



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

THIAGO MIRANDA DA SILVA

**ANÁLISE DAS BASES MOLECULARES DA TOLERÂNCIA
AO ÍON CLORETO EM BACTÉRIAS ACIDÓFILAS
UTILIZADAS EM BIOLIXIVIAÇÃO**

CAMPINAS

2016

THIAGO MIRANDA DA SILVA

**ANÁLISE DAS BASES MOLECULARES DA TOLERÂNCIA
AO ÍON CLORETO EM BACTÉRIAS ACIDÓFILAS
UTILIZADAS EM BIOLIXIVIAÇÃO**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na Área de Genética de
Microrganismos.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELO ALUNO THIAGO MIRANDA DA
SILVA, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA.
LAURA MARIA MARISCAL OTTOBONI.

Orientadora: LAURA MARIA MARISCAL OTTOBONI

Co-orientadora: TATIANA TEIXEIRA TORRES

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2010/12476-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38a Silva, Thiago Miranda da, 1985-
Análise das bases moleculares da tolerância ao íon cloreto em bactérias acidófilas utilizadas em biolixiviação / Thiago Miranda da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Coorientador: Tatiana Teixeira Torres.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 2. *Thiobacillus prosperus*. 3. Cloreto de sódio. 4. Lixiviação bacteriana. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal. II. Torres, Tatiana Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the molecular basis of chloride ion tolerance in acidophilic bacteria used in bioleaching

Palavras-chave em inglês:

Acidithiobacillus ferrooxidans

Thiobacillus prosperus

Sodium chloride

Bacterial leaching

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Laura Maria Mariscal Ottoboni [Orientador]

Edi Lúcia Sartorato

Sueli Matilde da Silva Costa

Edmilson Ricardo Gonçalves

Salete Aparecida Gaziola

Data de defesa: 05-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 05 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni (Orientadora)

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Profa. Dra. Sueli Matilde da Silva Costa

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Profa. Dra. Salete Aparecida Gaziola

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças em todos os momentos, sejam eles felizes ou difíceis.

À minha mãe e meu pai, pessoas tão esforçadas e que sempre acreditaram em mim.

A meus irmãos, Patrícia e Douglas, sempre do meu lado. Paty, obrigado por tudo!

À toda a minha família, por todo o apoio e por acreditar na minha vitória.

À minha orientadora, Laura Ottoboni, pela paciência e carinho que não cabem nesse Universo.

À Profa. Dra. Tatiana Teixeira Torres (USP) pela co-orientação no trabalho.

À Dra. Silvia Regina Turcinelli, por ajudar a deixar minha tese melhor e pelo carinho.

Aos meus amigos do Laboratório, Camila (Camila, obrigado por todas as conversas e ouvir todas as minhas frustrações, alegrias!!), minha afilhada Viviane, Bruna Rafaella (minha eterna Rafaedja), Letícia, Daniel... Obrigado!

Aos meus amigos do coração, que me receberam e sempre se dispuseram a me ajudar: Fernanda Gadelha (pelos puxões de orelha, conselhos, carinho... eterno obrigado!), Rafael (apoio nas horas difíceis, companheirismo, maravilhoso!), Sérgio, Douglas, Ed, Wagner, Eduardo Peloso (meu irmão do coração!). Vocês foram minha força que me deixaram não cair nos tempos difíceis.

Aos membros e suplentes da banca.

Aos professores Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (UNICAMP), Prof. Dr. Gilberto Domont (UFRJ), Prof. Dr. Renato Vicentini e Lucas Canesin (CBMEG – UNICAMP) pela contribuição dada ao trabalho.

A todos os meus amigos de Campinas e da UNICAMP, pela paciência e apoio.

Aos colegas e funcionários do CBMEG e da Secretaria de Pós-Graduação (Tânia, Sandra, Gabriela, obrigado!).

À FAPESP, pela bolsa de doutorado (2010/12476-1).

À FAPESP/Vale, pelo apoio financeiro.

Ao CBMEG e à Unicamp, pelo apoio institucional.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Acidithiobacillus ferrooxidans é uma bactéria Gram-negativa, quimiolitotrófica e acidófila utilizada na biolixiviação de metais. Contudo, essa utilização é limitada em locais onde a água disponível para o processo contém sal, devido à sensibilidade da bactéria ao NaCl. Assim sendo, o conhecimento dos mecanismos moleculares acionados pelo estresse salino na bactéria é de grande interesse para indústria de biomineração. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo a análise do estresse salino (NaCl) em células de *A. ferrooxidans*, por curtos (células *salt-shock*) ou longos (células *salt-30*) períodos de tempo. As células *salt-shock* e *salt-30* de *A. ferrooxidans* foram analisadas por espectroscopia RAMAN e os resultados mostraram mudanças na composição de vários componentes de membrana da bactéria, como proteínas, lipídeos e carboidratos. Foi observado que estas alterações ocorreram tanto nas células *salt-shock* quanto nas células *salt-30*, mostrando que as alterações causadas pelo sal em *A. ferrooxidans* ocorrem de imediato e após longos períodos de exposição. A análise do proteoma das células *salt-30* de *A. ferrooxidans* mostrou uma expressão diferencial de proteínas relacionadas à membrana celular – como proteínas estruturais e transportadoras de várias moléculas - como mecanismo de defesa ao sal. Além disso, foi observada a diminuição dos níveis de expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo central de carbono, produção de ATP e transcrição, dentre outros processos. Por outro lado, proteínas relacionadas à resposta a diferentes tipos de estresse, além de proteases e proteínas reguladoras da transcrição tiveram os níveis de expressão aumentados nas células *salt-30*. Estes dados indicam que a exposição ao sal por longos períodos afeta além da membrana, vários processos celulares. Já os experimentos de RNA-Seq foram realizados em células *salt-shock* com o intuito de avaliar os efeitos da exposição de *A. ferrooxidans* ao sal por curtos períodos. Os resultados mostraram a alteração nos níveis de transcrição de vários genes que codificam proteínas relacionadas à membrana celular e sua permeabilidade, destacando novamente a importância da membrana na defesa da bactéria contra os íons Cl⁻. A diminuição dos níveis de transcrição de vários genes relacionados a produção de energia, divisão celular e síntese de proteínas, contrastando com o aumento da transcrição de genes que codificam transposases e reguladores da transcrição, mostram que o efeito do NaCl em *A. ferrooxidans* é imediato, afetando tanto o crescimento quanto o metabolismo da bactéria. Foi realizado também o sequenciamento do genoma de *Thiobacillus prosperus* DSM 14174, uma bactéria altamente tolerante ao sal. O sequenciamento revelou que a bactéria possui genes

responsáveis pela tolerância ao NaCl que não estão presentes em *A. ferrooxidans*. Entre esses genes estão os que codificam transportadores de íons cloreto e outros, além de genes responsáveis pela biossíntese e transporte de osmoprotetores. As análises filogenética e filogenômica indicaram que *T. prosperus* DSM 14174 é um membro da família Ectothiorhodospiraceae, composto de bactérias halófilas. Esta bactéria pertence ao mesmo gênero da bactéria *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130. Entretanto, elas não são da mesma espécie.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative, chemolithotrophic and acidophilic bacterium, important in metal bioleaching processes. However, its utilization is limited in bioleaching operations where only saline water is available for the process due to the bacterial sensitivity to NaCl. This way, the comprehension of the molecular mechanisms involved in salt stress in the bacterium is of great interest for the biomining industry. Taking this into consideration, the aim of this work was to analyze the salt (NaCl) stress in *A. ferrooxidans* cells for short (*salt-shock* cells) and long (*salt-30* cells) periods of exposition. The RAMAN spectroscopy analysis was performed with *A. ferrooxidans salt-shock* and *salt-30* cells and the results showed several changes in membrane components corresponding to proteins, lipids and carbohydrates. These alterations were observed in both *salt-shock* and *salt-30* cells, showing that cells are affected either by short or long periods of exposure to salt. The proteome analysis showed that the *A. ferrooxidans salt-30* cells increased the expression of several membrane related proteins – structural and transport proteins – possibly as a defense mechanism against salt stress. Also, in these cells, the expression of stress-response related proteins, proteases and transcription regulation proteins increased suggesting that the long-term salt stress affects several cellular processes. The expression of proteins related to carbon metabolism, ATP production and transcription processes, among others, decreased in the *salt-30* cells. The RNA sequencing was performed with *A. ferrooxidans salt-shock* cells aiming to evaluate salt stress effects in *A. ferrooxidans* for short periods. The results showed an alteration in the expression of several genes that encode proteins related to cellular membrane and its permeability, highlighting the importance of the bacterial membrane as a defense mechanism against salt stress. The down-regulation of several genes that encode proteins related to energy production, cellular division and protein synthesis, contrasting with the up-regulation of genes that encode for transposases and transcription processes, suggest that the presence of NaCl affects the *salt-shock* cells metabolism and growth. Also, in this work, the genome of a salt-tolerant bacterium, *Thiobacillus prosperus* DSM 14174, was sequenced. The sequencing revealed that the bacterium possess several genes responsible for salt tolerance that are not present in *A. ferrooxidans*. Among these genes, are the ones that encode for membrane transporters of chloride ions and other ions, and transport and biosynthesis of osmoprotectants. A phylogenetic and phylogenomic analyses indicated that *T.*

prosperus DSM 14174 is a member of the Ectothiorhodospiraceae family, composed of halophilic bacteria. This bacterium belongs to the same genus of *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130. However, they do not belong to the same species.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D-SDS-PAGE	Eletroforese de poliacrilamida unidimensional utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS) (<i>one-dimensional SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
ACN	Acetonitrila
APS	Adenosina-5'-fosfosulfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DEPC	Piromcarbonato de dietila
DSMZ	Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>)
DTT	Ditiotreitol
EW	Eletrólise (<i>Electrowinning</i>)
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FT-IR	Transformada de Fourier no Espectro Infravermelho
Hdr	Heterodissulfeto redutases
JCVI	<i>John Craig Venter Institute</i>
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
LC – MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem.
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCA	Análise das Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i>)

PMSF	Fenilmetanosulfonil
PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i> (busca do peptídeo em Banco de Dados)
SNV	Padrão Normal de Variação (<i>Standard Normal Variate</i>)
Sqr	Sulfeto-quinona redutases
SX	Extração por Solventes (<i>Solvent Extraction</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
Tqr	Tiosulfato-quinona redutase

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
SUMÁRIO	12
INTRODUÇÃO	14
1.1. Biolixiviação	15
1.2. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	17
1.3. <i>Thiobacillus prosperus</i>	19
1.4. AS bases moleculares da tolerância ao sal em bactérias	21
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1: Análise do perfil metabólico de células de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> cultivadas na presença de NaCl por espectroscopia RAMAN	26
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
1.4. CONCLUSÕES	40
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 2: Análise do proteoma de células de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> expostas ao NaCl	48
2.1. INTRODUÇÃO	49
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
2.4. CONCLUSÕES	66
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
2.6. ANEXO I	76
CAPÍTULO 3: Análise comparativa do transcriptoma de células controle e <i>salt-shock</i> de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	78
3.1. INTRODUÇÃO	79
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	81

