dimensional gel electrophoresis, differential proteomic analysis

Abstract. *Acidithiobacillus ferrooxidans* is used in bioleaching industrial operations to recover metal ions from mineral sulfides. Chalcopyrite and bornite are copper sulfides that have the same elemental composition, but differ in their susceptibility to the bioleaching process. Our objective was to identify differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* LR cells exposed to chalcopyrite or bornite, as a sole energy source, for 24 hours. Compared to the control (without minerals), proteins were induced or repressed in planktonic cells after contact with chalcopyrite or bornite by 24 hours. These results demonstrated that the time of

exposure to the copper minerals was enough to trigger distinct responses in the *A. ferrooxidans* metabolism.

Introduction

Acidithiobacillus ferrooxidans is a bacterium used in leaching operations to recover metals such as copper, uranium and gold from mineral sulfides. Chalcopyrite (CuFeS_2) and bornite (Cu_5FeS_4) are common copper sulfides found in nature. Unlike many minerals, chalcopyrite is known to be particularly recalcitrant to hydrometallurgical processes. Chalcopyrite and bornite have the same elemental composition, but differ in their susceptibility to the bioleaching process, probably due to different crystalline structures. A partial proteomic approach has been used to study adaptive responses of *A. ferrooxidans* to attack some mineral ores [1]. The purpose of this work was to identify differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* cells exposed to chalcopyrite or bornite for 24 hours by coupling two-dimensional electrophoresis (2-DE) and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and/or ESI-MS-MS. The identification of these proteins of *A. ferrooxidans* could provide a better understanding about the metabolic processes involved in chalcopyrite and bornite bacterial oxidation.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions. *A. ferrooxidans* strain LR used in this work was isolated from effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, State of Bahia, Brazil [2]. The cells were grown in T & K liquid medium [3] containing (in g L^{-1}): (0.4) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; (0.4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; (0.4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (33.4) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 1.8 (adjusted with sulfuric acid) at 30°C on a rotary shaker at 250 rpm. The protein profile of *A. ferrooxidans* cells was analyzed in the presence of 2.5% (w/v) of the pulverized: bornite (from Montana, USA, provided by Ward's Natural Science Establishment) or chalcopyrite (provided by Vale do Rio Doce Company, Brazil), as a sole energy source, in T & K medium (without ferrous ion) at 250 rpm and 30°C. The minerals were ground in a disc mill to 100% <0.2 mm mesh size.

Protein extraction. *A. ferrooxidans* cells were grown in T & K medium (with ferrous ion) harvested at the end of the growth exponential phase and incubated under agitation in presence of chalcopyrite or bornite (2.5%), as a sole energy source. Cells grown in T & K medium with Fe^{2+} and without the minerals were used as control. After 24 hours of contact, mineral particles were separated from medium at 700 rpm (Sorvall TR7 centrifuge) for 1

minute. Planktonic cells (not attached on the mineral) were collected by centrifugation at 3,900 rpm for 20 minutes. Total proteins were obtained as described by De Mot & Vanderleyden [4] with some modifications. Briefly, cells were suspended in extraction buffer (0.7 Mol sucrose, 0.5 Mol Tris, 30 mMol HCl, 50 mMol EDTA, 0.1 Mol KCl, 40 mMol dithiothreitol) and an equal volume of equilibrated phenol (Invitrogen) was added. After shaking, the phenol phase containing the proteins was recovered and the extraction procedure was repeated twice. Proteins were precipitated by addition of 0.1 Mol ammonium acetate in methanol at -20°C . The pellet was washed and solubilized in lysis buffer (9.5 Mol urea, 2% Igepal CA-630, 5% β -mercaptoethanol). The extracts were purified by protein precipitation using the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Protein was quantified by the Bradford method [5] using bovine serum albumin as standard. The experiment was performed in triplicates.

Two-dimensional (2-D) electrophoresis and image analysis. Total proteins were separated by 2D-PAGE using the IPGphorTM isoelectric focusing and the HoeferTM SE600 second dimension systems (GE Healthcare). Approximately 250 μg of total proteins were added in 250 μL of solution containing 170 μL of dehydration buffer (8 Mol urea, 2% (w/v) Triton X-100, Bromophenol Blue, 2.8 mg mL^{-1} DTT), 2% IPGbuffer and 50 μL of DeStreak solution (GE Healthcare). The first dimension was carried out in strips with immobilized pH gradient from 4 to 7 (linear). After 10 hours of rehydration (without voltage) the isoelectric focusing was performed for 1 h at 500 V, 1 h at 1000 V and 5 h at 8000 V, with 50 μA per strip at 20°C . The second dimension was run at 45 mA per strip on 12.5% polyacrilamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 and the isoelectric point and molecular weight of differentially expressed proteins were determined with the Image Master Platinum software (GE Healthcare).

Mass spectrometry analysis and database search. Differentially expressed proteins were in-gel digested with trypsin (Sequencing grade modified, Promega) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions. Proteins were reduced by 10 mMol DTT and alkylated by 100 mMol solution of iodine acetamide. After sequential washings, proteins were digested overnight at 37°C with 0.27 nMol of trypsin. Tryptic peptides were extracted from the gel matrix with 10% formic acid and acetonitrile; the extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge. Tryptic peptides were either analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) and/or ESI-MS-MS (Q-TOF Global, Micromass-Waters). In the first case, the digests were resuspended in 10 μL of 0.1%TFA. 5 μL cleaned up and concentrated in microcolumns (3M) and eluted directly on

MALDI plate with 0.8 μL HCCA ($2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ in 70% acetonitrile/ 0.1%TFA). Most intense peaks were selected to be characterized further by MS/MS analysis. Spectra were submitted for database searching in a generic MASCOT format. Some of the tryptic digested peptides samples were analyzed by on-line liquid chromatography tandem mass spectrometry (Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). In that cases, samples were resuspended in 15 μL of 1% formic acid solution and 4 μL were inject to chromatographic separation into reverse-phase capillary C_{18} column (75 μm of id and 15 cm length, PepMap column, LC Packings). Data were generated in PKL file format, which were submitted for search in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 database (<http://www.tigr.org>) to identify the proteins.

Results and Discussion

A. ferrooxidans LR total protein profiles after contact with the minerals. In comparison with the control (Fig 1A) the general pattern of protein synthesis showed differentially expressed proteins in response to contact with chalcopyrite or bornite for 24 hours (Fig 1B and 1C, respectively). The molecular weight and isoelectric point of the differentially expressed proteins are described in Table1. Apparently spot 6 showed no alteration after contact with chalcopyrite (arrow in Fig 1B).

Although high quality MS/MS spectra were obtained via MS analysis of the digested peptides from spot 6, no protein could be identified. Since ATCC 23270 genome is completely sequenced, this could be attributed to differences between the genomes of LR (used in this study) and ATCC 23270 strains. Spot 4 was strongly repressed after contact with bornite (Fig 1C) or slightly repressed after contact with chalcopyrite (Fig 1B), in comparison to control (Fig 1A).

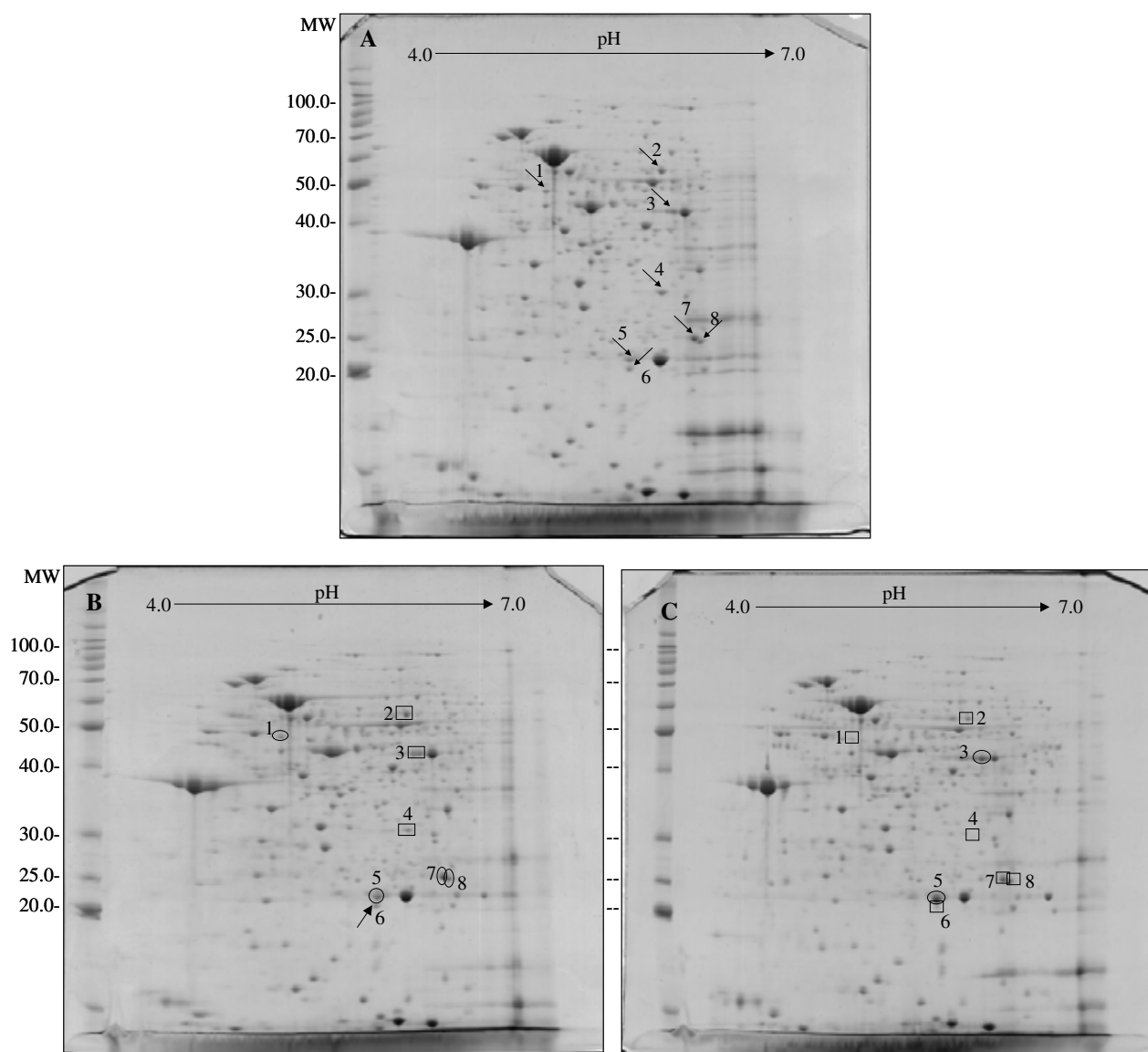


Figure 1. 2-D total protein profiles of *A. ferrooxidans* LR. Total proteins were extracted from cells without contact with the minerals (A) or after contact with 2.5% of chalcopyrite (B) or 2.5% of bornite (C) for 24 hours. Arrows in (A) indicate proteins that were induced or repressed after contact with the minerals. Circles and squares in (B) and (C) represent proteins whose synthesis was induced or repressed, respectively, after contact with minerals relative to the control (A). It was considered only alterations observed in at least two different gels. The molecular mass (kDa) of standard proteins is indicated.

Table 1. *A. ferrooxidans* LR proteins whose synthesis increased or decreased after contact with chalcopyrite or bornite for 24 hours

Spot	MW (kDa)/pI	Chalcopyrite* ¹	Bornite* ¹	Protein	Mascot score	Accession n ^o * ²
1	48.8/5.1	↑	↓	Heat shock protein HslVU	269	AFE_0358
2	50.5/5.7	↓	↓	Ribulose biphosphate carboxylase	370	AFE_0942
3	38.6/5.8	↓	↑	Fructose-biphosphate aldolase	419	AFE_3085
4	28.1/5.7	↓	↓	Ribosomal protein S2	302	AFE_1640
5	22.5/5.7	↑	↑	Antioxidant, AhpC/Tsa family	332	AFE_2062
6	20.0/5.9	-* ³	↓	-	-	-
7	22.2/5.9	↑	↓	Ribosomal protein L25	406	AFE_0952
8	23.2/5.9	↑	↓	Ribose 5-phosphate isomerase A	383	AFE_2410

*¹ Synthesis increase (↑) or decrease (↓) in cells after contact with minerals relative to levels in cells grown on Fe²⁺

*² Accession number according to *A. ferrooxidans* ATCC 23270 database (<http://www.tigr.org>)

*³ No change on synthesis

Some proteins had remarkable expression differences between chalcopyrite and bornite: fructose-biphosphate aldolase (spot 3) was induced by bornite and repressed by chalcopyrite, whereas heat shock protein HslVU (spot 1), ribosomal protein L25 (spot 7) and ribose 5-phosphate isomerase A (spot 8) were induced by chalcopyrite, and repressed by bornite.

Some authors [6] observed that synthesis of ribose-5-phosphate isomerase was increased in sulfur-grown *A. ferrooxidans* (isolated from Chengmensham Mine china Which) in comparison to the Fe²⁺-grown bacteria. The results in Fig 2B and 2C show that ribose-5-phosphate isomerase A (spot 8) of *A. ferrooxidans* LR was induced in chalcopyrite but repressed in bornite, but the reason for this result is no clear yet.

The cellular localization, predicted by PSORT-B analysis (<http://psort.hgc.jp/>) of differentially expressed proteins (Table 1) revealed that they are probably located in the cytoplasm. Our proteomic results demonstrated that exposure to the copper minerals, as a sole energy source, was enough to trigger distinct responses in the *A. ferrooxidans* LR metabolism. Proteomic analysis of *A. ferrooxidans* LR attached cells to chalcopyrite is in progress and will be compared with the planktonic cells analysis presented here.