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.4. CONCLUSÕES	110
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
CAPÍTULO 4: Sequenciamento do genoma de <i>Thiobacillus prosperus</i> DSM 14174.....	124
4.1. INTRODUÇÃO	125
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	127
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
4.4. CONCLUSÕES	137
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146

INTRODUÇÃO

1.1. Biolixiviação

A biolixiviação consiste na utilização de micro-organismos acidófilos capazes de oxidar íon ferroso e compostos reduzidos de enxofre para catalisar a dissolução de sulfetos metálicos (Mishra *et al.*, 2005; Johnson, 2014). A técnica tem demonstrado ser menos agressiva ao meio ambiente do que os processos tradicionais de extração de metais, como a pirometalurgia (aplicação de altas temperaturas para o isolamento de metais) e a hidrometalurgia (utilização de solventes ácidos para a dissolução dos metais dos sulfetos metálicos), onde uma grande quantidade de componentes tóxicos (como ácidos e gases poluentes) acaba sendo produzida no processo (Schippers *et al.*, 2014). O grande avanço na biolixiviação se deve, principalmente, à crescente demanda de metais, particularmente cobre, além de zinco, ouro, níquel, prata, cádmio, dentre outros. No caso do cobre, a recuperação por biolixiviação cresceu consideravelmente a partir do ano 2000 e atualmente estima-se que cerca de 20% da produção mundial seja proveniente da aplicação desse processo (Watling, 2006; Schippers *et al.*, 2014). Os maiores produtores mundiais de cobre por biolixiviação são o Chile, a Austrália e os Estados Unidos, mas outros países como o Peru e a China também têm utilizado esse processo (Olson *et al.*, 2003). O fato da produção mundial de metais, particularmente do cobre, ser insuficiente perante a crescente demanda mundial (Watling, 2015), torna necessária a otimização do processo de biolixiviação.

Os minerais sulfetados de cobre podem ser divididos em duas categorias: primários e secundários. A biolixiviação é comumente utilizada para recuperar cobre a partir dos minerais sulfetados secundários. Já o mineral sulfetado de cobre primário, mais abundante na natureza, calcopirita (CuFeS_2) é mais refratário ao processo de biolixiviação. Deste modo a extração do cobre a partir da calcopirita ainda é feita predominantemente pelos métodos tradicionais de pirometalurgia e hidrometalurgia (Watling, 2015).

A biolixiviação é geralmente aplicada em reatores agitados ou em pilhas, dependendo do teor de metal do minério a ser processado (Johnson, 2014). Este processo quando aplicado a minerais sulfetados de cobre secundários geralmente utiliza micro-organismos mesófilos, dos gêneros *Acidithiobacillus* e *Leptospirillum* (Rawlings & Johnson, 2007). A recuperação de cobre nesses processos varia entre 60 - 80%. Os ciclos de biolixiviação nas pilhas podem variar de dias, no caso de tanques agitados, até um ou mais anos, no caso de pilhas ou resíduos de minérios (Johnson, 2014).

As principais vantagens da biolixiviação em pilhas de minerais sulfetados de cobre são (Watling, 2006):

- Baixo custo operacional (OPEX) e moderado custo de capital (CAPEX);
- Flexibilidade para produção de cobre em uma ampla escala, entre 10 e 200kt/ano;
- Flexibilidade para aplicação no processamento de minérios de baixo teor e resíduos sulfetados;
- Recuperações de metal entre 60% e 80%, dependendo das condições de processo e da mineralogia do material a ser processado;
- Integração com os processos de extração por solventes (SX) e eletrólise (EW) para produção de cobre metálico de alta pureza (99,99%);
- Emprego de equipamentos pouco sofisticados, associados à simplicidade operacional.

Para a biolixiviação de uma pilha de minerais sulfetados de cobre, estes normalmente são reduzidos a grânulos e empilhados em colunas que alcançam em média 10 metros de altura e até centenas de metros de comprimento. As pilhas são irrigadas por cima por meio de um sistema de irrigação e, frequentemente, é adicionada uma solução contendo os micro-organismos que irão promover a biolixiviação destes sulfetos. A água adicionada permite que os micro-organismos entrem em contato com o minério e o tamanho reduzido destes permite uma maior superfície de contato com as bactérias. Além disso, o sistema é continuamente aerado, uma vez que os micro-organismos são comumente aeróbicos (Johnson, 2014). As pilhas são envolvidas com membranas impermeáveis para evitar a perda da solução lixiviante e percolante contendo os micro-organismos e o metal dissolvido. Frequentemente, esta solução é retirada e utilizada para extração com solventes, acoplado ao eletrorefinamento, para obtenção de cobre de alta pureza. A solução percolante sem cobre é reintroduzida nas pilhas pelo sistema de irrigação (Johnson, 2014; Watling, 2015).

Alguns estudos sugerem que os íons cloreto atuam como um agente para o aumento da lixiviação da calcopirita. Liang *et al.* (2012) utilizaram a arqueobactéria *Acidianus manzaensis* na biolixiviação da calcopirita e relataram que a adição de 0,66 g/L (16,5 mM) de NaCl reduziu drasticamente o acúmulo de enxofre elementar sobre o mineral. Bevilacqua *et al.* (2013) analisaram o efeito da adição de 5,84 g/L (100 mM) de NaCl na biolixiviação da calcopirita por *A. ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*, e observaram

que na presença de NaCl *A. ferrooxidans* apresentou uma maior eficiência na biolixiviação do sulfeto metálico. Foi observado também que nem a camada de enxofre elementar e nem o mineral secundário jarosita foram encontrados na superfície da calcopirita. Esses resultados sugerem que os íons cloreto dificultam a deposição da camada de enxofre elementar sobre a calcopirita, aumentando a área de ação dos micro-organismos o que eleva as taxas de dissolução do sulfeto metálico (Liang *et al.*, 2012; Bevilaqua *et al.*, 2013).

Poucas espécies de micro-organismos acidófilos com capacidade de oxidar o íon ferroso e compostos reduzidos de enxofre são capazes de crescer em meio ácido com moderada ou elevada salinidade (concentrações de cloreto acima de 5 g/L) (Simmons & Norris, 2002). Os microrganismos acidófilos comumente empregados nos processos de biolixiviação são geralmente inibidos pelo íon cloreto que acumula no interior da célula, com consequente desnaturação e acidificação do citoplasma (Alexander *et al.*, 1987; McLaggan *et al.*, 1990).

A biolixiviação em escala industrial requer o uso de água com baixo teor de sal, devido à inibição da atividade bacteriana em concentrações elevadas do íon cloreto. Shiers *et al.* (2005) mencionaram que a água disponível em alguns locais da Austrália contém 100 g/L de cloreto, o que limita a implantação de processos de biolixiviação nessas áreas. A presença de água com alto teor de sal também foi relatada em algumas áreas de mineração no Chile (Zammit *et al.*, 2009).

Alguns microrganismos acidófilos que possuem capacidade de crescer em ambientes ácidos com elevada salinidade têm sido descritos na literatura (Wang *et al.*, 2012; Zammit *et al.*, 2012). Merece destaque a bactéria *Thiobacillus prosperus* que, apesar do seu potencial, ainda é pouco estudada.

1.2. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans é um bacilo não patogênico, Gram negativo, mesofílico, com temperatura ótima de crescimento ao redor de 30°C e acidofílico, com pH ótimo variando em torno de 2,0. Seu metabolismo é diazotrófico, além de estritamente autotrófico e quimiolitotrófico, podendo crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings & Kusano, 1994; Ohmura *et al.*, 2002; Valdés *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2013). Entre as diversas linhagens, o conteúdo de GC varia de 55 a 65% e o genoma possui de 2,2 a 3Mb (Valdés *et al.*, 2008). Esta bactéria é isolada de

ambientes inorgânicos e acidofílicos como depósitos minerais e efluentes ácidos de minas (Rawlings, 2002; Johnson, 2014).

Além de interessante do ponto de vista acadêmico, com sua biologia peculiar, *A. ferrooxidans* possui considerável interesse econômico, ambiental e industrial. Esta bactéria é uma das mais importantes na biolixiviação (Leduc & Ferroni, 1994; Rawlings, 2005; Valdés *et al.*, 2008; Schippers *et al.*, 2014). Ela também pode ser útil na biorremediação (recuperação de áreas degradadas), em particular na remoção de metais pesados presentes em esgotos (Lombardi & Garcia Jr, 1999) e na recuperação de áreas degradadas de ambientes de mina (Natarajan, 2008; Ko *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2013, Dopson & Johnson, 2012). A bactéria pode ser utilizada também na recuperação de áreas contaminadas com material radioativo, como o urânio (Gargarello *et al.*, 2010).

Há uma quantidade considerável de informações a respeito da genética molecular de *A. ferrooxidans*. Valdés *et al.* (2003) identificaram genes envolvidos na captação, assimilação e metabolismo de enxofre. Com o sequenciamento do genoma da bactéria (Valdés *et al.*, 2008), foram propostos modelos para o metabolismo de enxofre, sendo estes modelos diferentes daqueles descritos para outros micro-organismos acidófilos, como *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Acidithiobacillus caldus* (Valdés *et al.*, 2008b).

A obtenção de carbono em *A. ferrooxidans* ocorre exclusivamente pela assimilação de CO₂, por meio da atividade da enzima ribulose bifosfato-carboxilase (RuBisCO), que incorpora o CO₂ ao ciclo de Calvin, de maneira bem semelhante as plantas, algas e outras bactérias autotróficas (Holuigue *et al.*, 1987; Appia-Ayme *et al.*, 2006; Valdés *et al.*, 2008; Valdés *et al.*, 2008b). Heinhorst *et al.* (2002) identificaram dois genes que codificam a enzima RuBisCo em *A. ferrooxidans*, sendo proposto por estes autores que as duas cópias são resultado da transferência horizontal de genes.

Em ambientes ácidos, os íons ferrosos (Fe²⁺) oxidam mais lentamente que em ambientes com pH próximo à neutralidade e, desta forma, são prontamente utilizados por *A. ferrooxidans*. Dessa forma, os elétrons são transferidos do íon ferroso para o NAD⁺, regenerando o NADH, que será utilizado para a biossíntese de aminoácidos, ácidos nucleicos, lipídeos, e outros. O complexo de transferência de elétrons é acoplado à produção de energia através da ATP sintase (Valdés *et al.*, 2008; Quatrini *et al.*, 2009). Já os compostos reduzidos de enxofre são oxidados pelas enzimas heterodissulfeto redutases (Hdr), sulfeto-quinona redutases (Sqr) e thiosulfato-quinona redutases (Tqr), que realizam a transferência dos elétrons para o NAD⁺. Os complexos enzimáticos que reduzem os compostos de enxofre produzem uma molécula intermediária, a adenosina-5'-fosfosulfato (APS) que, sob a ação de

uma ATP sulfurilase, produzem o ATP. A APS pode ainda ser direcionada para o metabolismo de aminoácidos (Valdés *et al.*, 2008; Quatrini *et al.*, 2009; Dopson & Johnson, 2012). Em ambos os casos, os elétrons são transferidos para o oxigênio, que reage com os prótons para compensar a entrada destes no citoplasma.

Acidithiobacillus ferrooxidans possui resistência a vários íons metálicos (Hutchins *et al.*, 1986). Esta resistência pode chegar a concentrações da ordem de 10^{-1} M para alumínio, manganês, cobalto, cobre, níquel, zinco e cromo; 10^{-2} M para urânio e cádmio; 10^{-3} M para molibdênio, selênio, telúrio e arsênio; 10^{-4} M para mercúrio e 10^{-5} M para prata (Hutchins *et al.*, 1986; Leduc & Ferroni, 1994; Leduc *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2005). O genoma da bactéria possui vários genes que codificam proteínas envolvidas no efluxo e/ou influxo destes metais (Valdés *et al.*, 2008). Isto mostra a grande capacidade de *A. ferrooxidans* para sobreviver em ambientes com altas concentrações de metais.

Apesar da importância de *A. ferrooxidans* na biolixiviação, pouco se sabe sobre a tolerância ao sal em diferentes linhagens desta bactéria. Lawson *et al.* (1995) relataram que o NaCl, na concentração de 2,5 g/L, é tóxico para a bactéria, não sendo possível adaptá-la a essa condição de crescimento. De *et al.* (1997) concluíram que concentrações de até 10 g/L de NaCl não afetam significativamente a atividade da bactéria. Outros estudos mostraram que culturas mistas contendo *A. ferrooxidans* sofreram um efeito inibitório na presença de 7 g/L de NaCl, reduzindo as taxas de replicação em até 50%, sendo que estas bactérias não se adaptaram a tais condições a longo prazo (Shiers *et al.*, 2005). Nicolle *et al.* (2009) observaram que linhagens de *A. ferrooxidans* apresentam a oxidação do ferro inibida em concentrações de 10 g/L de NaCl. Brock (1975) relatou que linhagens de *A. ferrooxidans* conseguiam oxidar o ferro na presença de 20 g/L de NaCl. Xiong *et al.* (2008) e Xiong & Guo (2011) descreveram linhagens de *A. ferrooxidans* que foram cultivadas sucessivamente em concentrações de NaCl de até 11,7 g/L.

1.3. *Thiobacillus prosperus*

A tolerância ao cloreto de sódio em micro-organismos acidófilos oxidantes de ferro e enxofre é de grande interesse em operações de biomineração onde somente água salina está disponível para o processo de biolixiviação (Nicolle *et al.*, 2009). *Acidithiobacillus ferrooxidans*, um dos principais micro-organismos envolvidos em biolixiviação, tem o crescimento inibido em concentrações de cloreto superiores a 1% (Daves-Belmar *et al.*, 2008; Watling, 2015). Já *Thiobacillus prosperus* apresenta tolerância ao cloreto de sódio e é capaz

de oxidar ferro e enxofre. Contudo, sua capacidade de metabolizar ferro e enxofre é reduzida quando comparada as linhagens mais utilizadas nos processos de biolixiviação (Huber & Stetter, 1989).

A bactéria *Thiobacillus prosperus* foi isolado na costa da ilha de Vulcano, Itália, e descrito pela primeira vez por Hubber & Stetter (1989). É uma bactéria Gram-negativa, quimiolitotrófica, capaz de crescer a 20-45°C (temperatura ideal em torno de 35°C), em valores de pH de 1,0 a 4,5 (pH ideal em torno de 2,0). As células de *T. prosperus* observadas em microscópio de contraste de fase se mostraram como pequenos bastonetes, com 1 µm de comprimento e 0,2-0,4 µm de largura, com um flagelo polar de 0,4 µm de comprimento (Huber & Stetter, 1989). A bactéria requer cloreto para o crescimento (Nicolle *et al.*, 2009), suportando concentrações de até 6% de NaCl (Huber & Stetter, 1989), sendo o crescimento ótimo em meio contendo entre 1% e 2% de cloreto (Daves-Belmar *et al.*, 2008). Devido a alta tolerância ao sal, *T. prosperus* tem o potencial de ser utilizada em biolixiviação industrial em ambientes onde *A. ferrooxidans* não é capaz de crescer (Huber & Stetter, 1989).

A designação na nomenclatura de *T. prosperus* sempre foi considerada incorreta e uma nova reclassificação da espécie foi sugerida (Nicolle *et al.*, 2009; Ossadron *et al.*, 2014; Cárdenas *et al.*, 2015). Por exemplo, a análise das sequências do gene de rRNA 16S de isolados de *T. prosperus* sugeriu que a bactéria estava mais relacionada a membros da família Ectothiorhodospiraceae (Simmons & Norris, 2002). Além disso, outras análises filogenéticas revelaram que *T. prosperus* não estava relacionada a outras espécies do gênero *Thiobacillus* (Meyer *et al.*, 2007). Kelly e colaboradores (2005) sugeriram que a bactéria deveria ser renomeada e retirada do gênero *Thiobacillus*. Um novo gênero chegou a ser proposto para descrever a espécie, *Acidihalobacter* (Norris *et al.*, 2004). Recentemente o genoma da linhagem DSM 5130 da bactéria foi sequenciado (Ossadron *et al.*, 2014) e a nova classificação foi finalmente realizada, através de diferentes estudos taxonômicos com a sequência do gene de rRNA 16S, além da análise de filogenia multi-proteína e a identidade média dos nucleotídeos no genoma comparado ao de várias outras bactérias (Cárdenas *et al.*, 2015). A linhagem tipo (DSM 5130) foi renomeada *Acidihalobacter prosperus*.

Acidihalobacter prosperus é capaz de crescer e oxidar pirita em meio contendo até 6% (p/v) de cloreto de sódio (Huber & Stetter, 1989; Davis-Belmar *et al.*, 2008). O genoma desta bactéria revelou a presença de genes envolvidos na biossíntese e captação de ectoína e glicina-betaína, moléculas que auxiliam na sobrevivência da bactéria em ambientes com altas concentrações de sal (Beales, 2004; DasSarma *et al.*, 2010). Na presença de NaCl e meio suplementado com tetrionato de potássio, *A. prosperus* apresentou taxas de

crescimento semelhantes a *A. ferrooxidans* (Nicolle *et al.*, 2009). Isto sugere que a bactéria possui potencial para ser utilizada em processos de biolixiviação em locais onde a água disponível para o processo contém sal. Em 2003 Dew & Du Plessis (BHP Billiton) solicitaram um pedido de privilégio (WO 02/081761 A2) para utilização das linhagens de *T. prosperus* depositadas na DSMZ sob o número DSM 14174 e DSM 14175 em processos de biolixiviação de minérios e concentrados sulfetados em pilhas e/ou reatores agitados. Até o momento, pouco se sabe sobre as bases moleculares da tolerância ao sal dessa bactéria.

1.4. AS bases moleculares da tolerância ao sal em bactérias

Os micro-organismos precisam manter uma pressão de turgor constante para garantir suas atividades metabólicas. Isto é possível graças à membrana celular (Bougouffa *et al.*, 2014). O contato direto com o ambiente torna os micro-organismos susceptíveis a variações na osmolaridade do meio. Sendo assim, se os micro-organismos não possuem estratégias para se adaptar a estas condições, o estresse osmótico pode levá-los à morte. Por estes motivos, as bactérias desenvolveram mecanismos moleculares para responder a variações na osmolaridade do meio (Sleator *et al.*, 2001; Krämer, 2010).

Quando há um aumento da osmolaridade externa (aumento na concentração de sal), as bactérias respondem em três etapas: 1) desidratação do citoplasma; 2) reidratação do citoplasma através do ajuste da composição de solventes com acumulação de íons ou solutos compatíveis e 3) alteração dos perfis de expressão gênica e troca de osmólitos iônicos por solutos compatíveis. Como resultado deste processo, o crescimento é retomado (Morbach & Kramer, 2002, Oren, 2008). A morfologia das bactérias é geralmente modificada nestas condições. Isto é, as células tendem a ser alongadas, inchadas e com superfície irregular, em adição a mudanças no volume citoplasmático. A composição química das membranas também pode ser modificada, assim como o padrão de síntese das proteínas, ácidos graxos e polissacarídeos (Zahran, 1997; Oren, 2008).

As bactérias que habitam ambientes salinos adotam duas estratégias para osmo adaptação: a captação de íons do meio externo (estratégia *salt-in*) e/ou a acumulação de solutos orgânicos compatíveis de baixo peso molecular para balancear a pressão osmótica externa. As bactérias halofílicas, ou seja, aquelas que vivem em ambientes com altas concentrações de sal, adotam a estratégia denominada *salt-in*, na qual a bactéria mantém uma concentração citoplasmática de íons como o K^+ similar àquela do meio externo com o objetivo de manter o equilíbrio osmótico. O citoplasma destes micro-organismos necessita

que a maioria das enzimas seja enriquecida por aminoácidos acidificados, dependentes de K^+ e/ou Na^+ para atividade. Esse mecanismo é acompanhado de modificações fisiológicas as quais são necessárias para proteger as funções metabólicas e regulatórias na presença de sal (Zahran, 1997; Empadinhas & da Costa, 2008; Bougouffa *et al.*, 2014). A estratégia *salt-in* parece restrita a arqueobactérias halofílicas extremas da família *Halobacteriaceae*, que incluem os gêneros *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium* e *Natronococcus*, além das bactérias halofílicas da ordem *Haloanaerobiales* (Empadinhas & Costa, 2008), e a bactéria *Salinibacter ruber* (Oren, 2008).

Outra estratégia adotada por algumas bactérias envolve a biossíntese e/ou captação dos chamados solutos compatíveis. Para se ajustarem aos níveis externos de NaCl, as células acumulam uma variedade de pequenas moléculas sem carga iônica no citoplasma para contra-atacar a pressão osmótica externa. Estes solutos são descritos como osmólitos orgânicos e são compatíveis com o metabolismo celular (Zahran, 1997). Eles não interferem no metabolismo microbiano e, deste modo, podem ser acumulados em grande quantidade, permitindo assim o equilíbrio osmótico com o ambiente externo (Bougouffa *et al.*, 2014). O acúmulo de solutos compatíveis no interior da célula, além de não inibir a ação das enzimas celulares, contribui na estabilização das proteínas (Morbach & Krämer, 2002). Em geral, uma proteína é considerada estabilizada quando é mantida na sua conformação nativa. Os solutos compatíveis forçam a proteína a continuar na conformação correta, agindo como chaperonas químicas (Roesser & Muller, 2001; Roberts, 2005). Os solutos compatíveis utilizados na osmorregulação são os açúcares e derivados, polióis e derivados, aminoácidos e seus derivados, incluindo metil-aminas, e ainda heterosídeos, como glicosilglicerol e manossacarose (Roesser & Muller, 2001; Bougouffa *et al.*, 2014).