Acknowledgments

We are very grateful to Vale do Rio Doce Company (CVRD), Brazil, which is funding a project to our Biohydrometallurgy group. Acknowledgements are also due to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research fellowships to OGJ, MCB and LMMO.

References

- [1] P. Ramírez, N. Guilian, L. Valenzuela, S. Beard and C.A. Jerez: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70 (2004), p. 4491
- [2] O. Garcia Jr.: *Rev. Microbiol.* Vol. 22 (1991), p 1
- [3] O.H. Tuovinen and D.P. Kelly: *Arch. Microbiol.* Vol 88 (1973), p 285
- [4] R. De Mot and J.Vanderleyden. *Can. J. Microbiol.*, Vol 35 (1989), p 960
- [5] M. Bradford: *Anal. Biochem.* Vol 72 (1976), p 248
- [6] Z. He, Y. Hu, H. Z, W. Hu and J. Xu: *J. Biochem. Mol. Biol.* Vol 38 (2004), p 307

APÊNDICE B

Trabalho científico “Differential Proteomic Analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Planktonic Cells Exposed to Bornite or Chalcopyrite Minerals”, em fase final de preparação a ser submetido para Proteomics.

“Differential Proteomic Analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Planktonic Cells Exposed to Bornite or Chalcopyrite Minerals”

Ana Paula Felício-Novello ⁽¹⁾; Eliandre de Oliveira ⁽²⁾; Maria Antonia Odena ⁽²⁾; Oswaldo Garcia Jr. ⁽¹⁾; Maria Célia Bertolini ⁽¹⁾; Lúcio Fábio Caldas Ferraz ⁽³⁾; Laura Maria Mariscal Ottoboni ⁽³⁾; Maria Teresa Marques Novo ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Institute of Chemistry - São Paulo State University - UNESP, Araraquara - SP, Brazil;

⁽²⁾ Proteomics Platform - Barcelona Science Park, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

⁽³⁾ Center of Molecular Biology and Genetic Engineering, University of Campinas - UNICAMP, 13083-875 Campinas - SP, Brazil;

⁽⁴⁾ Department of Genetics and Evolution - São Carlos Federal University - UFSCar, São Carlos - SP, Brazil.

Correspondence to: Dr. Maria Teresa Marques Novo; e-mail: marinovo@power.ufscar.br
Department of Genetics and Evolution - São Carlos Federal University - UFSCar
Rodovia Washington Luiz km 235, São Carlos, São Paulo/Brazil, 13565-905,
Phone: 55-16-33518376; Fax: 55-16-33518377.

Abbreviation: Q, quadrupole.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; bornite; chalcopyrite; proteomic analysis; two-dimensional gel electrophoresis

Abstract

Acidithiobacillus ferrooxidans is a chemoautotrophic bacterium able to oxidize ferrous iron or sulfides to obtain energy. Bornite and chalcopyrite are two copper sulfides having the same elemental composition but different susceptibility the bioleaching process. In this work, the oxidative activity of *A. ferrooxidans* cells on bornite and chalcopyrite was verified by respirometric assay and the bacterium adaptive response to these minerals was investigated by proteomic approach. Protein profiles of planktonic cells exposed for 24 or 48 h to bornite or chalcopyrite were compared to the one of cells not exposed to minerals. For bornite, we detected an induction for the proteins chaperonin (groEL), AhpC/Tsa family antioxidant and aldehyde dehydrogenase, whereas the proteins radical SAM domain, fructose-1-6-bisphosphatase, carbohydrate kinase, HslVU heat shock, ribulose bisphosphate carboxylase and the ribosomal proteins S2 and L25 were repressed. For the protein fructose-bisphosphate aldolase two forms having distinct isoelectric points were observed suggesting pos-translational modification of this protein in the *A. ferrooxidans* response to bornite. No significant alteration of the protein expression was detected for planktonic cells exposed to chalcopyrite. The results show that these minerals lead to distinct cellular responses in *A. ferrooxidans* and that a proteomic approach can provide a valuable tool better understand the global metabolic processes triggered when cells are exposed to them.

1 Introduction

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative, mesophilic, and chemolithoautotrophic bacterium capable to oxidize ferrous iron and reduced sulfur compounds to ferric iron and sulfuric acid, respectively. The energy derived from this oxidative process supports carbon dioxide fixation and cell growth. *A. ferrooxidans* is acidophilic and grows within the pH range 1.5-2.0 [1]. It is one of the most studied microorganisms found in acid environments such as mining dumps and acid mine drainages, and its ability to oxidize metal sulfides has been successfully applied to bioleaching operations [1]. *A. ferrooxidans* also oxidizes insoluble metal sulfides like bornite (Cu_5FeS_4) or chalcopyrite (CuFeS_2) converting them to soluble metal sulfate [2-5]. These minerals have the same elemental composition, but distinct crystalline structures [6]. Chalcopyrite, unlike bornite, is the most important mineral of commercial interest for copper extraction and is known to be recalcitrant to the bioleaching process [7]. The elucidation of the *A. ferrooxidans* energetic metabolism on mineral sulfides, in general, is of great interest to generate the knowledge for the improvement of the bioleaching process.

The genome of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is now available at “The Comprehensive Microbial Resource” website (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>),

and preliminary models of metabolic and regulatory features have been proposed based on the annotated sequence [8-9]. By proteomic analysis some authors showed that *A. ferrooxidans* changes its protein profile according to the growth on sulfur or ferrous iron [10-13]. An exported rhodanese-like protein (P21), a thiosulfate sulfur transferase (TST) that reduces S-S bonds present in thiosulfate generating sulfur and sulfite, is increased when *A. ferrooxidans* grows on metal sulfides and different sulfur compounds, but is almost completely repressed during growth on ferrous iron [10]. Ramirez *et al.* [11] described that during growth on metal sulfides containing iron, such as pyrite and chalcopyrite, proteins up-regulated on ferrous iron or sulfur compounds were synthesized. According to Ramírez *et al.* [11] the synthesis of some proteins like sulfate/thiosulfate binding protein, thiosulfate sulfur transferase, rusticyanin, RuBisCO subunits CbbS (small) and CbbL (large) among others was influenced by the energy source. Some proteins of *A. ferrooxidans* such as ATP synthase beta chain and ribose-5-phosphate isomerase [12], cytochrome *c*-552, sulfide dehydrogenase and an outer membrane protein [13] had their synthesis differentially influenced during growth of *A. ferrooxidans* either on elemental sulfur or ferrous iron.

Biological mechanisms involved in the response of *A. ferrooxidans* to bornite or chalcopyrite are still poorly understood. The purpose of the present work is to analyze the protein profile of *A. ferrooxidans* strain LR after exposition the planktonic cells to these copper sulfides. We found 13 proteins differentially expressed only when ferrous iron was replaced by for bornite. One of these proteins remained unidentified and was absent in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome and may be specific to the strain used in this work. The proteins identified were mainly involved in energetic metabolism, detoxification, and protein synthesis.

2 Materials and methods

2.1 Bacterium strain, culture conditions and mineral samples

The *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR used in this work was isolated from effluent of column leaching of uranium ore from Lagoa Real, Bahia State - Brazil [14]. Cells were grown at 30°C on a rotary shaker at 250 rpm in T & K liquid medium [15] containing (in g/L): (0.4) K₂HPO₄·3H₂O, (0.4) MgSO₄·7H₂O, (0.4) (NH₄)₂SO₄, (33.4) FeSO₄·7H₂O, pH 1.8 (adjusted with sulfuric acid). For proteomic analysis ferrous iron-grown cells in 100 mL of T & K medium (without ferrous iron) containing 2.5% (w/v) bornite or chalcopyrite at 250 rpm, 30°C were used. Control cells correspond to cells not exposed to the minerals. For respirometric assays and proteomic analysis it was used ore grade pulverized bornite from Montana, USA (purchased from Ward's Natural Science Establishment, Rochester - NY) and chalcopyrite

from Salobo Mine, Pará State - Brazil (purchased from Companhia Vale). The minerals were grounded in a disc mill to 100% < 0.2 mm mesh size.

2.2 Respirometry assay

A. ferrooxidans LR cells were harvested at the end of the growth exponential phase (approximately 24 h, time enough to oxidize 70% of the ferrous iron). Cell density was quantified by measuring the total protein in the cells suspension after lysing [16] using BSA as standard. The experiments were conducted in a Warburg respirometer in 25 mL flasks, the main compartment of each flask contained *A. ferrooxidans* cells corresponding to 300 µg/mL of total protein in 0.2 M glycine H₂SO₄ buffer, pH 2.2, and 100 mg of bornite or chalcopyrite. Control for each mineral sample was carried out without cells. The experiments were performed in triplicate in a water bath at 30°C for 4 h. The average of the oxygen uptake (µL) was plotted against time (min).

2.3 Protein extraction

A. ferrooxidans LR cells grown in 3 L of T & K medium (with ferrous iron) were harvested at the end of the growth exponential phase, washed in 0.01 M sulfuric acid, and suspended in 300 mL of T & K medium (without ferrous iron). A volume of 100 mL were added to 2.5 g bornite or chalcopyrite as sole energy source and incubated as described in Materials and Methods (Section 2.1). Cells grown in T & K medium (with ferrous iron) but not exposed to the mineral samples (100 mL) were used as control. After 24 or 48 h, mineral particles were separated from the cells by centrifugation (85 x *g*) for 1 min. Planktonic cells (not attached on the mineral) were collected from the supernatant by centrifugation at 2,800 x *g* for 20 min. Total protein from both (control and planktonic cells) was obtained as described by De Mot and Vanderleyden [17] with some modifications. Cells were suspended in extraction buffer (0.7 M sucrose, 0.5 M Tris-base, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 40 mM DTT) and an equal volume of phenol was added. After shaking, the phenolic phase containing the proteins was recovered and the extraction procedure was repeated twice. Proteins were precipitated by addition of 0.1 M ammonium acetate in methanol at -20°C, washed in 0.1 M ammonium acetate in methanol followed by washing in acetone 80%. After drying, the proteins were solubilized in lysis buffer (9.5 M urea, 2% (v/v) Igepal CA-630, 5% (v/v) β-mercaptoethanol), quantified by the Bradford method [18] using BSA as standard and purified by precipitation using 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). The protein extraction was performed in triplicate from cells obtained from independent experiments.

2.4 2-DE

Total protein was separated by IEF using IPGphor™ system (GE Healthcare) and pH 4-7 Immobiline™ DryStrip (13 cm, linear, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. Approximately 250 µg of total protein were added to 250 µL of a solution containing 170 µL of rehydration buffer (8 M urea, 2% (v/v) Triton X-100, 2.8 mg/mL DTT, a trace amount of Bromophenol Blue), 2% (v/v) IPGbuffer (GE Healthcare) and 50 µL of DeStreak™ rehydration solution (GE Healthcare). After 10 h of rehydration, IEF was conducted at 50 µA per strip at 20°C using the following steps: 500 V (1 h), 1,000 V (1 h) and 16,000 Vh for a total of 17,500 Vh. The IPG strips were equilibrated twice during for 15 min in 3 mL equilibration buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, a trace amount of Bromophenol Blue, 10 mg/mL DTT) [19-20]. The last equilibration was performed in the same buffer but containing 25 mg/mL iodoacetamide instead of DTT. Protein samples were separated in a second dimension on 12.5% SDS-PAGE gels at 45 mA per gel using a Hoefer™ SE600 system (GE Healthcare). The protein spots in the gels were visualized after staining with CBB R-250.

2.5 2-DE image analysis and gel comparison

2-DE gel images were acquired using the ImageScanner (GE Healthcare) at 150 dpi of resolution. Staining intensity value as % volume, molecular weight and isoelectric point were estimated for each protein spot using the ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 software (GE Healthcare).

Scatter plots (% volume) for the matching spot pools were obtained to verify the degree of reproducibility among the triplicates for each experiment (control, bornite or chalcopyrite). Correlation values superior to 0.9 were considered as significant for the analysis. Only typical spots present in all replicates were selected for the matching analysis between control and bornite, and between control and chalcopyrite. Matching was performed between the total protein of control-cells and cells after exposure to bornite or chalcopyrite for 24 or 48 h. Proteins up- or down-regulated after mineral exposure were selected for mass spectrometry analysis only if the variation between experiments was statistically significant by Student's t-test (with confidence level of 0.05 or less), as determined by the software.

2.6 Protein digestion, MS/MS analysis and database searching

The protein spots were excised from the gels for protein identification. The spots were in-gel digested with trypsin [21] (Sequencing grade modified, Promega) in the automatic Investigator ProGest Robot of Genomic Solutions. Briefly, excised spots were washed sequentially with ammonium bicarbonate buffer 50 mM (ABC) and ACN. Proteins were reduced and alkylated respectively, by treatment with 10 mM DTT during 30 min at 56°C, and treatment with 55 mM iodine acetamide. After sequential washings with buffer ABC and ACN, proteins were digested overnight at 37°C with 0.27 nM trypsin. Tryptic peptides were extracted from the gel matrix with 10% formic acid and ACN; the extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge. Tryptic peptides were either analyzed by MALDI-TOF-MS using a 4700 Proteomics Analyzer mass spectrometer (Applied Biosystems) and/or ESI-MS/MS using a Q-TOF Global system (Micromass-Waters).

MALDI-TOF-MS analysis: the digests were redissolved in 5 µL 0.1% TFA in 50% ACN. Typically, a 0.5 µL aliquot was mixed with the same volume of a matrix solution, 2 mg/mL CHCA (Waters) in 0.1% TFA and 50% ACN and directly spotted on a MALDI-plate. MS spectra were acquired in positive reflector mode (voltage of 20 kV in the source 1 and laser intensity ranged from 5800 to 6200). Typically, 500 shots *per* spectrum were accumulated. Three to five prominent peaks were selected to be further characterized by MS/MS analysis. MS/MS spectra were acquired using CID with atmospheric air as the collision gas. A MS/MS 1 kV positive mode was used. MS and MS/MS spectra from the same spot were merged in a single mgf file prior to submission for database searching.