Osmólitos podem ser sintetizados pela célula ou transportados para o interior desta. Glicina betaína é um dos osmólitos mais encontrados nos organismos, além de ser um dos mais efetivos (Courtenay *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2013; Bougouffa *et al.*, 2014). A expressão heteróloga dos genes de biossíntese da glicina betaína em vegetais resultou em plantas transgênicas com um significativo aumento na tolerância ao sal (Sakamoto & Murata, 2000). A prolina é outro osmólito que pode ser acumulado em grandes quantidades no interior da célula, sendo encontrada em bactérias e plantas. Entre os açúcares, a sacarose e a trealose são os osmólitos mais encontrados em bactérias como mecanismo de resposta ao estresse salino (Bougouffa *et al.*, 2014). Outros osmólitos importantes em bactérias são a ectoína e a hidroxi-ectoína (Morbach & Krämer, 2002; Oren, 2008; Bougouffa *et al.*, 2014).

A inserção de genes que codificam osmólitos em organismos não-tolerantes pode aumentar sua capacidade em suportar o estresse salino (Roberts, 2005). Proteínas funcionais, incluindo enzimas necessárias para biossíntese de vários osmoprotetores, transportadores de íons para homeostase dos níveis de K^+ e Na^+ , além de enzimas de detoxificação, protegem diretamente contra este tipo de estresse. Pan *et al.* (2009) mostraram que proteínas regulatórias estão envolvidas no controle da expressão gênica e transdução de sinal na resposta a múltiplos estresses, incluindo o estresse osmótico em diversos organismos. Estas proteínas regulatórias incluem fatores de transcrição, quinases e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfoinosítídeos. Um exemplo é o regulador da expressão sigma S (RpoS) que é induzido em *E. coli* exposta a várias condições de estresse, incluindo falta de nutrientes, hiperosmolaridade, pH ácido, e altas e baixas temperaturas. Mais de 80 genes regulados por RpoS foram identificados (Weber *et al.*, 2005).

Pan *et al.* (2009) observaram que o gene *irrE* - regulador global de resistência a radiação em *Deinococcus radiodurans* - confere um aumento significativo na tolerância ao sal quando é inserido na bactéria *E. coli* e na planta *Brassica napus*. Os autores sugeriram que a proteína IrrE age como um regulador dos genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas na resposta ao estresse. Além disso, a proteína IrrE também controla a expressão de proteínas quinases e outras proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, tanto em *E. coli* quanto em *B. napus*.

As adaptações das bactérias em ambientes com alta salinidade são essenciais para sua sobrevivência. Porém, tais estratégias de adaptação – acúmulo de solutos compatíveis e *salt-in* – ainda não foram descritas em bactérias acidófilas utilizadas na biolixiviação, como *A. ferrooxidans*. Recentemente, foi descrito que na bactéria acidófila *A. prosperus* existem genes responsáveis pela biossíntese da ectoína e pela captação da glicina betaína (Ossadron *et al.*, 2014). A partir deste trabalho, novos caminhos para o desenvolvimento de bactérias acidófilas mais efetivas na biolixiviação em ambientes onde a água disponível contém sal podem ser abertos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

O projeto teve como objetivo a análise das bases moleculares da tolerância ao sal na bactéria acidófila *A. ferrooxidans*, além da análise do genoma da bactéria acidófila e halotolerante *T. prosperus* DSM 14174.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da dinâmica de crescimento de células de *A. ferrooxidans* na presença de diferentes concentrações de NaCl;
- Análise do perfil metabólico de células de *A. ferrooxidans* cultivadas na presença e na ausência de NaCl por RAMAN;
- Análise do proteoma de células de *A. ferrooxidans* cultivadas na presença (células *salt-30*) e na ausência de NaCl;
- Análise do transcriptoma de células de *A. ferrooxidans* cultivadas na presença (células *salt-shock*) e na ausência de NaCl;
- Análise do genoma da bactéria *Thiobacillus prosperus*.

CAPÍTULO 1

**Análise do perfil metabólico de células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*
cultivadas na presença de NaCl por espectroscopia RAMAN**

1.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas para o estudo de micro-organismos submetidos a diferentes tipos de tratamento, seja na busca de novas terapias, seja na busca de novas características bioquímicas ou ainda para a compreensão dos mecanismos de resposta aos mais diferentes tipos de estresse, vem sendo amplamente estudado (Almarashi *et al.*, 2012; Lv, 2012; Delvigne & Goffin, 2014). Este esforço vem resultando na implementação de novas e importantes metodologias, as quais permitem a caracterização bioquímica, molecular e fisiológica, bem como a diferenciação de micro-organismos. Neste contexto, a espectroscopia RAMAN (Efremov *et al.*, 2008), tem se estabelecido como uma importante ferramenta para a identificação e caracterização de micro-organismos (Jarvis & Goodacre, 2004; Craig *et al.*, 2013).

A espectroscopia RAMAN consiste em um método baseado no fenótipo para identificação e caracterização de bactérias, e possui inúmeras vantagens frente a outros métodos clássicos de identificação bacteriana. Isto é, para a realização desta técnica é necessário um mínimo de preparação da amostra, além de não haver a necessidade do uso de reagentes e fixadores. Além disso, o RAMAN é uma técnica não destrutiva, não invasiva e rápida (Krafft *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2011; van de Vossenberg *et al.*, 2013). Esta técnica é ainda capaz de diferenciar até mesmo linhagens de bactérias de uma mesma espécie (Almarashi *et al.*, 2012; Hamasha *et al.*, 2013), além de permitir a diferenciação de bactérias submetidas ou não a diferentes tipos de estresse (Münchberg *et al.*, 2014).

A espectroscopia RAMAN envolve a utilização de lasers que provocam a excitação de moléculas em comprimentos de onda que vão do espectro infravermelho, passam pelo espectro visível e podem alcançar o espectro ultravioleta. O laser incidido sobre o micro-organismo gera um espectro que reflete a combinação de todas as moléculas que compõem a estrutura da membrana bacteriana (carboidratos, proteínas, ácidos graxos e outras moléculas) (van der Vossenberg *et al.*, 2013; Maquelin *et al.*, 2002).

Dependendo do comprimento de onda do laser emitido, diferentes estruturas podem ser detectadas, ou seja, um laser com comprimento de onda no espectro ultravioleta (244 nm) é capaz de identificar estruturas específicas, tais como DNA e proteínas intracelulares, podendo ainda identificar mudanças fisiológicas em bactérias cultivadas em meio seletivo. Por outro lado, um laser com comprimento de onda de luz visível (532 nm)

pode detectar proteínas, lipídeos, polissacarídeos, DNA e carboidratos. Já um laser com comprimento de onda no espectro infravermelho (785-1100 nm) é capaz de identificar, com precisão, proteínas, lipídeos e polissacarídeos presentes na membrana externa das células (Walter, 2010).

Desta forma, a utilização da espectroscopia RAMAN faz com que a investigação de micro-organismos inteiros possa ser simplificada (Walter *et al.*, 2010), uma vez que esta ferramenta fornece um *fingerprint* metabólico da bactéria de maneira rápida e eficiente (Nicolaou *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2010; Münchberg *et al.*, 2014).

Nesse sentido, neste trabalho foi utilizada a espectroscopia RAMAN no comprimento de onda no espectro infravermelho a fim de que pudessem ser identificadas alterações na membrana de células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivadas ou não (células controle) na presença de NaCl.

1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1. Linhagem de bactéria e condições de cultivo

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem LR de *A. ferrooxidans* (Garcia Jr, 1991). A bactéria foi cultivada em meio T&K modificado (Tuovinen & Kelly, 1972), contendo em g/L: (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) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e (33,4) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 1,8 ajustado com H_2SO_4 . O meio de cultura foi autoclavado sem FeSO_4 , que foi esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . A bactéria foi cultivada sob agitação a 250 rpm, em temperatura de 30°C e na ausência de NaCl (pré inóculo). O cultivo das células foi monitorado através da titulação da oxidação do ferro no meio de cultura com dicromato de potássio – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, de acordo com Garcia Jr *et al.* (1995). Ao atingir 80% de oxidação de Fe^{2+} (correspondente à fase *log* de crescimento), o pré-inóculo foi utilizado para inocular quatro novas subculturas com diferentes concentrações de NaCl no meio – 0 mM (controle), 100 mM (5,84 g/L), 200 mM (11,69 g/L) e 300 mM (17,53 g/L). O experimento foi realizado em triplicata. O esquema de cultivo das células encontra-se representado na Figura 1.1.

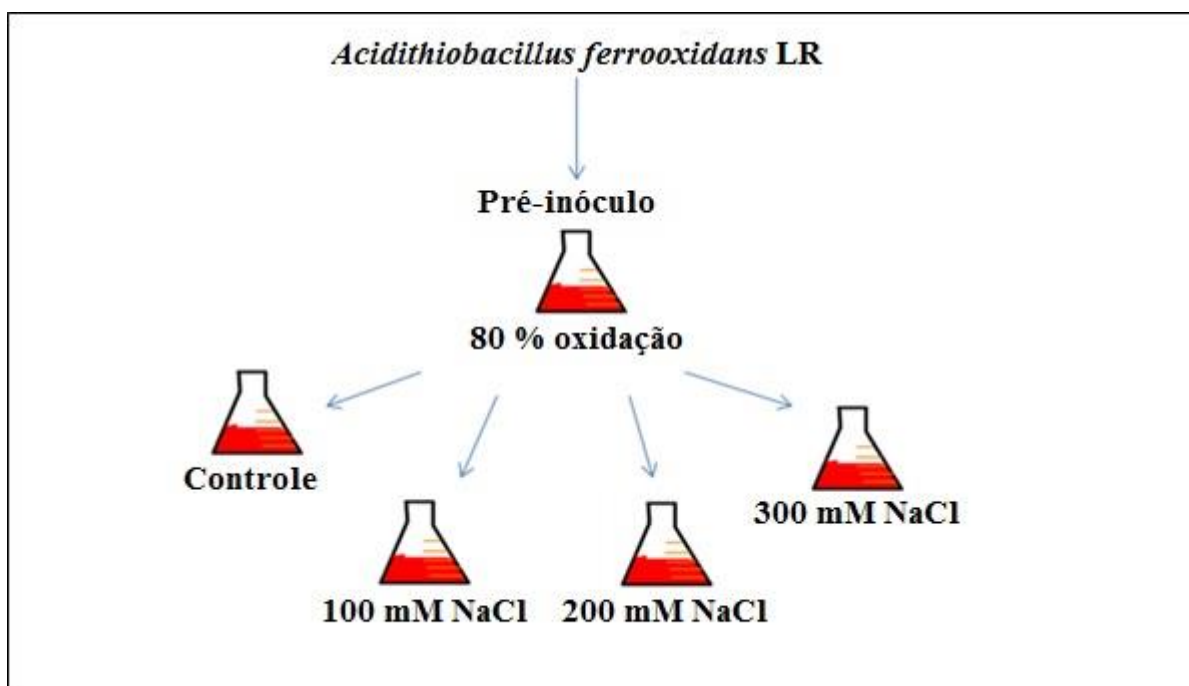


Figura 1.1. Esquema de crescimento de *A. ferrooxidans* LR na presença de diferentes concentrações de NaCl. As células foram cultivadas na ausência de NaCl (pré-inóculo) e, ao atingir 80% de oxidação

de Fe^{2+} , foram inoculadas em meio T&K contendo 0 mM (controle), 100 mM, 200 mM e 300 mM de NaCl. O tempo de oxidação do Fe^{2+} foi determinado por titulação com dicromato de potássio.