ESI-MS/MS analysis: the tryptic digested peptide samples were analysed by online LC-MS/MS (Cap- LC-nano-ESI-Q-TOF) (CapLC, Micromass-Waters). Samples were resuspended in 15 mL 1% formic acid solution and 4 mL were injected for chromatographic separation into a RP capillary C18 column (75 mm id and 15 cm length, PepMap column, LC Packings). The eluted peptides were ionised *via* coated nano-ES needles (PicoTip™, New Objective). A capillary voltage of 2000–3000 V was applied together with a cone voltage of 80 V. The collision in the CID was 20–35 eV and argon was used as the collision gas. Data were generated in PKL file format and submitted for database searching.

Database searching: PKL and mgf files were submitted for database searching in a MASCOT search engine (in house). Database searches were done against the genome sequence data of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>). The search parameters were: 1 missed cleavage,

carbamidomethyl of cystein as fixed modification, and oxidation of methionine and Pyro-glu (N-term Q) as variable modifications. Peptide tolerance was 100 ppm and 0.25 Da, respectively for MS and MS/MS spectra. Peptides were considered as identified when the scoring value exceeded the identity or extensive homology threshold value calculated by MASCOT.

3 Results

3.1 Oxidative activity of *A. ferrooxidans* LR cells on bornite and chalcopyrite

Oxygen consumption by *A. ferrooxidans* strain LR was evaluated by respirometric assay in the presence of bornite or chalcopyrite as the sole energy source to show that this strain has oxidative activity on these minerals. The oxygen consumption was a result of the bacterial metabolism instead of the chemical oxidation since no oxygen consumption was detected in the absence of bacterial cells (Fig. 1). It is important to emphasize that in this condition the cells do not grow due to the absence of carbon dioxide, only the oxidative activity is maintained by the cells. The difference between the two curves can not be attributed to differences in the oxidation process by the cells in the presence of the two minerals as they were not added in molar equivalents.

3.2 Proteins differentially expressed under exposure to bornite or chalcopyrite

The response of *A. ferrooxidans* to bornite or chalcopyrite was analyzed by comparing the protein profiles obtained by two-dimensional gel electrophoresis of planktonic cells before (control) and after exposure to the mineral for 24 or 48 h. Previous experiments with control cells grown under agitation at 250 rpm for 24 or 48 h in the absence of the mineral did not show changes in the total protein profile, indicating that the differences on protein synthesis were not due to the agitation itself (results not shown). Changes on protein profile were investigated at a narrow pH range (4 to 7) to provide better resolution in the gels. In this pH range, approximately 300 to 400 protein spots could be visualized for control cells (Fig. 2A) or after bornite (Fig. 2B) or chalcopyrite (Fig. 2C) exposure for 24 h. Similar results were obtained for cells exposed to the minerals for 48 h (results not shown). Gels were run in triplicate and a relative volume (% volume as calculated by the ImageMaster software) for each spot was chosen to express the normalized spot abundance. Sample reproducibility using this parameter can be shown by the scatter plots (% volume/% volume) (Fig. 3), between replicates for the three conditions tested, control (Fig. 3A), after bornite (Fig. 3B) or chalcopyrite (Fig. 3C) exposition for 24 h. Similar results were obtained for 48 h (results not

shown). Only spots that were present in each of the triplicate and were typical by the scatter plots analysis were considered for the differential expression analysis.

We have detected thirteen proteins that showed significant differences on protein synthesis after bornite exposure (Fig. 4A and 4B). From the thirteen proteins differentially expressed, four were up-regulated, and nine were down-regulated in the presence of this mineral. All differentially expressed proteins had their isoelectric point (pI) values estimated among 5 to 6.5, whereas the molecular weight (MW) varied from 20 kDa to 70 kDa (Fig. 4A).

Differential spots were subjected to in gel trypsin digestion and analyzed by MALDI-TOF-MS mass spectrometry and/or ESI-MS/MS. From the thirteen spots analyzed, twelve were identified using the MASCOT software by searching the genomic sequence data of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Table 1). In general, the MW of the matched proteins on database (Table 1) was close to the values expected, estimated from the gel for each protein analyzed (Fig. 4A), and the theoretical pI/s remained between 5 and 6 (Table 1). Only for the spots 4, 7, 8 and 9 the deduced MW at the database was about 5 to 10 kDa smaller than the estimated value from the gel. The protein not identified (spot 11) was down-regulated by bornite, mainly after 24 h of exposure (Fig. 4). Despite of the high quality of the MS/MS spectra we were not able to identify this protein either by searching against sequences from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 at TIGR-CMR database (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>) or the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.org>). All the proteins differentially expressed in the presence of bornite showed the same alteration pattern in relation to control either after 24 or 48 h of exposure to the mineral (Table 1). In general, the alterations observed on protein synthesis after 24 h of exposure was maintained or even intensified after 48 h, mainly for the repressed proteins (Fig. 4). Approximately half of the differentially expressed proteins in response to bornite could be related to the energetic metabolism (Table 1) and all of them had their location predicted to be intracellular (Table 2). No significant change ($P > 0.05$ by Student's test-t) was detected when chalcopyrite was used as energy source for 24 or 48 h (Fig. 2, Table 1), based on our experimental approach.

4 Discussion

Bornite (Cu_5FeS_4) is a copper sulfide having the same elemental composition of chalcopyrite (CuFeS_2), however, the difference in crystalline structure of the minerals should be responsible for their distinct susceptibility to oxidation by *A. ferrooxidans*. Chalcopyrite is often described as the most refractory mineral to bacterial or chemical attack [22-24]. In fact, some reports have shown that the chalcopyrite leaching process is inhibited due to the formation of an elemental sulfur layer on the mineral surface [25-26]. The strain LR of *A. ferrooxidans* was chosen for this study based on the results of previous respirometric assays

which showed that strain is one of the most efficient strain in the bacterial oxidation of chalcopyrite or bornite (results not shown). This strain was also more tolerant to copper [27], the metallic ion present in chalcopyrite and bornite and delivered during mineral solubilization.

In this work the proteomic analysis was performed with cells exposed to the minerals for 24 or 48 h, a time not enough to achieve the exponential phase of growth mainly for chalcopyrite (results not shown). In this condition we were able to identify proteins involved in the early response of *A. ferrooxidans* when ferrous iron is exchanged to the metal sulfides bornite or chalcopyrite. Protein synthesis was only affected in the presence of bornite (Fig. 2 and 4), at least for proteins having isoelectric point between 4 and 7, the condition used in this work. The highest induction levels elicited by bornite were observed for chaperonin groEL and for an antioxidant protein, whereas a minor induction could be detected for the aldehyde dehydrogenase protein (Table 1 and Fig. 4). Molecular chaperones are known to mediate folding reaction [28] by blocking the self-association of denatured proteins that lead to aggregate formation [29-30]. The synthesis of groEL is described as induced by stress, such as heat shock [31], and its induction after exposure to bornite might be a consequence of its involvement in the correct folding of proteins important for the cells in this condition.

At high concentration of copper ions, a toxic effect is observed on cells of most microorganisms. This ion acts as an oxidant and forms chelates with organic molecules, including DNA and proteins [32]. This effect may involve the inactivation of enzymes, production of hydroperoxide free radicals by the membrane-bound copper, and disrupting cellular membrane integrity [33-34]. The AhpC/Tsa antioxidant family, also referred to as peroxiredoxin, is a large family of newly discovered peroxidases highly conserved from prokaryotes to eukaryotes. These proteins act reducing hydroperoxides with electrons donated by NADPH via thioredoxin or other thiol-containing intermediates [35]. Antioxidant defence mechanisms are induced as part of the global cellular adaptive responses to oxidative stress [36]. It is possible that exposure of *A. ferrooxidans* to bornite lead to a more stressing situation for the bacteria than the growth in ferrous iron or exposure to chalcopyrite. During solubilization of the bornite, a more soluble mineral than chalcopyrite, high levels of copper ions are delivered to the medium, which can stress the cells.

The enzyme aldehyde dehydrogenase belongs to a family of several isozymes that are important in the cellular defence mechanism against toxic exogenous aldehydes and endogenous aldehydes such as those derived from lipid peroxidation [37-38]. Aldehydes comprise a major portion of the lipid peroxidation products, and they are toxic because of their chemical reactivity [39]. The enhancement of the antioxidant defence seems to be one mechanism that organism utilize to reduce the oxidative stress [39].

Protein repression was observed for the ribosomal proteins S2 and L25, suggesting a

decrease in the protein synthesis when a less available energy source such as bornite is used instead of ferrous iron. Although no significant change was observed in the synthesis of proteins in presence of chalcopyrite (Table 1), Ferraz et al. (manuscript in preparation) were able to detect differentially expressed genes in response to chalcopyrite using RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) and real time quantitative PCR. The genes are related to protein degradation/ modification and transport systems.

Repression was also observed for the proteins annotated as ATPase subunit HslU of heat shock protein HslVU and the radical SAM domain protein. An unidentified protein (spot 11, 23 kDa), probably specific to the bacterium strain used in this work was also repressed. The protein HslVU is an ATP-dependent protease from the bacterial cytosol consisting of two heat shock proteins (HslV and HslU) [40]. Heat shock proteins were originally defined according to their increased expression in response to elevated temperature, heavy metals and oxidative stress [30]. Proteins having the radical SAM include a large number of bacterial enzymes which are characterized by the presence of an iron-sulfur (FeS) cluster and the use of *S*-adenosylmethionine (SAM) to carry out a reaction involving a 5'-deoxyadenosyl radical [41]. Proteins having the Fe-S cluster are involved in a number of cellular metabolic processes [41]. The Fe-S cluster functions as redox centers in electron transfer reactions, catalytic centers in nonredox enzymes, and sensors of Fe, O₂, and O₂⁻ in the regulation of metabolic pathways [42-43].

Protein repression was mainly observed for proteins involved in the energetic metabolism, such as fructose-1-6-bisphosphate, fructose-bisphosphate aldolase, carbohydrate kinase and ribulose bisphosphate carboxylase (Table 1). Among the proteins repression was more evident for fructose-bisphosphate aldolase, a 39 kDa protein (spot 4). Another protein having the same molecular weight but a close isoelectric point was also identified as fructose-bisphosphate aldolase both in the control and in the bornite exposed cells. The higher pI form was increased in the presence of bornite (spots 4 and 8, respectively) (Fig. 4, Table 1). Two forms of the enzyme fructose-bisphosphate aldolase could be isozymes differing in their isoelectric points. In fact, there are other ORFs in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome database annotated as fructose-bisphosphate aldolase. However, the mass spectrometry analysis indicated that the two proteins are unequivocally originated from the same ORF AFE_3085 (Table 1). Another possibility is that one of the two forms of the fructose-bisphosphate aldolase was originated by a post-translational modification, for example, protein phosphorylation. Additional experiments are necessary to confirm this. Although phosphorylation has been frequently described for eukaryotes, examples of this post-translational modification in prokaryotes have also been extensively described in literature since 1980 [44-47]. In support to the hypothesis of phosphorylation event in *A. ferrooxidans*, Novo et al. [27] have detected phosphorylation of cytosolic proteins

(one of them having molecular weight of about 40 kDa) in the same strain utilized in this work (strain LR). The result was observed in the presence of copper [27], the metal delivered to the medium during bornite solubilization. Although covalent modification or other regulatory mechanism for fructose-bisphosphate aldolase has not been described in *A. ferrooxidans* so far, the phosphorylation of this enzyme was reported for *Escherichia coli* [48].

The fructose-bisphosphate aldolase is known to be essential enzyme for the glycolysis and gluconeogenesis metabolic pathways, acting in the reversible catalysis of the fructose-1,6 bisphosphate in glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone-phosphate. This enzyme also participates of the Calvin Cycle [49], however this pathway seems not be so active in the presence of bornite, because the synthesis of the ribulose bisphosphate carboxylase (CbbL2) or RuBisCO, the first enzyme of the cycle, was repressed in this mineral (Table 1). The subunit CbbL of the ribulose bisphosphate carboxylase was also described to be repressed in *A. ferrooxidans* ATCC 19859 grown in sulfur, an insoluble substrate [11]. The Calvin Cycle is highly dependent on energy (NADPH and ATP), which might be not available when ferrous iron (control) is exchanged to bornite. Shively et al. [50] reported that the expression of the Calvin Cycle enzymes in chemoautotrophic organisms depend on the substrate to be oxidized. When inorganic oxidizable compounds are present, NADPH and NADH are synthesized in the respiration chain (revised by Rawlings [51]), which favors the formation of the NADPH-CbbR complex leading to a increase in the affinity of the CbbR transcriptional regulator to the promoters of the Calvin Cycle genes (operon *cbb*), and activating their transcription [50].

Considering that the enzyme fructose-bisphosphate aldolase was detected in two different pls we can speculate about the more active form of this enzyme during bornite oxidation by *A. ferrooxidans*. It is known that this enzyme participates in the glycolysis and gluconeogenesis pathways. Gluconeogenesis seems not be active as the enzyme fructose-1-6-bisphosphatase, known as an important regulatory enzyme was repressed by bornite (Table 1). Therefore the fructose-bisphosphate aldolase activity should be important for the glycolysis pathway to provide ATP for cellular processes in the presence of bornite. In this case the enzyme having lower pI is the most active form. Whether glycolysis is activated when this autotrophic bacterium is exposed to bornite the organic substrate glucose 6-phosphate should be provided for the cells in this situation. One possibility is that degradation of glycogen (glycogenolysis) becomes more active in the presence of bornite to provide glucose 6-phosphate, but our experimental approach didn't show any evidence of alteration in the synthesis of the glycogenolysis enzymes. Little is known about the glycogen metabolism in *A. ferrooxidans*, however candidate genes for glycogen biosynthesis and degradation have been identified in its genome sequence (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gtf>; [49]).