Além disso, as células cultivadas em meio T&K na presença de 100 mM de NaCl foram sistematicamente cultivadas até que o seu tempo de crescimento fosse semelhante ao tempo de crescimento das células controle (30 subculturas, denominadas células *salt-30*). A partir de outro pré-inóculo, após o cultivo das células atingir 80% de oxidação do Fe^{2+} , uma alíquota deste cultivo foi transferida para um novo meio de cultura T&K acrescido de 100 mM de NaCl para avaliar o efeito imediato do sal (denominadas células *salt-shock*).

1.2.2. Espectroscopia RAMAN

O perfil metabólico das células de *A. ferrooxidans* cultivadas na presença de NaCl (*salt shock* e *salt 30*) e na ausência de NaCl (*controle*) foi determinado por espectroscopia RAMAN. A espectroscopia RAMAN foi realizada no Laboratório do Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os experimentos foram realizados em um espectrômetro RamanStation™ 400F (Perkin Elmer), utilizando um laser com comprimento de onda no espectro infravermelho em 785 nm. As amostras foram colocadas em uma placa de alumínio e utilizou-se um microscópio com objetiva de 50x para focalização.

Os espectros dispersivos na região do infravermelho médio-próximo foram obtidos através de 25 exposições de 10 segundos cada em potência máxima (250 mwatts), determinando-se o espectro final como a média destes 25 espectros. A resolução espectral utilizada foi de 4 cm^{-1} , e a faixa de comprimento de onda analisada variou entre 3200 e 400 cm^{-1} .

Para validação dos dados todo o experimento foi repetido, e os espectros obtidos foram exatamente iguais aos do primeiro experimento, mostrando que não houve degradação das amostras. As leituras de todas as células (*controle*, *salt-shock* e *salt-30*) foram feitas em triplicatas independentes (triplicatas técnicas e biológicas). Os dados foram analisados no software MatLab versão 6.5.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans* – crescimento na presença de NaCl

Com o intuito de analisar o efeito do NaCl nas células de *A. ferrooxidans*, o seu crescimento foi observado na presença de diferentes concentrações de sal. Os resultados mostraram que as células cultivadas na ausência de NaCl oxidaram completamente o Fe^{2+} do meio em aproximadamente 23 horas. Por outro lado as células mantidas em meio na presença de 100 mM de NaCl atingiram 96% de oxidação do Fe^{2+} em 39 horas e 100% de oxidação do Fe^{2+} em 47 horas, indicando que o NaCl possui um efeito direto no crescimento de *A. ferrooxidans*. As células cultivadas na presença de 200 mM de NaCl atingiram um máximo de 80% de oxidação do Fe^{2+} durante o período do experimento - 96 horas - não conseguindo desta forma oxidar completamente o Fe^{2+} do meio dentro do tempo estabelecido. Já as células cultivadas em meio T&K contendo 300 mM de NaCl não apresentaram crescimento, mantendo constante o percentual de apenas 13% de oxidação do Fe^{2+} do meio, a partir de 39 horas. A análise do efeito do NaCl nas células de *A. ferrooxidans* é mostrada na Figura 1.2.

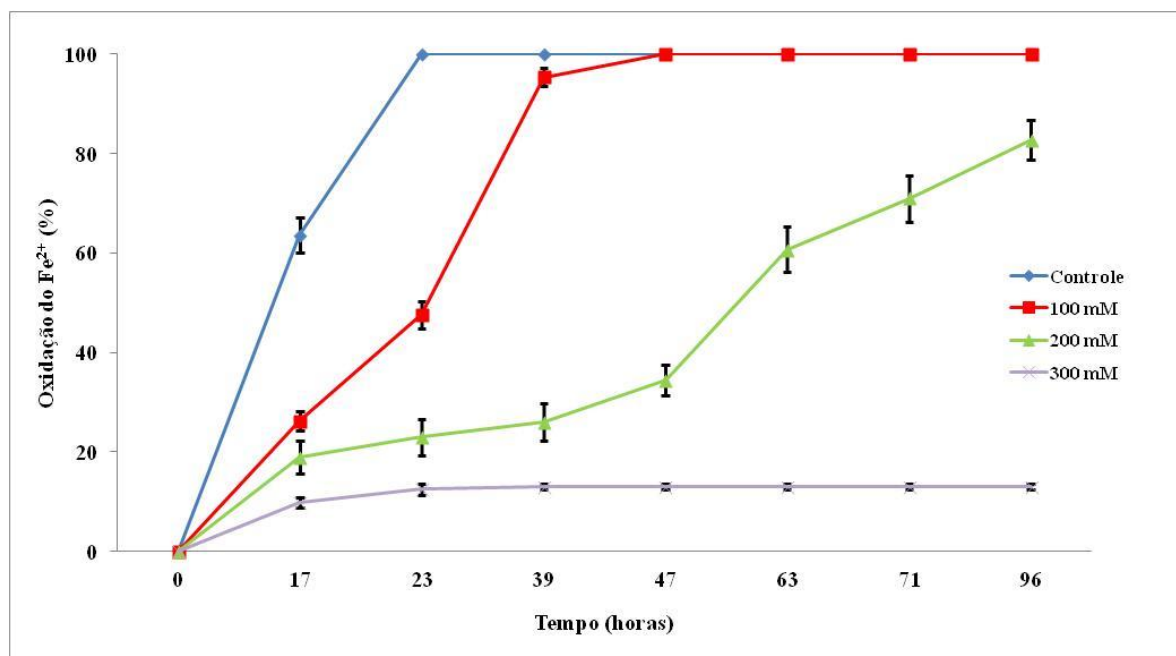


Figura 1.2. Oxidação do Fe^{2+} por *A. ferrooxidans* LR na presença de diferentes concentrações de NaCl [0 (Ctrl), 100, 200 e 300 mM].

Os dados obtidos reforçam os descritos na literatura a respeito do efeito do NaCl nas células de *A. ferrooxidans*, ou seja, apesar da grande variabilidade nas taxas de tolerância ao NaCl registradas para diferentes linhagens, os trabalhos (Lawson *et al.*, 1995; Shiers *et al.*, 2005) mostram que o cloreto de sódio apresenta um efeito severo no crescimento das células. A maioria dos estudos concluiu que, em condições experimentais, concentrações acima de 1% de NaCl (10 g/L) são tóxicas para *A. ferrooxidans* (Lawson *et al.*, 1995; Shiers *et al.*, 2005). Neste trabalho, a adição de 200 mM de NaCl ao meio T&K restringiu de maneira acentuada a oxidação do Fe^{2+} , por outro lado a adição de 300 mM de NaCl restringiu quase que totalmente a oxidação do Fe^{2+} pela linhagem LR de *A. ferrooxidans*.

Em bactérias acidófilas, estudos mostraram que a presença de NaCl desregula o intrincado e frágil potencial de membrana das células. Estes organismos sobrevivem graças a complexos mecanismos de regulação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e geração de energia, uma vez que há grandes diferenças nas concentrações de íons dentro e fora das células. O influxo de uma alta concentração de íons Cl^- do meio extracelular para o citoplasma da célula causa um colapso neste sistema, podendo ser uma das causas da sensibilidade ao sal (Alexander *et al.*, 1987; McLaggan *et al.*, 1990; Gahan *et al.*, 2010).

Muitas bactérias halófilas sobrevivem em concentrações de NaCl acima de 2 M (11,6%) (Sorokin *et al.*, 2006; Bowers *et al.*, 2009; Shivanand & Mugeraya, 2011; Moreno *et al.*, 2013); porém, são bactérias com metabolismo diferente das bactérias acidófilas e possuem mecanismos distintos para sobreviver em ambientes com altas concentrações de sal, como por exemplo, a captação e biossíntese de solutos compatíveis (Sorokin *et al.*, 2013; Oren, 2013).

Com base nos resultados mostrados na Figura 1.2, foi escolhida a concentração de 100 mM de NaCl para a realização de subculturas sucessivas de *A. ferrooxidans* LR, para que fosse possível observar o efeito dos íons cloreto na bactéria a longo prazo. O tempo de oxidação do Fe^{2+} das subculturas é mostrado na Figura 1.3. Foram observadas diferentes fases de oxidação do Fe^{2+} pelas células na presença de NaCl. Na primeira fase, o tempo de oxidação do Fe^{2+} foi mantido entre 46 e 47 horas até a quarta subcultura. Na segunda fase, entre a quinta e a oitava subcultura, o tempo de oxidação caiu para 34 horas, mantendo-se nesta faixa (entre 34 e 37 horas). Em uma terceira fase, entre a nona e a décima sexta subcultura o tempo de oxidação do Fe^{2+} caiu novamente permanecendo entre 30 e 33 horas. Na quarta fase, a partir da décima sétima subcultura o tempo de oxidação de Fe^{2+} manteve-se razoavelmente estável entre 26 e 28 horas, permanecendo desta forma até a trigésima subcultura (última observação feita).

Cabe ressaltar que este processo de obtenção das células *salt-30* durou cerca de quatro meses.

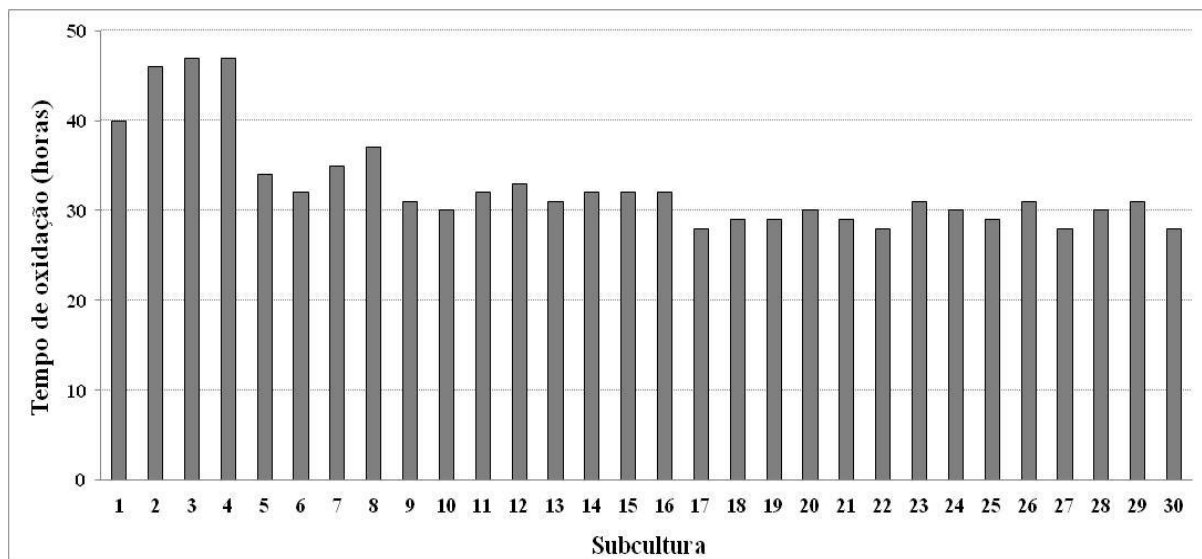


Figura 1.3. Evolução do tempo de oxidação total do Fe^{2+} por *A. ferrooxidans* LR na presença de NaCl. As células foram repicadas sucessivamente em meio de cultura T&K na presença de 100 mM de NaCl, e o tempo de oxidação do Fe^{2+} foi determinado por titulação com dicromato de potássio.