Glycogen might be stored when the cells grow in ferrous iron (before the bacterial exposure to bornite), when efficient CO₂ fixation by Calvin Cycle was possible [52]. The exchange of ferrous iron to bornite, an energetic substrate less bioavailable should activate glycogenolysis, which would not be as active during ferrous iron oxidation due to the high availability of the reduced coenzymes NADH and NADPH produced by the inorganic substrate oxidation. It is known the inhibitory role of these reduced coenzymes in some catabolic pathways in heterotrophic organisms. Thus, we could attribute to the reduced coenzymes the “silencing” (or small functionality) of the pathways for degradation of endogenous organic compounds in *A. ferrooxidans*, when ferrous iron or other inorganic compounds are highly available. Storage organic products have not been reported in *A. ferrooxidans*, however the presence of genes encoding glycogen synthase, maltooligosyl trehalose synthase, glucan branching enzymes, glucano- and glycosyl-transferases in *Thiobacillus denitrificans* genome suggests that the bacterium synthesizes a polyglucose storage product [53].

Little is known about the functionality of the aerobic glycolysis and Krebs Cycle in obligately chemoautotrophic organisms, however candidate genes related to these pathways have been identified in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome: glucose-6-phosphate isomerase, pyruvate kinase, phosphoglycerate kinase, citrate synthase, fumarate hydratase, succinyl-CoA synthetase and isocitrate dehydrogenase. Smith *et al.* [54] considered that these organisms have an incomplete Krebs Cycle, which apparently works just in biosynthesis. However, the catabolic role of the Krebs Cycle in some thiobacilli has been reported by Matin & Rittenberg [55].

We have found by Blast analysis different ORFs annotated as carbohydrate kinase (PfkB) in the some microorganism genome sequence whose correspondent a carbohydrate kinase PfkB family protein, but differ on their amino acids sequence (58% of identity with *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707; 57% of identity with *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259; 56% of identity with *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718).

In conclusion, the synthesis alteration for the bornite-responsive proteins was not observed for chalcopyrite, probably because this mineral is a more refractory copper mineral. The protein expression alterations observed could be largely attributed to the bacterial response to copper ions during the exposure to bornite.

Acknowledgments

We are very grateful to Companhia Vale do Rio Doce (CVRD), Brazil, which is funding a project to our Biohydrometallurgy group. We are also grateful to Dr. Fernanda Zanolli Freitas for help in the two-dimensional electrophoresis experiments. Acknowledgements are also due to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research fellowships to OGJr, MCB and LMMO and to ProteoRed for proteomics network support in Spain.

5 References

- [1] Rawlings, D. E., Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002, *56*, 65-91.
- [2] Silver, S., Torma, A. E., Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on different substrates. *Can. J. Microbiol.* 1974, *20*, 141-147.
- [3] Lizama, H. M., Suzuki, I., Interaction of chalcopryrite and sphalerite with pyrite during leaching by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* 1991, *37*, 304-311.
- [4] Bosecker, K., Bioleaching metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997, *20*, 591-604.
- [5] Bevilacqua, D., Leite, A. L. L. C., Garcia Jr, O., Tuovinen, O. H., Oxidation of chalcopryrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochem.* 2002, *38*, 587-592.
- [6] Vaughan, D. J., Becker, U., Wright, K., Sulphide mineral surfaces: theory and experiment. *Int. J. Miner. Process.* 1997, *51*, 1-14.
- [7] Brierley, C. L., Bacterial leaching. *Crit. Rev. Microbiol.* 1978, *6*, 207-262.
- [8] Barreto, M., Quatrini, R., Bueno, S., Arraigada, C., Valdés, J., Silver, S., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy* 2003, *71*, 97-105.
- [9] Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Hallberg, K. B., Valenzuela, P. D. T., Holmes, D. S., Insights into the metabolism and ecophysiology of three *Acidithiobacilli* by comparative genome analysis. *Adv. Mater. Res.* 2007, *20-21*, 439-442.
- [10] Ramírez, P., Toledo, H., Guilian, N., Jerez, C. A., An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, *68*, 1837-45.

- [11] Ramírez, P., Guilian, N., Valenzuela, L., Beard, S., Jerez, C. A., Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70(8), 4491-4498.
- [12] He, Z., Hu, Y., Zhong, H., Hu, W., Xu, J., Preliminary proteomic analysis of *Thiobacillus ferrooxidans* growing on elemental sulphur and Fe^{2+} separately. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005, 38, 307-313.
- [13] Bouchal, P., Zdráhal, Z., Helánová, S., Janiczek, O., Hallberg, K. B., Mandl, M., Proteomic and bioinformatic analysis of iron- and sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* using immobilized pH gradients and mass spectrometry. *Proteomics* 2006, 6, 4278-4285.
- [14] Garcia O. Jr., Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Rev. Microbiol.* 1991, 22, 1-6.
- [15] Tuovinen, O. H., Kelly, D. P., Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. use of membranes filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Microbiol.* 1973, 88, 285-298.
- [16] Hartree, E. F., Determination of proteins: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 1972, 48, 422-427.
- [17] De Mot, R., Vanderleyden, J., Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 1989, 35, 960-967.
- [18] Bradford, M. A., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- [19] Gianazza, E., Giacon, P., Sahlin, B., Righetti, P. G., Non-linear pH courses with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1985, 6, 53-56.
- [20] Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D., A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 1993, 14, 1357-1365).
- [21] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, 68, 850-858
- [22] Third, K. A., Cord-Ruwisch, R., Watling, H. R., The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopryrite bioleaching. *Hydrometallurgy* 2000, 57, 225-233.
- [23] Arce, E. M., González, I. A., A comparative study of electrochemical behaviour of chalcopryrite, chalcocite and bornite in sulfuric acid solution. *Int. J. Miner. Process.* 2002, 67, 17-28.

- [24] Akcil, A., Ciftci, H., Deveci, H., Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopryrite concentrate. *Miner. Eng.* 2007, 20, 310-318.
- [25] Price, D. W., Warren, G. W., The influence of silver ion on the electrochemical response of chalcopryrite and other mineral sulfide electrodes in sulfuric acid. *Hydrometallurgy* 1986, 15, 303-324.
- [26] Lazaro, I., Martinez-Medina, N., Rodriguez, I., Arce, E., Gonzalez, I., The use of carbon paste electrodes with non-conducting binder for the study of minerals: chalcopryrite. *Hydrometallurgy* 1995, 38, 277-287.
- [27] Novo, M. T. M., da Silva, A. C., Moreto, R., Cabral, P. C. P., Costacurta, A., Garcia Jr., O., Ottoboni, L. M. M., *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000, 77, 187-195.
- [28] Weissnan, J. S., Kashi, Y., Fenton, W. A., Horwich, A. L., GroEL-mediated protein folding proceeds by multiple rounds of binding and release of nonnative forms. *Cell* 1994, 78, 693-702.
- [29] Agard, D. A., To fold or not to fold. *Science* 1993, 260, 1903-1904.
- [30] Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., Harti, F. U., Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 781-791.
- [31] Segal, G., Ron, E. Z., Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Ann. NY Acad. Sci.* 1998, 851, 147-151.
- [32] Thurman, R. B., Gerba, C. P., The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit. Rev. Environ. Control* 1989, 18, 295-315.
- [33] Nies, D. H., Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 51, 730-750.
- [34] Rodriguez-Montelongo, L., De La Cruz-Rodriguez, L., Farias, R. N., Massa, E. M., Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1993, 1144, 77-84.
- [35] Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarres, J., Toledano, M. B., A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 4537-4577.
- [36] Demple, B., Amábile-Cuevas, C. F., Redox redux: The control of oxidative stress responses. *Cell* 1991, 67, 837-839.
- [37] Lindahl, R., Aldehyde dehydrogenase and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1992, 27, 283-335.
- [38] Marchitti, S. A., Deitrichi, R. A., Vasiliou, V., Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-

dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacol. Rev.* 2007, 59, 125-150.

[39] Sunkar, R., Bartels, D., Kirch, H. H., Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J.* 2003, 35, 452-464.

[40] Yoo, S. J., Shim, Y. K., Seong, I. S., Seol, J. H., Kang, M. S., Chung, C. H., Mutagenesis of two N-terminal Thr and five Ser residues in HslV, the proteolytic component of the ATP-dependent HslVU protease. *FEBS Lett.* 1997, 412, 57-60.

[41] Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F., Miller, N. E., Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29(5), 1097-1106.

[42] Sticht, H., Rösch, P., The structure of iron-sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1998, 70, 95-136.

[43] Takahashi, Y., Nakamura, M., Functional assignment of the ORF2-*iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 1999, 126, 917-926.

[44] Nimmo, H. G., Control of *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase: an example of protein phosphorylation on a prokaryote. *Trends Biochem. Sci.* 1984, 9(11), 475-478.

[45] Cozzzone, A. J., Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 1988, 42, 97-125.

[46] Kennelly, P. J., Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002, 206, 1-8.

[47] Macek, B., Gnad, F., Soufi, B., Kumar, C., Olsen, J. V., Mijakovic, I., Mann, M., Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics* 2008, 7(2), 299-307.

[48] Babul, J., Fraenkel, D. G., Phosphate modification of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 151(3), 1033-1038.

[49] Appia-Ayme, C., Quatrini, R., Denis, Y., Denizot, F., Silver, S., Roberto, F., Veloso, F., Valdés, J. Cadenas, J. P., Esparza, M.; Orellana, J., Jedlicki, E.; Bonnefoy, V., Holmes, D. S., Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 2006, 83, 273-280.

[50] Shively, J. M., Van Keulen, G., Meijer, W. G., Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998, 52, 191-230.

[51] Rawlings, D. E., Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* 2005, 4(13), 1-15.

- [52] Barreto, M., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71(6), 2902-2909.
- [53] Beudeker, R. F., Kerver, J. W. M., Kuenen, J. G., Occurrence, structure and function of intracellular polyglucose in the obligate chemolithotroph *Thiobacillus neapolitanus*. *Arch. Microbiol.*, 1981, 129, 221-226.
- [54] Smith, A. J., London, J., Stainer, R. Y., Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and *Thiobacilli*. *J. Bacteriol.* 1967, 94, 972-983.
- [55] Matin, A., Rittenberg, S., Enzymes of carbohydrate metabolism in *Thiobacillus* species. *J. Bacteriol.* 1971, 107, 179-186.

Table 1. Differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* LR exposed to bornite or chalcocopyrite

Table 1: Differentially expressed proteins in P. homocapsus L1 exposed to boronic acid									
Protein Spot n ^a	Accession n ^b	TIGR-CMR Cellular Role Category ^c	Expression relative to control		Protein description ^f	Theoretical		Matched	Sequence
			B-24h / 48h ^d	C-24h or 48h ^e		MW / pI ^g	Score ^h	Peptide ⁱ	Coverage %
1	AFE_0559	Unknown Function: Enzymes of unknown specificity	- / -	NC	Radical SAM domain protein	43,818 / 5.17	261	18	63
2	AFE_2496	Protein Fate: Protein folding and stabilization	+ / +	NC	Chaperonin (groEL)	58,651 / 5.20	817	28	68
3	AFE_2837	Energy Metabolism: Glycolysis/gluconeogenesis	- / -	NC	Fructose-1-6-bisphosphatase (fbp)	37,347 / 5.50	589	15	64
4	AFE_3085	Energy Metabolism: Glycolysis/gluconeogenesis	- / -	NC	Fructose-bisphosphate aldolase class II (fba)	38,594 / 5.76	673	18	67
5	AFE_2508	Energy Metabolism: Sugars	- / -	NC	Carbohydrate kinase (PfkB)	34,735 / 5.41	666	14	60
6	AFE_0358	Protein Fate: Protein folding and stabilization	- / -	NC	Heat shock protein HsIU, ATPase subunit HsIU	48,834 / 5.14	202	14	35
7	AFE_0942	Energy Metabolism: Chemoautotrophy	- / -	NC	Ribulose biphosphate carboxylase, large subunit 2 (cbbL2)	50,522 / 5.69	191	13	32
8	AFE_3085	Energy Metabolism: Glycolysis/gluconeogenesis	+ / +	NC	Fructose-bisphosphate aldolase, class II (fba)	38,594 / 5.76	412	16	61
9	AFE_1640	Ribosomal proteins: synthesis and modification	- / -	NC	Ribosomal S2 (rpsB)	28,117 / 5.71	290	9	53
10	AFE_2062	Cellular Processes: Detoxification	+ / +	NC	Antioxidant, AhpC/Tsa family	22,534 / 5.69	268	9	59
11	-	-	- / -	NC	no identification	-	-	-	-
12	AFE_0952	Ribosomal proteins: synthesis and modification	- / -	NC	Ribosomal protein L25 (rplY)	22,238 / 5.86	302	11	55
13	AFE_0965	Energy Metabolism: Fermentation	+ / +	NC	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein	55,781 / 5.13	230	18	50

a. Protein spot n^a: was defined according to spot positions in 2-DE gels (protein number in Figure 4);

b. Accession n^b: *A. ferrooxidans* ATCC 23270 protein database accession number;

c. TIGR-CMR Cellular Role Category: predicted function from TIGR-CMR;

d. Expression relative to control (B=Bornite) 24/48 h: expression of proteins after exposure to mineral for 24 or 48 hours relative to control-cells (absence of mineral). +:up-regulated, -:down-regulated;

e. Expression relative to control (C=Chalcocopyrite) 24h or 48h: expression of proteins after exposure to mineral for 24 or 48 hours relative to control-cells (absence of mineral). NC: no significant change (P>0.05 by Student's t-test);

f. Protein description: name of each matched protein in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 protein database;

g. MW: theoretical molecular weight of the matched protein in Da; pI: theoretical isoelectric point of the matched protein;

h. Score: MASCOT refers to the score derived from MASCOT searches of MALDI-TOF-TOF;

i. Matched peptide: the number of peptides matched to the candidate protein (the number of observed peptides);

j. Sequence coverage %: percent of identified sequences to the complete sequence of the known protein.

Table 2. Predicted cellular localization of differentially expressed proteins in *A. ferrooxidans* LR exposed to bornite

Protein Spot n ^o ^a	Accession n ^o ^b	Protein description ^c	Predicted Cellular Localization PSORT Prediction / Signalp 3.0 Server ^d
1	AFE_0559	Radical SAM domain protein	Cytoplasm / Non-secretory
2	AFE_2496	Chaperonin (groEL)	Cytoplasm / Non-secretory
3	AFE_2837	Fructose-1-6-bisphosphatase (fbp)	Inner membrane / Non-secretory
4	AFE_3085	Fructose-bisphosphate aldolase class II (fba)	Cytoplasm / Non-secretory
5	AFE_2508	Carbohydrate kinase (PfkB)	Inner membrane / Non-secretory
6	AFE_0358	Heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU	Cytoplasm / Non-secretory
7	AFE_0942	Ribulose biphosphate carboxylase, large subunit 2 (cbbL2)	Cytoplasm / Non-secretory
8	AFE_3085	Fructose-bisphosphate aldolase, class II (fba)	Cytoplasm / Non-secretory
9	AFE_1640	Ribosomal S2 (rpsB)	Inner membrane / Non-secretory
10	AFE_2062	Antioxidant, AhpC/Tsa family	Cytoplasm / Non-secretory
11	-	no identification	-
12	AFE_0952	Ribosomal protein L25 (rplY)	Cytoplasm / Non-secretory
13	AFE_0965	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein	Inner membrane / Non-secretory

a. Protein spot n^o: was defined according to spot positions in 2-DE gels (protein number in Figure 4);

b. Accession n^o: *A. ferrooxidans* ATCC 23270 protein database accession number;

c. Protein description: name of each matched protein in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 protein database;

d. Predicted Cellular Localization PSORT Prediction / Signalp 3.0 Server: prediction cellular localization of proteins by PSORT Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.html>) and Signalp 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

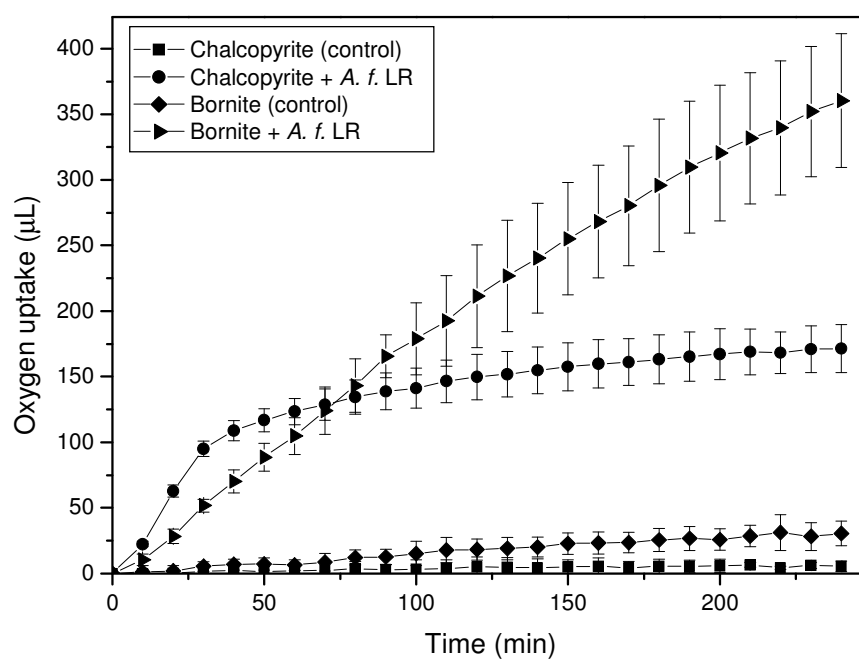


Figure 1. Respirometric assay of *A. ferrooxidans* LR cells in presence of chalcopyrite or bornite as sole energy source. Oxygen consumption (µL) was measured after cells addition to mineral samples. Controls were performed in the absence of *A. ferrooxidans* cells.

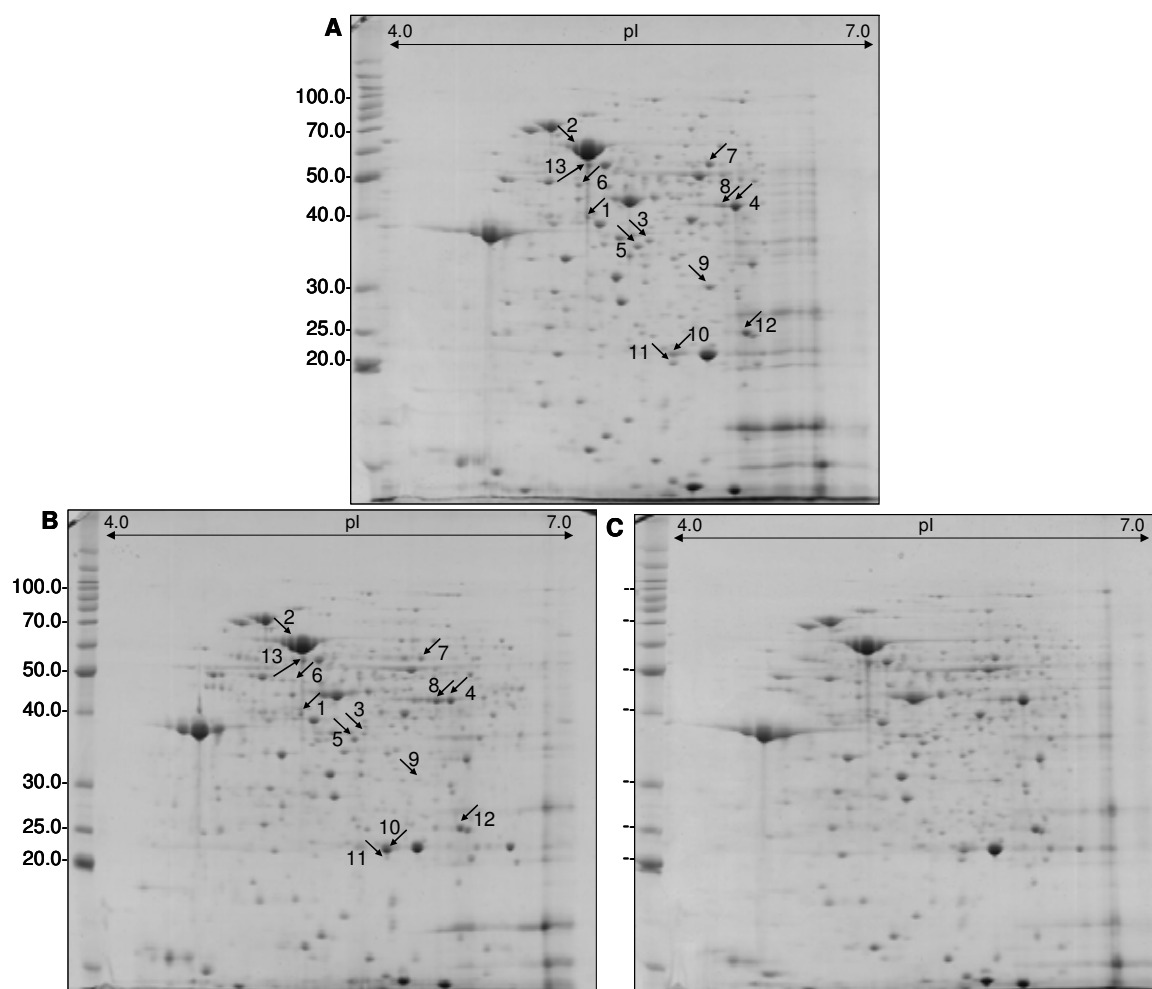


Figure 2. 2-DE of total protein profiles from *A. ferrooxidans* LR. Total proteins were extracted from cells before (A) or after exposure to 2.5% of bornite (B) or 2.5% of chalcopyrite (C) for 24 hours. Arrows represent proteins whose synthesis was induced or repressed, after exposure to bornite relative to the control (A). The molecular mass (kDa) of standard proteins is indicated.

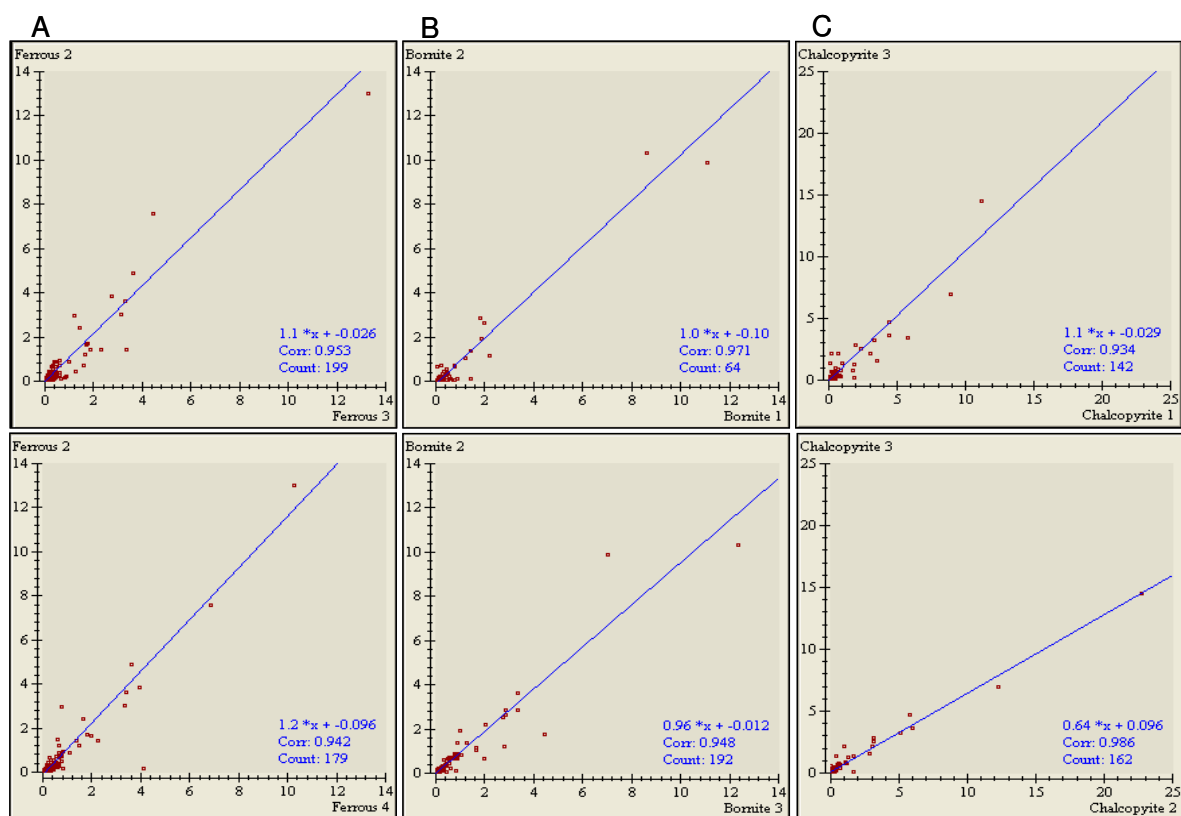
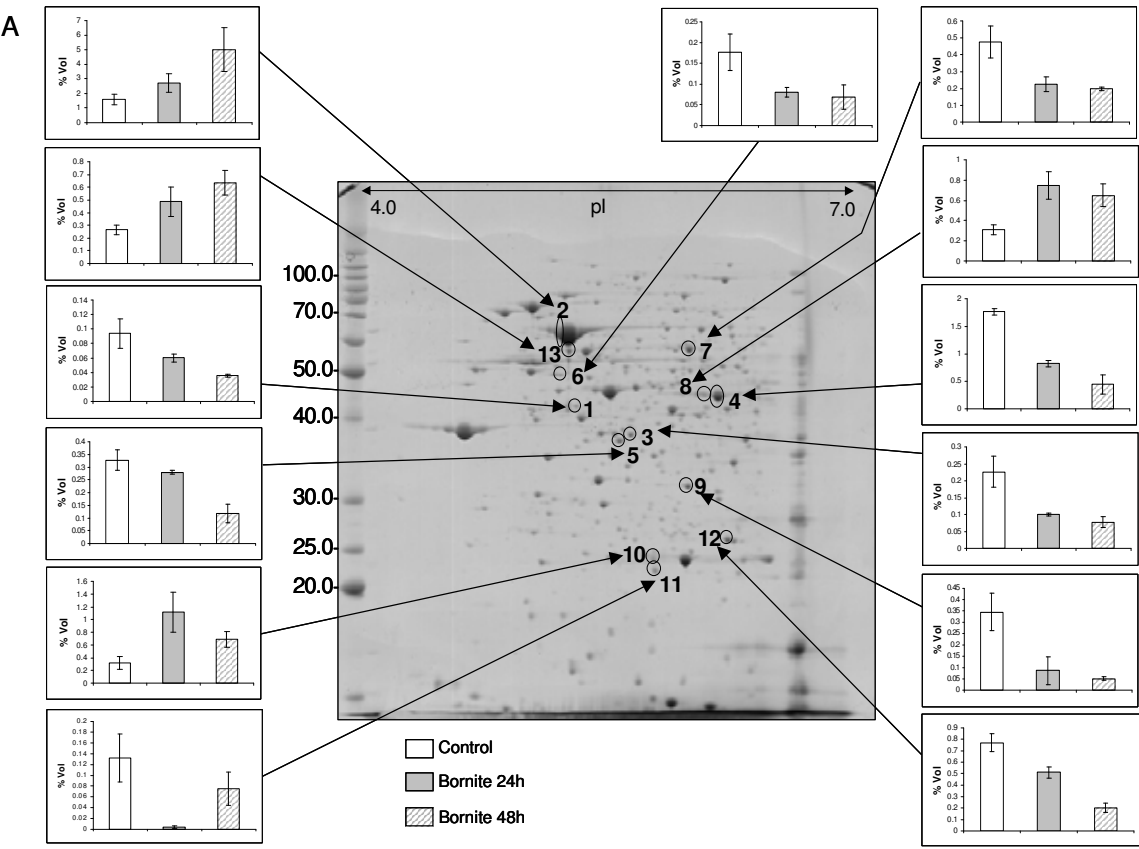


Figure 3. Statistical reproducibility: intra-sample scatter plots %vol / %vol of the gels considered in this analysis for control (A), and after exposure to bornite (B) or chalcopyrite (C) for 24 hours.