Apesar de não terem alcançado o mesmo tempo de oxidação do Fe^{2+} das células controle (em torno de 23 horas), o tempo de crescimento das células da subcultura número 30, na presença de 100 mM de NaCl, foi relativamente semelhante. Estas células foram então denominadas *salt-30*. É importante dizer que algumas linhagens de *A. ferrooxidans*, testadas por outros autores, não conseguiram se crescer na presença de 100 mM de NaCl em meio de cultura (Lawson *et al.*, 1995; Shiers *et al.*, 2005; Nicolle *et al.*, 2009). A heterogeneidade nos níveis de tolerância ao estresse osmótico é um fenômeno já descrito em outros micro-organismos, como *Escherichia coli* (Benito *et al.*, 1999) e *Cronobacter sakazakii* (Álvarez-Odróñez *et al.*, 2012).

Para uma análise mais detalhada dos efeitos do NaCl em *A. ferrooxidans* LR foram utilizadas células controle, células *salt-shock* e células *salt-30* em experimentos de espectroscopia RAMAN.

1.3.2. Espectroscopia RAMAN

Os resultados da espectroscopia RAMAN são mostrados nas Figuras 1.4 e 1.5. Inicialmente, o espectro escolhido foi de $3200 - 400 \text{ cm}^{-1}$, na faixa do infravermelho médio – curto. Todos os espectros gerados, correspondentes às amostras controle, *salt-shock* e *salt-30*, foram sobrepostos em uma única área para uma melhor observação de eventuais diferenças entre os espectros (Figura 1.4a). Após uma análise detalhada dos espectros, foi escolhida a região mais informativa do espectro total correspondente à região entre 1800 e 1000 cm^{-1} . Esta região espectral traz muitas informações sobre proteínas, lipídeos e carboidratos de membrana (Figura 1.4b). A seguir, os espectros foram pré-processados, utilizando-se como parâmetros matemáticos entre outros, a normalização por SNV (*Standard Normal Variate*) e a primeira derivada (Barnes *et al.*, 1989), uma vez que estes dois parâmetros matemáticos foram os que apresentaram os melhores resultados. As cinco regiões do espectro processado que apresentaram a maior diferença entre as amostras (componentes) são mostradas na Figura 1.5a. Essas cinco regiões do espectro processado foram submetidas à *Análise das Componentes Principais* (PCA) no programa MatLab versão 6.5 para que fossem identificadas as diferenças significativas responsáveis pela separação das amostras (Figura 1.5b).

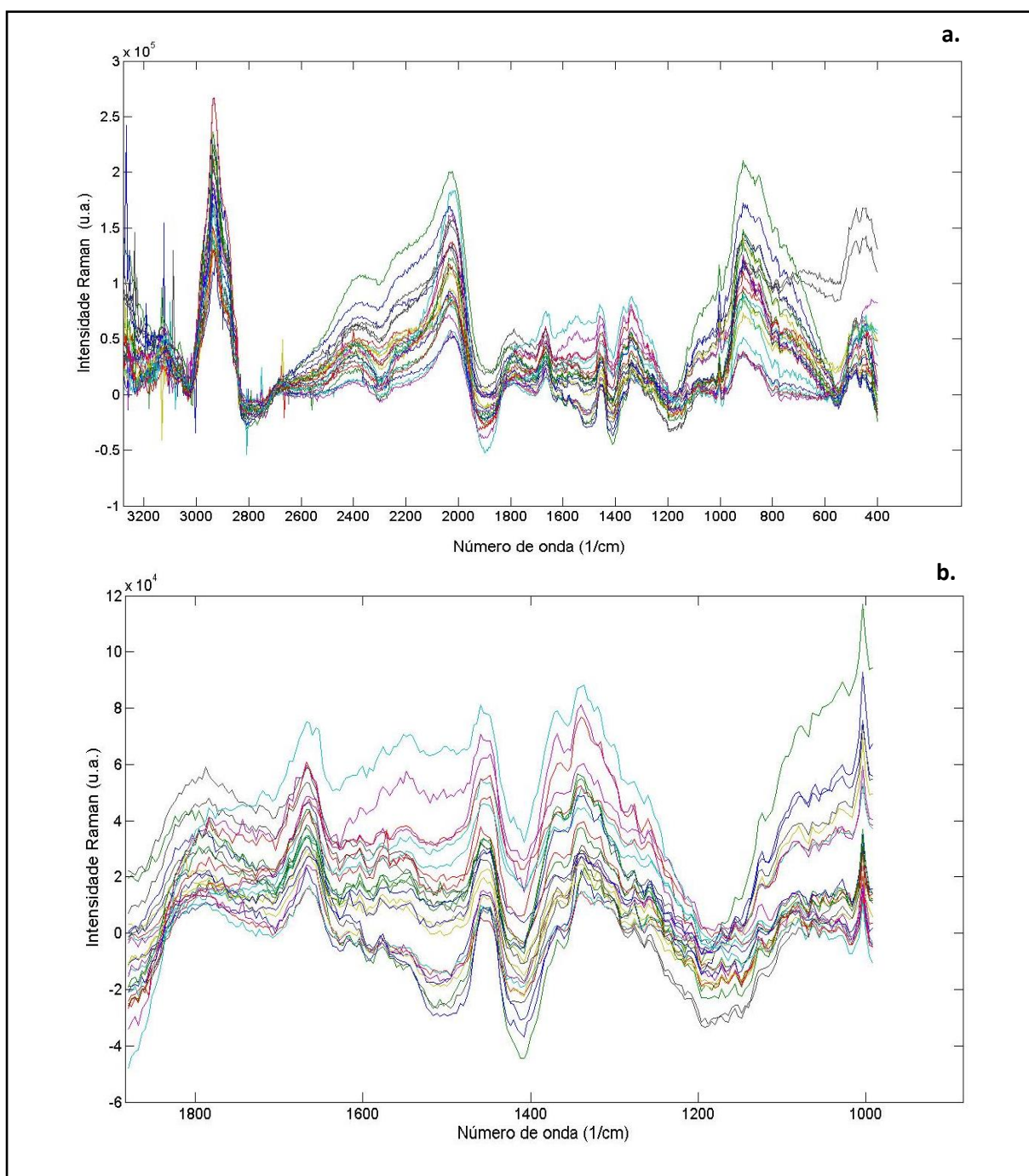


Figura 1.4. Espectroscopia RAMAN das células de *A. ferrooxidans* controle, *salt-shock* e *salt-30*. (a) Espectros gerados pela espectroscopia RAMAN. (b) Região espectral utilizada para a identificação dos picos responsáveis pela separação das amostras (1800 – 1000 cm^{-1}). A intensidade do RAMAN é medida em unidades arbitrárias (*arbitrary units* - *u. a.*).

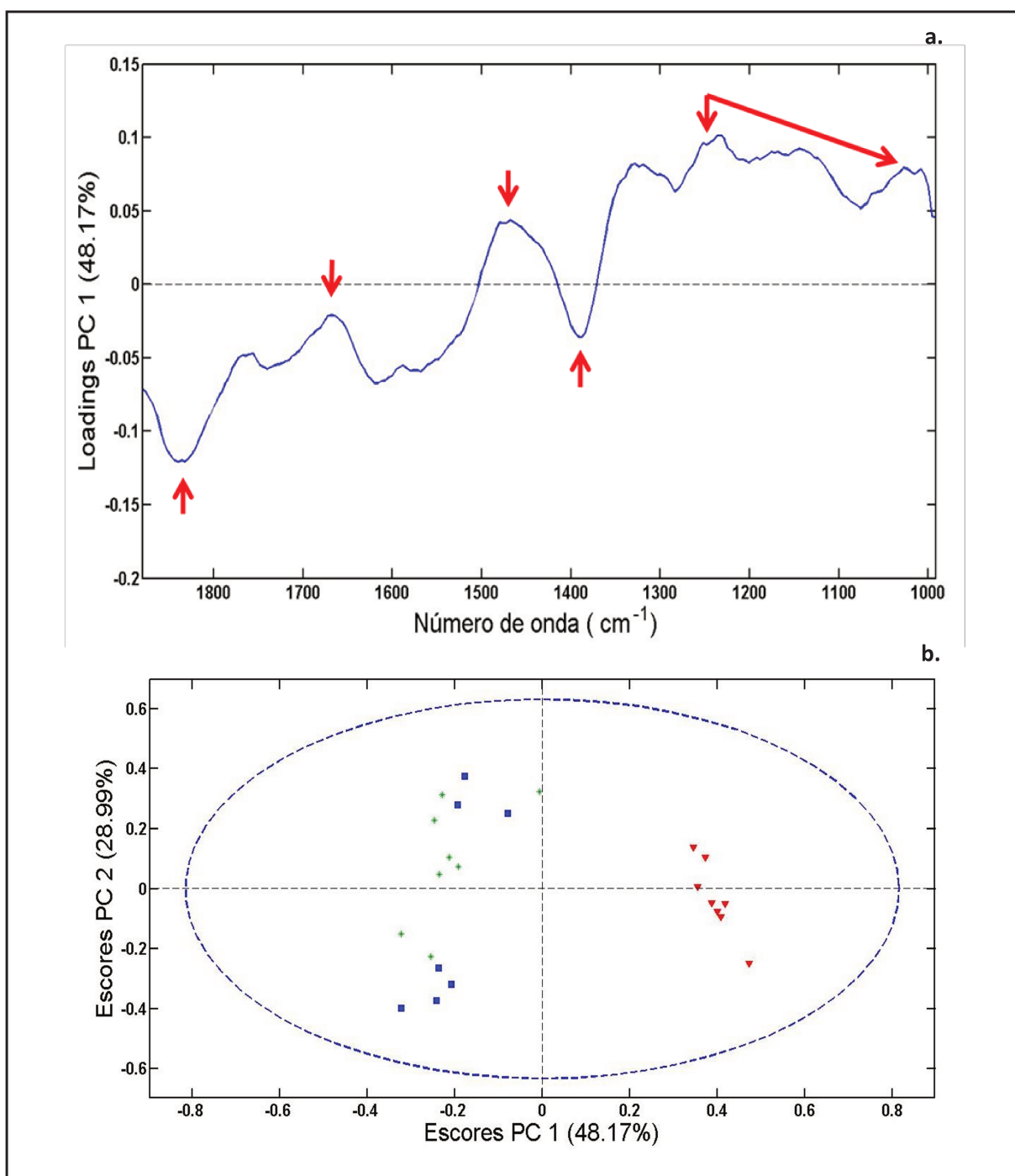


Figura 1.5. Espectroscopia RAMAN das células de *A. ferrooxidans* controle, *salt-shock* e *salt-30*. (a) Espectro processado da região escolhida (1800 – 1000 cm^{-1}) mostrando os picos e as regiões espectrais responsáveis pela separação das amostras (setas em vermelho). (b) Análise das duas componentes principais (PCA) mais importantes (1668 cm^{-1} e 1250 – 1050 cm^{-1}), as quais foram responsáveis pela separação das amostras. O modelo PC1 versus PC2 foi construído para as amostras controle (vermelho), *salt-shock* (verde) e *salt-30* (azul).