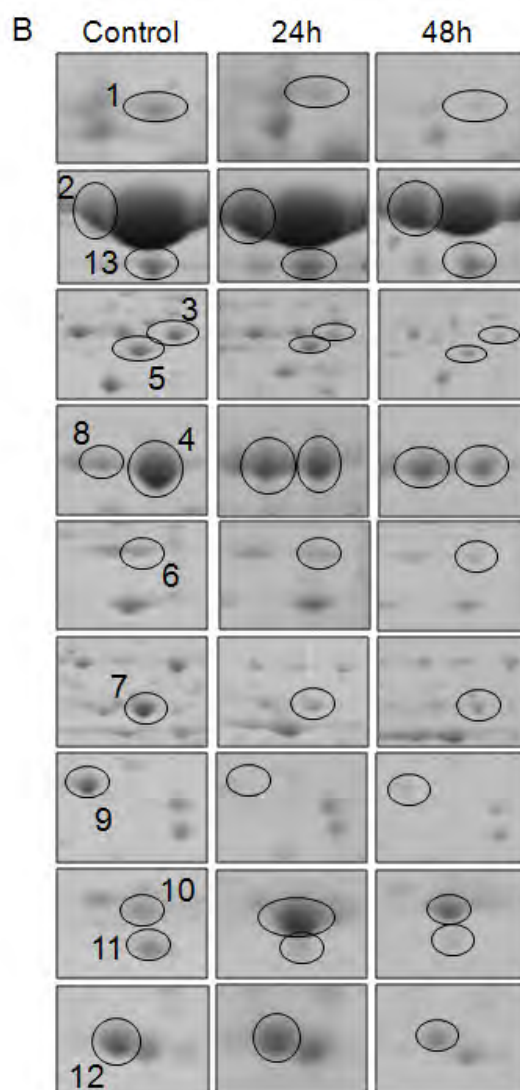
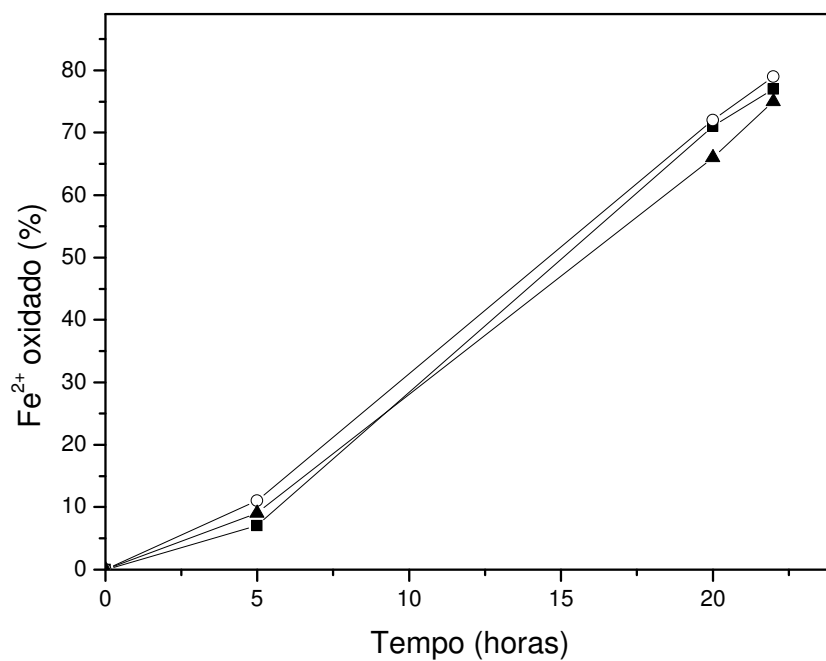


Figure 4. 2-DE of total protein from *A. ferrooxidans* LR. (A) Circles represent proteins that were significantly differential ($P < 0.05$ by Student's t-test) between control-cells and bornite exposed cells. The average of the staining volume (expressed as %vol) and standard deviations among triplicates for each differential protein before mineral exposure (control) and after bornite exposure for 24 or 48 hours are exhibited by histograms. (B) Spots zoom of the differential proteins numbered in (A) are showed in the control and after exposure to bornite for 24 or 48 hours. The number associated with the spots also denotes its identity in Table 1.

APÊNDICE C



Curva de crescimento em triplicata de *A. ferrooxidans* LR na presença de meio T&K contendo íons Fe^{2+} . O íon Fe^{2+} remanescente foi determinado por titulação com dicromato de potássio.

ANEXOS

ANEXO A

O Anexo A mostra a sequência nucleotídica da região codificadora de proteínas diferencialmente expressas em bornita, cuja expressão foi verificada por PCR em tempo real na presença de calcopirita, sendo que os nucleotídeos sublinhados correspondem às regiões de hibridização dos *primers* (Tabela 3).

1. Sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína de choque térmico HslU, subunidade ATPase da proteína de choque térmico HslU, com 1323 pb. Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_0358.

ATGTCTGAAATGACCCCCGCGAGATCGTCCAGGAGCTGGACAAGTACATCATCGGCCAG
TCCGAGGCCAAGCGCGCAGTCGCCATCGCCCTGCGCAACCGCTGGCGGCGCGGGCAGGTG
CCGCCGCCGCTGCATCAGGAAATCACCCCCAAAAATATCCTCATGATCGGGCCGACGGGA
GTGGGCAAGACGGAAATCGCCCGGCGTCTGGCGCAACTCGCCAATGCCCCCTTCATCAAG
GTGGAAGCCACCAAATTCACCGAGGTGGGCTATGTGGGCAAGGATGTGGAATCCATCATC
CGCGATCTGACCGAAACCGCCGTCGACATGATCCGCAACGAACGGCAGGTGCGGTTGCGC
CAGCGCGCCGAGGAATTGGCCGAGGAGCGGATTCTCGACATCCTCATCCCCGGTCCGCGC
GACAGCAGCGTACCCCGCAGCGACGAGGGCACTCGCCAGAAGTTTCGAAAAATGCTGCGC
GAAGGCAAGCTGGATGCGCAGGAAATCGAGATCGAGGTGAGCGCTCCCAAGGGCGGGGTG
GAGATCATGGCCCCGGCGGGTATGGAGGAGATGACCAACCAGCTCCGCGAGATGTTCTCC
AACATGGCGCCAGGGAAGACCAGCACACGACGCGTCACCGTGAGCGAAGCGCAGCGTCTG
TTGACGGACGATGAAGCCGCCAAGCTGGTCAATGAAGAGGAAGTTCGCGCCCTGGCACTG
GAACGGGTACAGTCCGGCGGCATAGTCTTCATCGACGAAATCGACAAGGTGGCGGTACGC
TCCGGCACTCAGCAGGGCTCGGATGTCTCCCGGGAAGGGAGTACAACGCGATCTTCTGCCG
CTGGTGGAGGGCTCCAATGTGAGCACCCGTTACGGCGTGGTGAAGACCGACCATATCCTC
TTCATCGCCTCCGGCGCCTTCCACCTCAGCAAGCCCTCCGATCTGATCCCGGAACTGCAG
GGTCGCCTGCCTATCCGCGTGAGTTGGAGGCCCTGAGTGCGGCGGATCTGGTGCGGATA
CTGCAGGAGCCGGAATGCGCTGGTCCGGCAATACGGTGCGTTGCTGGCCAGCGACGGG
CTGGCTTTACACTTTACCCAGGATGGCGTGACGCGTATCGCCGAAATTGCCAGCAGGTG
AATGAACGCGTGGAACATCGGCGCCCGGCGCCTGCATACGGTCATGGAGCGGCTGCTG
GAAGAGGTGGCTTTTGTGCAACCGGACGGCAGCACACGGCCCTGGAGGTGGATGCCGCC
TATGTGGACAGCCGTCTGAAAGATCTGGCGCAGGACGAGGATTTATCTCGTTATATTTTG
TGA

2. Seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína ribulose bifosfato carboxilase com 1380 pb. Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_0942.

ATGGATCAATCTAATCGCTATGCCGATCTTCCCTAAAAGAGGAAGACCTTATCTCTGGC
GGCAAACACATTCTGGTGGCCTACAAAATGAAACCCAAGGCTGGCCACGGTTATCTGGAG
GCCGCCGCCACTTTGCCGCGGAATCGTCCACCGGCACCAACGTGGAAGTGTGCGACTACC
GACGACTTCACCAAGGGCGTGGACGCGCTGGTCTATCATATCGACGAAGCCACCGAGGAT
ATGCGCATCGCCTTTCCGCTGGAGCTGTTGACCGCAACGTCACCGATGGCCGCATGATG
ATCGTCTCCTTCCCTGACGCTGGTCATCGGCAACAACCAGGGCATGGGCGACATCGAGCAT
GGCCAGATGATCGACTTTTTTCATGCCCCCGCGCGCCATTCAAGTTGTTGACGGCCCGGCC
AAGGATATCTCCGATCTGTGGCGCATCCTCGGTGTCGATCAAGGACGGCGGCTATATT
GCCGGTACCATCATCAAACCCAAGCTGGGTCTGCGCCCCGAACCTTTTGCGGCAGCGGCC
TATCAGTTCTGGCTCGGGGGCGACTTCATCAAGAATGACGAGCCCCAGGGCAACCAGGTC
TTCGCCCCGGTGAAAAAGACCATCCCGCTGGTGTATGACGCCATGAAACGCGCCATGGAC
GAAACCGGTGAGGCCAACTGTTCTCCATGAACATCACCGCCGACGACCATTACGAAATG
TGCGCCCCGCGCCGACTTCGCCCTGGAAACCTTTGGTCCCGACGCCGATAAG TTGGCCTTT
CTGGTAGATGGCTTCGTGCGGTGGGCCGGGTATGATCACACCGCCCGCCGCGCAGTATGCC
GGCCAG TACCTGCACTATCACCGCGCCCGGCCACGGCATGATCACCTCGCCAGTGCCAAG
CGCGGCTACACCGCCTTTGTGCTGGCCAAGATGTCCCGCCTGCAGGGTGCGTCCGGTATT
CATGTGGGTACCATGGGCTACGGCAAGATGGAAGGCGGTGCTGACGACCGCAACATCGCC
TACATGATCGAGCGCGACAGTTGTGACGGCCCCGTCTATCATCAGGAATGGTATGGCATG
AAACCCACCACGCCCATCATCTCCGGCGGCATGAATGCCCTGCGTCTGCCCGGCTTCTTC
GAGAACCTGGGGCACGGCAACGTGATCAACACCGCCGGCGGGCTCCTATGGCCACATC
GACAGCCCGGCGGCCGGCGCGGTCTCCCTGCGTCAGGCTTACGAGTGCTGGAAGGCGGGT
GCTGATCCGATCGAGTACGCCAGAGAGCACAAGGAATTGCACGGGCCTTCGAATCCTTC
CCGGGCGATGCCGACAAGCTTTACCCGGGCTGGCGCGAAAAGCTGGGCGTACACCGGTAA

3. Seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína ribossomal L25 com 609 pb.
Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_0952.

ATGACAGATTTTGGGATTGCGGCCAGCCGCGCGAAGATATCGGCCGTCGTGCCAGCCGC
CGCCTGCGCCGCACCGGCATGGTGCCCGCCGTGCTCTACGGGGACGGCAAGGCCGCAATG
GGCATCTGCATCGAAGCCCGCCTGCTGCGCAAGCTGTTGCCCGACGAGCGCGCCTATACC
CACGTCATCACGCTGCAGCTCCCCGGCAGCAAAGAAACGGCCCTGATCCGCGATATTCAG
ATGCACCCTTATAAGGAGGAGGTCCTGCACATGGATTTCTGCGCGTTCACGCTGGCGAA
CAGGTACGCTTGCATGTGCCCGTCCACTTCCTGAACGAAAGCACCTGCGCCGGCATCAAG
GCAGGCGGGGTATTGCATCGCGCCCTGGTGGAAGTAGAAGTGGAAGCGCCGGTGGATCGC
CTGCCGGAAGCCCTCCAGGTGGATATCGCCGGGCTGCACATTGGTGATAGCCTGCATCTG
TCCAGATCAGTGTGCCCGCCGGCGTGACACTGGTACCTTTGCTGCATGAGGACGACAAG
GAAGTCGTCTCCATCCACAATCCGCGTACCGGTGCCGAGGCGGAAGAGGCCCGGAGACC
GCCGCCTGA

4. Seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína ribossomal S2 com 753 pb. Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_1640.

ATGAGCAGCAATGTTACCATGCGCGCCCTGTTGGAAGCCGGCGTCCACTTTGGTCACCAA
TCCCGTTACTGGCACCCGAAAATGGCACCATACCTTTTCGGTGAGCGTAATCGCATTAC
ATCATCAATCTCGAACACACTTTGCCCATGCTGCGCACGGCGCTCAGCTTTGTGAACAG
ATTTCCCGCAAGCACGGCCGCATCCTTTTTGTTCGGTACCAAACGCCAGGCGCGCGAGGCC
GTCGAGCAGGAAGCTCGACGCAGCGGCGCCTTCTTCGTGAATCAGCGCTGGTTGGGTGGT
ACCCTGACCAATTTCAAGACCATCCGTCAGTCCATTTCGTCTCGATGAACTGGATCAG
ATGACGGCGGATGGCACCATGGAAAACTCACCAAAAAAGAAGGGCTCACCTGACTCGC
GAGCGCGACAAGCTGGAGCGCAGCCTCGGTGGCATCAAGGACATGAACGGTCTGCCGGAT
GCCATCTTTGTCATCGATGTTGGTCATGAAAATATCGCCGTTCTGGAAGCCCGAAAGCTG
GGTATCCCGGTGATCGGTGTGGTGGATAGCAACTGTGATCCGTTGTCATCGACTTTCCC
ATCCCCGGTAATGATGATGCAACCCGCGCCATTTCGCCTGTATGCCTCGCTGGTAGCCGAT
GCCATTCTCGACGGTCGTCAGGGTGGAGAGTCTGGGCTGCTCGACGAGTTTGTGAGGTG
GACGAAGAGACCATCGAAATCGACGCAGACTAA

5. Sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína antioxidante, família AhpC/Tsa com 603 pb. Número de acesso no banco de dados da *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_2062.

ATGGCCGTATTAGTAGGAAAAGCTGCCCCCGATTTTGTAGCCCCCGCAGTCATGCCAGAT
AACAGCATCAACGAAAAGTTTCAGTTTTCTCAGCATATTAAGGGAAAGTATGCGGTTCTG
TTCTTTTATCCCCTCGATTTTACCTTTGTCTGCCCTCGGAAATTCTGGCGTTCAATCAT
CGCCTGAACGAGTTCAAGTCCCGCAATACCGAGGTCATCGCTTGCAGCGTGGACTCCCAT
TTCACCCATCTGGCCTGGAAGAACACGCCGGAAGAGAAGGGCGGTATCGGCCATATCCAG
TTGCCCATGGTCGCCGACCTCTCCAAGAGCATCGCCCGCAATTACGATGTCCTGCTCAAC
GATGAGGTTGCCCTGCGCGGTTCTTTTTGATCGACCGTGAAGGCATCGTGCGTCACGAG
GTGGTCAATGACCTGCCCCTGGGCCGCAACATCGACGAAATGATCCGGATGGTGGACGCA
CTGCAATTCTCGGAAGAACACGGCGAAGTTTGTCTGCCCAGTGGCAGAAGGGTAAAGCA
GGCATGAAGCCGACCAGCGAAGGTGTCGCCGACTTCCTGGCGCATCACGGCAAAGAGCTC
TGA

6. Seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína frutose-bifosfato aldolase com 1071 pb. Número de acesso no banco de dados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: AFE_3085.

```
ATGGCCCTGGTTTCATTGCGTCAGTTGTTGGATCATGCCGCAGAACACAGCTACGGCATC
CCCGCCTTTAACGTCAACAACCTGGAGCAGGTGCGCGCGATCATGGAAGCGGCAGCTGCC
GCCGACGCGCCGGTCATCCTTCAGGCGTCTGCCGGCGCCCGCAAGTATGCCGGCGAACCC
TTTCTGCGCCATCTGATTCTGGCCGCCATCGAAGAGTATCCCGACATCCCCGTCGTCCTG
CATCAGGATCACGGCGCGAGCCCCGGCGGTTTGCATCCAGGCCATCCGCTCCGGCTTCTCC
AGCGTGATGATGGACGGTTCTCTGCTGGAGGACGCCAAGACCCCCGCCAGCTATGATTAC
AACGCCACTGTGACCGGCAGGGTCGTGGAGATGTCCACGCCGTCGGTGTGACCGTCGAG
GGCGAACTGGGCTGCCTCGGCTCCCTGGAAACCGGCATGGCGGGCGAAGAGGACGGTGTC
GGTGCCGAGGGCTGTCTGAGCCATGACCAGATGCTGACCGATCCCGAAGAAGCGGCCCGA
TTCGTGAAAGCCACCAAAGTGGACGCCCTGGCGATCGCCATCGGCACCAGCCACGGCGCT
TACAAGTTCACCCGGCCGCGCCGACCGGCAAGGTCCTGCGTATCGACCGGATCAAGGAAATT
CACGCCCCGCATCCCGGATAACCATCTGGTCATGCATGGCTCCAGCTCGGTGCCGACAGGAC
TGGCTGAAGATCATCCACGAATTCGGTGGCGACATCGGCGAAACCTACGGTGTGCCGGTA
GAGGAAATTCAGGAAGGCATCAAGTACGGCGTGCGCAAGGTCAATATCGATACCGATCTG
CGTCTGGCGGCAACCGGCGCGGTGCGTCAGAGTCTGGCCAAAATCCCAAGAACTTTGAT
CCTCGCAAGTTCCTGACCGCCTCCCTCGATGCCATGCGCGATATCTGCCGTCAGCGTTAT
GAGGCCTTCGGTAGCGCCGGGCAGGCCAGCAAGATCAAGGCCATCCCGCTGGATACCATG
TTCAGGCGTTACAGCAAGGGTGAACCTCGACCCCCGCGTCACCGGCGTCTAA
```

ANEXO B

O Anexo B mostra os peptídeos trípticos gerados de cada proteína diferencialmente expressa em células livres de *A. ferrooxidans* LR após exposição aos minerais por 24 ou 48 horas. As proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por espectrometria de massa e apresentaram correspondência com as seqüências das proteínas anotadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabela 4). As seqüências geradas dos peptídeos trípticos estão sublinhadas.

1. Proteína 1 – seqüência de aminoácidos da proteína de domínio radical SAM.

1 MSAVAQENSQ PLNFYRPDYF VKTPTMRSPE YVQLSTAAAI TLGLVPGVMH
51 RTSCTNCLNL LMTYPEGCRA NCTYCGLARH REESRDYADR NFIRVDWPTV
101 RVDEMLERIA KNSDKGQFQR MCISMITHPD SDHDTQVMLK RWMEVAPHIP
151 ASILSNPTTM DKQDLIDLKA MGADIFTVAL DAVTPEIFER TRGKTVQSPH
201 SWDKYWQTIE WAAEIYGPEK FGAHLICGMG ETEQEILAVC QKMKDMGGHN
251 HMFAFFPEKG SMMEDWDVAVP QDHWRRVQLG RFLIDYAGGR YEDMEFDQYG
301 RVLSFGYPQA ELEDIIDSGK PFQTS GC PGK DDEEVSACNR PYGDSSPSDI
351 RSFPFALNRE DVEIVRRQMR LQDLRFPG

SAVAQENSQPLNFYRPDYFVK
TSCTNCLNLLMTYPEGCR
ANCTYCGLAR
HREESR
VDWPTVR
VDEMLER
NSDKGQFQR
RWMEVAPHIPASILSNPTTMDK
AMGADIFTVALDAVTPEIFER
TVQSPHSWDK
YWQTIEWAAEIYGPEK
FGAHLICGMGETEQEILAVCQK
DMGGHNHMFAFFPEK
FLIDYAGGR
YEDMEFDQYGR
DDEEVSACNRPYGDSSPSDIR
SFPFALNR
EDVEIVR

2. Proteína 2 - sequência de aminoácidos da proteína chaperonina, 60 kDa (groEL).

1 MPAKQVAFAE HAREKMLRGV NVLADAVKVT LGPKGRNVVL DKSFGAPTIT
 51 KDGVSVAKEI ELADKFENMG AQMVKEVASQ ASDEAGDGTT TATVLAQAII
 101 REGLKAVIAG MNPMDLKRG I DKSIVVVVEE LKKQSKPCKT QKEVAQVGTI
 151 SANSDDSIGK IIAEAMEKVG NEGVITVEEG SGLANELDVV EGMQFDRGYL
 201 SPYFVNNQDK MVAELENPYI LLHDKKISSI RDMLPILEQV AKSSRPLLIV
 251 AEDVEGEALA TLVVNTMRGI IKVAAVKAPG FGDRRKAMLE DMAILTGGRV
 301 VSEEIGMKLE STTLADLGQA KKIVIDKENT TMIDGAGQQS EIKARVEQIR
 351 QMEDASSDY DREKLQERVA KLAGGVAVIK VGAGSEMEMK EKKARVEDAL
 401 HATRAAVEEG IVPGGGVALV RARHALEGFK TANHDQDMGV AIIRRAIEEP
 451 LRQIVANAGG EGSVVLNKVV DGKDGYGYNA ATDEYGDMFE MGVIDPTKVT
 501 RTALQKASSI AGLMITTEAM VTELPKKDDK SGGDMGDMGG GMGGMGGMGG
 551 F

QVAFAEHAR
 GVNVLADAVK
 SFGAPTITK
 EIELADKFENMG AQMVK
 EVASQASDEAGDGTTTATVLAQAII
 AVIAGMNPMDLK
 SVIVVVVEELKK
 IIAEAMEK
 VGNEGVITVEEGSGLANELDVVEGMQFDR
 GYLSPYFVNNQDK
 MVAELENPYILLHDK
 DMLPILEQVAK
 SSRPLLIVAEDVEGEALATLVVNTMR
 APGFGDR
 AMLEDMAILTGGR
 VVSEEIGMK
 VIDKENTTMIDGAGQQSEIK
 ENTTMIDGAGQQSEIK
 ARVEQIR
 QMEDASSDYDREK
 AAVEEGIVPGGGVALVR
 HALEGFK
 TANHDQDMGVAIIR
 RAIEEPLR
 AIEEPLR
 DGYGYNAATDEYGDMFEMGVIDPTK
 ASSIAGLMITTEAMVTELPK
 SGGDMGDMGGGMGGMGGMGGF

3. Proteína 3 - sequência de aminoácidos da proteína frutose-1-6-bifosfatase (fbp).

1 MHIGTTLSQF IEETRLYPG ASGDFAGLLN DLTTSCKFIG AQVYRGALVG
51 ALGSAGTDNV QGEVQKKLDI ISNEAILKSM DWTGHLAGMA SEEMDDPYPI
101 PRNIPRGKYL LLFDPLDGSS NTDVGISVGT IFSILKAPVA GRDAELADFL
151 QPGVEQVCAG YALYGSSNML VYSTGYGVNG FTLDPSIGEY ILTHNQMRIP
201 EDTSEYAINM SNHRHWQKPV QRYIDELNQG TDGPRQRDFN MRWVGSMVAD
251 VHRILCRGGI FLYPFDQRDP KKPGKLRLLY EANPMSYLVE QAGGAASTGT
301 TRILDIVPQG LHQRIPVILG AKNEVERVVA YHQGSFVIP

MHIGTTLSQFIEETR
LYPGASGDFAGLLNDLTTSCK
FIGAQVYR
GALVGALGSAGTDNVQGEVQK
KLDIISNEAILK
SMDWTGHLAGMASEEMDDPYPIPR
IPEDTSEYAINMSNHR
HWQKPVQR
YIDELNQGTGPR
WVGSMVADVHR
GGIFLYPFDQR
LLYEANPMSYLVEQAGGAASTGTTR
ILDIVPQGLHQR
IPVILGAK
VVAYHQGSFVIP

4. Proteína 4 - sequência de aminoácidos da proteína frutose-bifosfato aldolase, classe II (fba).

1 MALVSLRQLL DHAAEHSYGI PAFNVNNLEQ VRAIMEAAAA ADAPVILQAS
51 AGARKYAGEP FLRHLILAAI EEYPDIPVVL HQDHGASPAV CIQAIRSGFS
101 SVMMDGSLLE DAKTPASYDY NATVTGRVVE MSHAVGVTVE GELGCLGSLE
151 TGMAGEEDGV GAEGCLSHDQ MLTDPEEAAR FVKATKYDAL AIAIGTSHGA
201 YKFTRPPTGK VLRIDRIKEI HARIPDTHLV MHGSSSV PQD WLKIIHEFGG
251 DIGETYGVPV EEIQEGIKYG VRKVNIDTDL RLAATGAVRQ SLAKNPKNFD
301 PRKFLTASLD AMRDICRQRY EAFGSAGQAS KIKAIPLDTM FRRYSKGELD
351 PRVTGV

QLLDHAAEHSYGIPAFNVNNLEQVR
AIMEAAAAADAPVILQASAGAR
KYAGEPFLR
YAGEPFLR
HLILAAIEEYPDIPVVLHQDHGASPAVCIQAIR
SGFSSVMMDGSLLEDAK
TPASYDYNATVTGR
VDALAIAIGTSHGAYK
FTRPPTGK
IKEIHAR
IPDTHLVMHGSSSV PQDWLK
IIHEFGGDIGETYGVPVEEIQEGIK
KVNIDTDLR
KFLTASLDAMR
FLTASLDAMR
QRYEAFGSAGQASK
YEAFGSAGQASK
AIPLDTMFR

5. Proteína 5 - sequência de aminoácidos da proteína carboidrato quinase (PfkB).

1 MSTLVCGSLA FDTIMVFQDH FKAHILPDQV HMLNVSFTVP QMRRDFGGCA
51 GNIAYNLKLL GANPVIVGTA GQDFTPYLDH LKAQGLDTGL LRILPDHYTA
101 QAFITTDLDD NQITAFHPGA MFQAQENRLA GRIPENVRWA IVAPDGLGAM
151 VQHLEDLTNA GIPTLFDPGQ GLPLFDAETL TRLIDRADYL TVNDYECQMV
201 QARTGLGLNE LRQRLKALIV TRGEHGSVIY HDGRETTIPA ARPKAVTDPT
251 GCGDAYRAGL LYGLEHELGW ETSGRVASLM GAYKIEQAGT QNHRFTWPEF
301 QARYRENFGE TIG