As cinco componentes principais encontradas na análise descrevem 96,8% da variância dos dados. São elas:

- **1820 cm^{-1}** : refere-se a dobramentos simétricos de ligação C=O de grupos, como ácidos carboxílicos presentes em resíduos de aminoácidos em proteínas e também em carboidratos (Chamlers & Griffiths, 2002; Ambujakshan *et al.*, 2008; Hemalata *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2014). Estes dados sugerem uma alteração na concentração dos compostos na membrana celular das bactérias.

- **1668 cm^{-1}** : corresponde à amida I de proteínas em α – hélice. Em diversos organismos, como por exemplo *Bacillus sp.* (Zhang *et al.*, 2010) e *E. coli* (Maiti *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Notingher, 2007; Zhang *et al.*, 2010), resultados semelhantes foram encontrados em relação a diferentes tipos de estresse. Inúmeras proteínas da membrana celular possuem configuração em α – hélice, entretanto após a submissão ao estresse salino a concentração dessas proteínas foi alterada.

- **1484 cm^{-1}** : refere-se a vibrações no anel benzênico de resíduos de aminoácidos em proteínas, tais como triptofano, tirosina e fenilalanina, assim como deformações na estrutura C – H₂ de diversos compostos, como por exemplo: proteínas, lipídeos e carboidratos (Chamlers & Griffiths, 2002; Ambujakshan *et al.*, 2008).

- **1388 cm^{-1}** : correspondente à deformação simétrica de estruturas que contém ligações C-C e C-H, principalmente de hidrocarbonetos (Chamlers & Griffiths, 2002; Marshall & Marshall, 2010; Zhu *et al.*, 2013). Esta conformação molecular pode ser encontrada em lipídeos, carboidratos e proteínas, sugerindo assim que, após o estresse salino, diferentes compostos de membrana podem ter sido alterados nas células de *A. ferrooxidans*.

- **1250 – 1050 cm^{-1}** : corresponde a região espectral que representa um importante *fingerprint* metabólico das células. Dentro desta região espectral encontra-se a faixa que compreende os valores entre 1260 e 1220 cm^{-1} , a qual se refere a vibrações de alongamento assimétrico (P=O) de grupamentos fosfato (PO_2^-) presentes em fosfoproteínas e fosfolipídeos (Chamlers & Griffiths, 2002; Matthäus *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011). Neste caso, pode-se inferir que o NaCl pode ter alterado as fosfoproteínas e os fosfolipídeos na membrana de *A. ferrooxidans*, o que poderia ter resultado em uma modificação na permeabilidade da membrana. Assim como o NaCl, estudos com espectroscopia no infravermelho (FT-IR) - *Fourier transform infrared spectroscopy* - demonstraram que alterações na disponibilidade de fosfato e variação na temperatura ideal de crescimento da bactéria também alteram a concentração destas moléculas na membrana de *A. ferrooxidans* (Ribeiro *et al.*, 2011). Esta região corresponde ainda a diversas outras estruturas, entre elas, estruturas responsáveis por

perturbações na estrutura de amida-III de proteínas, estiramento de C-C e C-O-C de alcanos e ligações glicosídicas, correspondendo esta última a anéis glicosídicos (carboidratos) (Chamlers & Griffiths, 2002; Matthäus *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2014).

O gráfico da análise das duas componentes principais (1668 cm^{-1} e $1250 - 1050\text{ cm}^{-1}$) mais importantes (Figura 1.5b), as quais, juntas descrevem um total de 77,16% dos dados, mostra a separação das amostras cultivadas em meio T&K contendo NaCl. As células controle (vermelho) estão agrupadas e separadas das células que foram cultivadas em meio T&K contendo NaCl, seja por um período curto (*salt-shock* - verde), ou por um período prolongado (*salt-30* - azul). As células *salt-shock* e *salt-30* ficaram agrupadas, não podendo ser separadas umas das outras, sugerindo desta forma que os efeitos do NaCl foram semelhantes tanto nas membranas das células *salt-shock* quanto nas membranas das células *salt-30*.

Cabe ressaltar que na espectroscopia RAMAN as intensidades das bandas detectadas nos diferentes tratamentos não podem ser comparadas umas com as outras, uma vez que nesta técnica a intensidade das bandas depende da fonte de radiação e, portanto, torna-se inviável uma estimativa quantitativa dos dados através da espectroscopia RAMAN (Sharma *et al.*, 2003; Vitek *et al.*, 2010). No entanto, estes mesmos dados sugerem que o contato das células com o NaCl causou alterações na composição da membrana celular de *A. ferrooxidans* (proteínas, lipídeos, carboidratos e outros) e que estas alterações persistiram mesmo após longos períodos de contato com o sal. Estes resultados sugerem que as células continuam respondendo ao estresse osmótico, combatendo a entrada de íons cloreto para o seu interior, alterando a estrutura da membrana e, conseqüentemente, modulando sua fluidez.

A literatura ainda não dispõe de estudos correlacionando o efeito do estresse osmótico em bactérias utilizando a técnica da espectroscopia RAMAN. Entretanto, os efeitos de outros tipos de estresse em micro-organismos já foram abordados.

López-Díez *et al.* (2005) observaram uma correlação direta da ação do antibiótico amicacina na síntese protéica e de ácidos nucleicos na bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, resultando em espectros diferenciais gerados pela espectroscopia RAMAN. Desta forma, os autores puderam inferir que ocorreu uma relação direta entre o modo de ação do antibiótico e as alterações detectadas pelo RAMAN no micro-organismo.

Lu *et al.* (2011a) estudaram os efeitos do estresse causado em células de *E. coli*, *Campylobacter jejuni* e *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em meio de cultura com pouca disponibilidade de nutrientes e em baixas temperaturas. Os autores observaram que algumas regiões dos espectros, gerados pela espectroscopia RAMAN, das bactérias submetidas ao

estresse por baixa temperatura, foram diferentes dos espectros das bactérias que não foram submetidas a tal processo. Este fato indicou que várias vias bioquímicas são importantes na resposta ao estresse por baixa temperatura nestas bactérias e contribuíram para a separação das amostras nas análises.

Lu *et al.* (2011b) avaliaram os efeitos de compostos orgânicos de enxofre derivados do alho na bactéria *Campylobacter jejuni* e observaram por espectroscopia RAMAN que tais compostos foram internalizados pelas células e que também houve alterações na membrana celular das bactérias. Atahmneh *et al.* (2014) observaram que, em *E. coli*, a espectroscopia RAMAN foi capaz de diferenciar as células submetidas ao tratamento com antibióticos de diferentes classes.

1.4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pela espectroscopia RAMAN mostraram que esta técnica consiste em uma importante ferramenta capaz de detectar alterações na composição e/ou conformação da membrana celular de *A. ferrooxidans*. Alterações foram identificadas em diferentes componentes da membrana celular da bactéria, tais como: lipídeos, carboidratos, proteínas e compostos secundários (glicoproteínas, glicolipídeos, fosfoproteínas, fosfolipídeos). As alterações na estrutura e na composição da membrana celular de *A. ferrooxidans* funcionam como um mecanismo de defesa contra o estresse salino.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, B.; Leach, S. & Ingledew, W. J. (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology*, 133: 1171-1179.

Almarashi, J. F. M.; Kapel, N.; Wilkinson, T. S. & Telle, H. H. (2012). Raman spectroscopy of bacterial species and strains cultivated under reproducible conditions. *Spectroscopy: an Interactive Journal*, 27(5-6):361-365.

Álvarez-Ordóñez, A.; Begley, M. & Hill, C. (2012). Polymorphisms in *rpoS* and Stress Tolerance Heterogeneity in Natural Isolates of *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11):3975-3984.

Ambujakshan, K. R.; Varghese, H. T.; Mathew, S.; Ganguli, S.; Nanda, A. K. & Panicker, C. Y. (2008). Vibrational spectroscopic studies and theoretical calculations of 2-phenyl-4H-3,1-benzoxazin-4-one. *Oriental Journal of Chemistry*, 24(3):865-874.

Athamneh, A. I. M.; Alajlouni, R. A.; Wallace, R. S.; Seleem, M. N. & Senger, R. S. (2014). Phenotypic profiling of antibiotic response signatures in *Escherichia coli* using Raman spectroscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3):1302-1314.

Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S. & Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5):772-777.

Benito, A.; Ventoura, G.; Casadei, M.; Robinson, T. & Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4):1564-1569.

Bowers, K. J.; Mesbah, N. M. & Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic *Bacteria*: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature

approach a physico-chemical boundary for life. *Saline Systems*, 5:9, doi: 10.1186/1746-1448-5-9.

Chalmers, J. M. & Griffiths, P. R. (Eds.) (2002). *Handbook of vibrational spectroscopy*, volume 5, Wiley, Chichester: Wiley.

Craig, A. P.; Franca, A. S. & Irudayaraj, J. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy applied to food safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4:369-380.

Delvigne, F. & Goffin, P. (2014). Microbial heterogeneity affects bioprocess robustness: dynamic single-cell analysis contributes to understanding of microbial populations. *Biotechnology Journal*, 9(1):61-72.

Efremov, E. V.; Ariese, F. & Goijer, C. (2008). Achievements in resonance Raman spectroscopy: review of a technique with a distinct analytical chemistry potential. *Analytica Chimica Acta*, 606:119-134.

Gahan, C. S.; Sundkvist, J. E.; Dopson, M. & Sandström, A. (2010). Effect of chloride on ferrous iron oxidation by a *Leptospirillum ferriphilum*-dominated chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3):422-431.

Garcia Jr, O. (1991). Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia*, 20:1-6

Garcia Jr, O.; Bigham, J. M. & Tuovinen, O. H. (1995). Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(6): 508–514.

Hamasha, K.; Mohaidat, Q. I.; Putnam, R. A.; Woodman, R. C.; Palchaudhuri, S. & Rehse, S. J. (2013). Sensitive and specific discrimination of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* using Raman spectroscopy—a comparison of two multivariate analysis techniques. *Biomedical Optics Express*, 4(4):481–489.