STLVCGSLAFDTIMVFQDHF
KAHILPDQVHMLNVSFTVPQMR
RDFGGCAGNIAYNLK
DFGGCAGNIAYNLK
LLGANPVIVGTAGQDFTPYLDHLK
AQGLDTGLLR
ADYLTVNDYECQMVQAR
TGLGLNELR
GEHGSVIYHDGR
AVTDPTGCGDAYR
AGLLYGLEHELGWETSGR
IEQAGTQNHR
FTWPEFQAR
YRENFGETIG

6. Proteína 6 - sequência de aminoácidos da HslU, subunidade ATPase da proteína de choque térmico HslVU.

1 MSEMPREIV QELDKYIIGQ SEAKRAVAIA LRNRWRRGQV PPPLHQEITP
51 KNILMIGPTG VGTKEIARRL AQLANAPFIK VEATKFTEVG YVGKDVESII
101 RDLTETAVIDM IRNERQVALR QRAEELAEER ILDILIPGPR DSSVPRSDEG
151 TRQKFRKMLR EGKLDAQEIE IEVSAPKGGV EIMAPAGMEE MTNQLREMFS
201 NMAPGKTSTR RVTVSEAQR LTDDEAAKLV NEEEVRALAL ERVQSGGIVF
251 IDEIDKVAVR SGTQQGSDVS REGVQRDLLP LVEGSNVSTR YGVVKTDHIL
301 FIASGAFHLS KPSDLIPELQ GRLPIRVELE ALSAADLVRI LQEPENALVR
351 QYGALLASDG LALHFTQDGV QRIAEIAQQV NERVENIGAR RLHTVMERLL
401 EEVAFVAPDG STTALEVDA AYVDSRLKDLA QDEDLSRYIL

RGQVPPPLHQEITPK
GQVPPPLHQEITPK
QVALRQR
AEELAEER
ILDILIPGPR
VTVSEAQR
LVNEEEVR
VQSGGIVFIDEIDKVAVR
DLLPLVEGSNVSTR
VELEALSAADLVR
ILQEPENALVR
IAEIAQQVNER
RLHTVMER
LLEEVAFVAPDGSTTALEVDAAYVDSR

7. Proteína 7 - sequência de aminoácidos da proteína ribulose bifosfato carboxilase, subunidade maior (CbbL).

1 MDQSNRYADL SLKEEDLISG GKHILVAYKM KPKAGHGYLE AAAHFAAESS
51 TGTNVEVSTT DDFTKGVDAL VYHIDEATED MRIAFPLELF DRNVTDGRMM
101 IVSFLTLVIG NNQGMGDIEH GQMIDFFMPP RAIQLFDGPA KDISDLWRIL
151 GRPIKDGGYI AGTIKPKLG LRPEPFAAAA YQFWLGGDFI KNDEPQGNQV
201 FAPVKKTIPL VYDAMKRAMD ETGEAKLFSM NITADDHYEM CARADFALET
251 FGPDADKLAF LVDGFVGGPG MITTARRQYA GQYLHYHRAG HGMITSPSAK
301 RGYTAFVLAK MSRLQGASGI HVGTMGYGKM EGGADDRNIA YMIERDSCDG
351 PVYHQEWYGM KPTTPIISGG MNALRLPGFF ENLGHGNVIN TAGGGSYGHI
401 DSPAAGAVSL RQAYECWKAG ADPIEYAREH KEFARAFESF PGDADKLYPG
451 WREKLGVHR

GVDALVYHIDEATEDMR
IAFPLELFDR
AIQLFDGPAK
DISDLWR
ILGRPIKDGGYIAGTIKPK
NDEPQGNQVFAPVK
AMDETGEAK
ADFALETFGPDADK
QYAGQYLHYHR
RGYTAFVLAK
NIAYMIER
QAYECWK
AGADPIEYAR

8. Proteína 8 - sequência de aminoácidos da proteína frutose-bifosfato aldolase, classe II (fba).

1 MALVSLRQLL DHAAEHSYGI PAFNVNNLEQ VRAIMEAAAA ADAPVILQAS
51 AGARKYAGEP FLRHLILAAI EEYPDIPVVL HQDHGASPAV CIQAIRSGFS
101 SVMMDGSLLE DAKTPASYDY NATVTGRVVE MSHAVGVTVE GELGCLGSLE
151 TGMAGEEDGV GAEGCLSHDQ MLTDPEEAAR FVKATKYDAL AIAIGTSHGA
201 YKFTRPPTGK VLRIDRIKEI HARIPDTHLV MHGSSSV PQD WLKIIHEFGG
251 DIGETYGVPV EEIQEGIKYG VRKVNIDTDL RLAATGAVRQ SLAKNPKNFD
301 PRKFLTASLD AMRDICRQRY EAFGSAGQAS KIKAIPLDTM FRRYSKGELD
351 PRVTGV

QLLDHAAEHSYGIPAFNVNNLEQVR
AIMEAAAAADAPVILQASAGAR
KYAGEPFLR
YAGEPFLR
HLILAAIEEYPDIPVVLHQDHGASPAVCIQAIR
TPASYDYNATVTGR
VDALAIAIGTSHGAYK
FTRPPTGK
IKEIHAR
IPDTHLVMHGSSSV PQDWLK
IIHEFGGDIGETYGVPVEEIQEGIK
KVNIDTDLR
VNIDTDLR
FLTASLDAMR
YEAFGSAGQASK
AIPLDTMFR

9. Proteína 9 - sequência de aminoácidos da proteína ribossomal S2 (rpsB).

1 MSSNVTMRAL LEAGVHFGHQ SRYWHPKMAP YLFGERNRIH IINLEHTLPM
51 LRTALSFVEQ SRKHGRILV VGTKRQARE VEQEARRSGA FFVNQRWLGG
101 TLTNFKTIRQ SIRRLDELDQ MTADGTMEKL TKKEGLTLTR ERDKLERSLG
151 GIKDMNGLPD AIFVIDVGHE NIAVLEARKL GIPVIGVVDS NCDPLLIDFP
201 IPGNDDATRA IRLYASLVAD AILDGRQGGE SGLLDEFVEV DEETIEIDAD
251

ALLEAGVHFGHQSR
ALLEAGVHFGHQSRYWHPK
MAPYLFGER
IHIINLEHTLPMLR
TALSFVEQISR
EAVEQEAR
WLGGTLTNFK
DMNGLPD AIFVIDVGHENIAVLEAR
LYASLVADAILDGR

10. Proteína 10 - seqüência de aminoácidos da proteína antioxidante, família AhpC/TSA.

1 MAVLVGKAAP DFVAPAVMPD NSINEKFQFS QHIKGKYAVL FFYPLDFTFV
51 CPSEILAFNH RLNEFKSRNT EVIACSVDSH FTHLAWKNTP EEKGGIGHIQ
101 LPMVADLSKS IARNYDVLLN DEVALRGSFL IDREGIVRHE VVNDLPLGRN
151 IDEMIRMVDA LQFSEEHGEV CPAQWQKGKA GMKPTSEGVA DFLAHHGKEL
201

AAPDFVAPAVMPDNSINEK
FQFSQHIK
NTEVIACSVDSHFTHLAWK
NYDVLLNDEVALR
HEVVNDLPLGR
NIDEMIR
MVDALQFSEEHGEVCPAQWQK
AGMKPTSEGVADFLAHHGK
AGMKPTSEGVADFLAHHGKEL

11. Proteína 12 - seqüência de aminoácidos da proteína ribossomal L25 (rplY).

1 MTDFAIAAQP REDIGRRASR RLRRTGMVPA VLYGDGKAAM GICIEARLLR
51 KLLPDERAYT HVITLQLPGS KETALIRDIQ MHPYKEEVLH MDFLRVHAGE
101 QVRLHVPVHF LNESTCAGIK AGGVLHRALV EVEVEAPVDR LPEALQVDIA
151 GLHIGDSLHL SQISVPAGVT LVPLLHEDDK EVVSIHNPRT GAEAEAPET
201 AA

TDFAIAAQPR
AAMGICIEAR
KLLPDER
AYTHVITLQLPGSK
AYTHVITLQLPGSKETALIR
DIQMHPYKEEVLHMDFLR
EEVLHMDFLR
VHAGEQVR
LHVPVHFLNESTCAGIK
ALVEVEVEAPVDR
EVVSIHNPRT

12. Proteína 13 - seqüência de aminoácidos da proteína aldeído desidrogenase (NAD).

1 MQYANPNTEG AVVNFKERYD NFIGGRWVAP VRGEYFDNIS PINGKPFCQI
51 PRSSAEDIEL ALDAAHAAKD AWGRTSVTAR SNILLKIADR IDANLEMLAV
101 AETWDNGKAV RETLNADVPL SSDHFRYFAG CLRAQEGTIG EIDENTVAYH
151 FHEPLGVVGQ IIPWNFPLLM ACWKLAPALA AGNCVVLKPA EQTPASILVM
201 MELIADLLPA GVLNVVNGYG VEAGKALATS KRIAKIAFTG STPVGSLIMK
251 YAAENIIPST VELGGKSPNI FFADVLDQED AFVSKAVEGA VLAFFNQGEV
301 CTCPSRLLIQ ESIYEKFIGM VVERSAQIKR GNPLDTEVMV GAQASQEYD
351 KILSYIQIGK DEGAEVITGG AVETMSADYC EGYYIQPTLL KGTNNMRVFQ
401 EEIFGPVVS VVTFKDEAEAL AIANDIEFGL GAGVWTRDMN RAYRMGRGIQ
451 AGRVWTNCYH MYPAHAAF GGYKSGVGRET HKMMLDHYQQ TKNLLVSYDI
501 NPLGFF

MQYANPNTEGAVVNFK
MQYANPNTEGAVVNFKER
ERYDNFIGGR
YDNFIGGR
GEYFDNISPINGKPFCQIPR
SSAEDIELALDAAHAAK
IADRIDANLEMLAVAETWDNGK
ETLNADVPLSSDHFR
IAFTGSTPVGSLIMK
YAAENIIPSTVELGGK
SPNIFFADVLDQEDAFVSK
AVEGAVLAFFNQGEVCTCPSR
LLIQESIYEK
FIGMVVER
GNPLDTEVMVGAQASQEYDK
VFQEEIFGPVVSVVTFK
DEAEALAIANDIEFGLGAGVWTR
DMNRAYR

ANEXO C

O Anexo C mostra os peptídeos trípticos gerados de cada proteína periplasmática diferencialmente expressa em células aderidas de *A. ferrooxidans* LR após exposição à calcopirita por 2 horas. As proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por espectrometria de massa e apresentaram correspondência com as seqüências das proteínas anotadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Tabela 6). As seqüências geradas dos peptídeos trípticos estão sublinhadas.

1. Proteína 1 - seqüência de aminoácidos da proteína superóxido dismutase.

1 MSEYSVREEL KPSGLDGISD AQITDHWGLY VGYVNQSNAL HKELAEMRAA
51 GKTSSLAYAD RRRRFGFEYN GMVLHEYFYFA QLKPGSSIDQ APGFKAAVTE
101 QFGSAEVWHE DLVSAAKSRS VGWAIAYYDG TTGQINNHFV QLHEDGNVGG
151 FVPLVIVDVF EHAYMVDWKA LGRADYLAHV HKNMNWGVVE ARFQAARSGQ
201 IFKRF

TSSLAYADR
TSSLAYADRR
AAVTEQFGSAEVWHEDLVSAK
NMNWGVVEAR

2. Proteína 2 - seqüência de aminoácidos da proteína superóxido dismutase.

1 MSEYSVREEL KPSGLDGISD AQITDHWGLY VGYVNQSNAL HKELAEMRAA
51 GKTSSLAYAD RRRRFGFEYN GMVLHEYFYFA QLKPGSSIDQ APGFKAAAVTE
101 QFGSAEWHE DLVSAAKSRS VGWAIYYDG TTGQINNHFV QLHEDGNVGG
151 FVPLVIVDVF EHAYMVDWKA LGRADYLA AV HKNNMNWGVVE ARFQAARSGQ
201 IFKRF

AAVTEQFGSAEWHEDLVSAAK
NMNWGVVEAR

3. Proteínas 3 - sequência de aminoácidos da proteína que liga fita simples de DNA (SSB-1).

1 MAGVNKVILL GHLGRDPEMR YQPSGGAIAN FSIATSETFK DKEGNKQERT
51 EWHRVVLFGFR TAEIAGEYLR KGSMAYVEGR LQTRKWTDKG GQERYTTEIV
101 GDRLQLVGAR GGGGGGAASF DEEDPSRPSG GSSAGGARKN EMPPAPAEDF
151 DDDIPF

VILLGHLGR
TAEIAGEYLR
YTTEIVGDRLQLVGAR

4. Proteína 4 - sequência de aminoácidos da proteína *PspA*/IM30.

1 MSIFKHAAEI LESKVNHFLD NAEDPAETLD LSYEKMIANL QDTKRHLADV
51 VTERISLENQ MAQAQKAADK ADADARVALG ANREDLARAE LAQKQSELQK
101 IASLKEAHDV VAAQAQKLTD YESKLQDHIE QFRTQKEVTK SEMAAAQAEV
151 KVSESLTGIG NGMNDAGDAM RRAQDRTRQM EAKAVAMDGL MASGALSDPL
201 DSRSQTEKEL DEVRATSGVD DDLARLKAEM AKEKGTPGSG ADGA

VALGANREDLAR
LQDHIEQFR