- Hemalata, F. C. (2011). Vibrational assignments of infrared and laser Raman spectra of nitrofurazone. *Elixir Vibrational Spectroscopy*, 31:1848-1850.
- Jarvis, R. M. & Goodacre, R. (2004). Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 76(1):40-47.
- Karavaiko, G. I.; Turova, T. P.; Kondrat'eva, T. F.; Lysenko, A. M.; Kolganova, T. V.; Ageeva, S. N.; Muntyan, L. N. & Pivovarova, T. A. (2003). Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:113-119.
- Kong, K. V.; Dinish, U. S.; Lau, W. K. O. & Olivo, M. (2014). Sensitive SERS-pH sensing in biological media using metal carbonyl functionalized planar substrates. *Biosensors and Bioelectronics*, 54:135-140.
- Krafft, C.; Knetschke, T.; Funk, R. H. W. & Salzer, R. (2006). Studies on stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. *Analytical Chemistry*, 78(13):4424-4429.
- Lawson, E. N.; Nicholas, C. J. & Pellat, H. (1995). The toxic effects of chloride ions on *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Vargats, T.; Jerez, C. A.; Wiertz, J. V.; Toledo, H. (Eds): *Biohydrometallurgy Processing*, Universidad de Chile, Santiago, pp.165-174.
- López-Díez, E. C.; Winder, C. L.; Ashton, L.; Corrie, F. & Goodacre, R. (2005). Monitoring the mode of action of antibiotics using Raman spectroscopy: investigating subinhibitory effects of amikacin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical Chemistry*, 77:2901-2906.
- Lu, X.; Al-Qadiri, H. M.; Lin, M. & Rasco, B. A. (2011). Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria. *Food Bioprocess Technology*, 4(6):919-935.
- Lu, X.; Liu, Q.; Wu, D.; Al-Qadiri, H. M.; Al-Alami, N. I.; Kang, D. H.; Shin, J. H.; Tang, J.; Jabal, J. M. F.; Aston, E. D. & Rasco, B. A. (2011a). Using of infrared spectroscopy to study the survival and injury of *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* and *Pseudomonas aeruginosa* under cold stress in low nutrient media. *Food Microbiology*, 28(3):537-546.

Lu, X.; Rasco, B.A.; Jabai, J. M. F.; Aston, D. E.; Lin, M. & Konkel, M. E. (2011b). Investigating antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) concentrate and garlic-derived organosulfur compounds on *Campylobacter jejuni* by using Fourier Transform Infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15):5257-5269.

Lv, M. (2012). Mass spectrometry-based metabolomics towards understanding of gene functions with a diversity of biological contexts. *Mass Spectrometry Reviews*, 32:118-128.

Maiti, N. C.; Apetri, M. M.; Zagorski, M. G.; Carey, P. R. & Anderson, V. E. (2004). Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins: α -synuclein. *Journal of American Chemical Society*, 126(8):2399-2408.

Maquelin, K.; Kirschner, C.; Choo-Smith, L. P.; van der Braak, N.; Endtz, H. P.; Naumann, D. & Puppels, G. J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3):255-71.

Marshall, C. P. & Marshall, A. O. (2010). The potential of Raman spectroscopy for the analysis of diagenetically transformed carotenoids. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 368(1922):3137-3144.

Matthäus, C.; Bird, B.; Miljković, M.; Chernenko, T.; Romeo, M. & Diem, M. (2008). Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods in Cell Biology*, 89:275-308.

McLaggan, D.; Keyhan, M. & Matin, A. (1990). Chloride transport pathways and their bioenergetic implications in the obligate acidophile *Bacillus coagulans*. *Journal of Bacteriology*, 172(3):1485-1490.

Moreno, M. L.; Pérez, D.; García, M. T. & Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1):38-51.

Münchberg, U.; Rösch, P.; Bauer, M. & Popp, J. (2014). Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(13):3041-3050.

Ni, Y. Q.; He, N. Y.; Bao, J. T.; Yang, Y.; Wan, D. S. & Li, H. Y. (2008). Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus spp.* strains isolated from diverse habitats in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(2):248-259.

Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic '*Thiobacillus prosperus*'. *Microbiology*, 155:1302-1309.

Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2, doi: 10.1186/1746-1448-4-2.

Nicolaou, N.; Xu, Y. & Goodcare, R. (2011). Fourier transform infrared and Raman spectroscopies for the rapid detection, enumeration, and growth interaction of the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Lactococcus lactis ssp. cremoris* in milk. *Analytical Chemistry*, 83(14):5681-5687.

Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic, *Thiobacillus prosperus*. *Microbiology*, 155(4): 1302-1309.

Nottingham, I. (2007). Raman spectroscopy cell-based biosensors. *Sensors*, 7(8):1343-1358.

Ribeiro, D. A.; Maretto, D. A.; Nogueira, F. C. S.; Silva, M. J.; Campos, F. A. P.; Domont, G. B.; Poppi, R. J. & Ottoboni, L. M. M (2011). Heat and phosphate starvation effects on the proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6):1469-1479.

Sharma, P. K.; Das, A.; Hanumantha Rao, K. & Forssberg, K. S. E. (2003). Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy*, 71(1-2):285-292.

Shiers, D. W.; Blight, K. R. & Ralph, D. E. (2005). Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 80:75–82.

Shivanand, P. & Mugeraya, G. (2011). Halophilic bacteria and their compatible solutes – osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100(10):1516-1521.

Sorokin, D. Y.; Tourova, T. P.; Lysenko, A. M. & Muyzer, G. (2006). Diversity of culturable halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*, 152(10):3013-3023.

Sorokin, D. Y.; Banciu, H.; Robertson, L. A.; Kuenen, J. G.; Muntyan, M. S. & Muyzer, G. (2013). Halophilic and haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. In *The Prokaryotes*: Rosenberg, E., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, pp. 529– 554.

Tuovinen, O. H. & Kelly, D. P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ores. *Journal of Basic Microbiology: Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 12(4): 311-346.

van de Vossenberg, J.; Tervahauta, H.; Maquelin, K.; Blokker-Koopmans, C. H. W.; Uytewaal-Aarts, M.; van der Kooji, D.; van Wezel, A. P. & van der Gaag, B. (2013). Identification of bacteria in drinking water with Raman spectroscopy. *Analytical Methods*, 5:2679-2687.

Vítek, P.; Edwards, H. G. M.; Jehlicka, J.; Ascaso, C.; De Los Ríos, A.; Valea, S.; Jorge-Vilar, S. E.; Davila, A. F. & Wierzbos, J. (2010). Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama desert studied by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical. Physical and Engineering Sciences*, 368(1922): 3205-21.

Walter, A.; Erdmann, S.; Bocklitz, T.; Jung, E-M.; Vogler, N.; Akimov, D.; Dietzek, B.; Rösch, P.; Kothe, E. & Popp, J. (2010). Analysis of the cytochrome distribution via linear and nonlinear Raman spectroscopy. *Analyst*, 135:908–917.

Wu, X.; Zhang, Z.; Deng, F. & Liu, X. (2014). Phylogenetic and genetic characterization of *Acidithiobacillus* strains isolated from different environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2):3197-3209.

Zhang, P.; Kong, L.; Setlow, P. & Li, Y. Q. (2010). Multiple-trap laser tweezers Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of the biological dynamics of multiple individual cells. *Optics Letters*, 35(20):3321-3323.

Zheng, R.; Zheng, X.; Dong, J. & Carey, P. R. (2004). Proteins can convert to β -sheet in single crystals. *Protein Science*, 13(5):1288-1294.

Zhu, J.; Zhou, J.; Guo, J.; Cai, W.; Liu, B.; Wang, Z. & Sun, Z. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. *Chemistry Central Journal*, 7:37, doi: 10.1186/1752-153X-7-37.

CAPÍTULO 2

**Análise do proteoma de células de *Acidithiobacillus ferrooxidans*
expostas ao NaCl**

2.1. INTRODUÇÃO

As alterações causadas pelos íons cloreto em bactérias causam perturbações na expressão de várias proteínas, podendo assim influenciar de uma maneira geral sua fisiologia (Zammit *et al.*, 2012). Uma abordagem que tem sido amplamente utilizada para estudar os efeitos do estresse em bactérias é o proteoma, o qual fornece os padrões de resposta de um micro-organismo ou comunidade de micro-organismos através da análise do seu repertório protéico, sendo possível analisar os padrões de resposta celular em condições de estresse. A técnica torna-se assim uma importante ferramenta para a análise dos mecanismos moleculares utilizados por micro-organismos em situações de estresse (Chao & Hansmeier, 2012).

Zammit e colaboradores (2012) estudaram a resposta ao NaCl em *Acidimicrobium ferrooxidans* e *Acidithiobacillus caldus*. Proteínas relacionadas à membrana celular (como proteínas externas de membrana, transmembrana e associadas a peptidoglicanas), à biossíntese de aminoácidos e à fixação do CO₂ foram diferencialmente expressas na presença de 6-10 g/L de NaCl. O trabalho realçou as dificuldades enfrentadas pelos micro-organismos utilizados na biolixiviação em ambientes salinos, uma vez que o estabelecimento de culturas contínuas, em laboratório, em tais condições foi difícil. Foi sugerido que a menor quantidade de células obtidas em culturas submetidas ao estresse salino pode ter sido uma consequência do direcionamento da energia celular para a síntese de osmólitos e proteínas de membrana celular, em resposta à presença de NaCl.

Em *Desulfovibrio vulgaris*, a expressão de vários genes que codificam proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos e ao transporte de glicina-betaína foi aumentada na presença de 250 mM de NaCl. Os níveis de expressão das proteínas responsáveis pelo efluxo de íons, além das proteínas envolvidas na biossíntese de lipídeos de membrana também foram alterados, indicando que várias vias bioquímicas foram responsáveis pelos mecanismos de resposta apresentados pela bactéria (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

Pouco se sabe sobre a modulação da expressão de proteínas pelo NaCl em *A. ferrooxidans*. Os estudos realizados até hoje abordando a análise do proteoma de *A. ferrooxidans* focaram outros tipos de estresse. Neste sentido, Vera *et al.* (2003) estudaram os efeitos da privação de fosfato em *A. ferrooxidans* e observaram que a expressão da proteína PstS, relacionada com o metabolismo de fosfato na célula, além de proteínas associadas ao estresse, como Dnak, GroEL, proteínas de membrana e outras relacionadas ao metabolismo de

energia tiveram os perfis de expressão alterados nas células. Ribeiro *et al.* (2011) também estudaram os efeitos da privação de fosfato em *A. ferrooxidans* e observaram resultados semelhantes aos obtidos por Vera *et al.* (2003), com um aumento de proteínas relacionadas ao estresse, como DnaK e SurA, além de chaperonas e proteínas da membrana celular. Por outro lado, proteínas relacionadas à transcrição e à assimilação de carbono na célula tiveram os níveis de expressão diminuídos.

O estresse causado pela variação na temperatura também foi estudado por proteômica. Ribeiro *et al.* (2011) avaliaram os efeitos do estresse causado pelo aumento na temperatura em *A. ferrooxidans* e observaram que proteínas relacionadas ao metabolismo de energia, chaperonas e também proteínas de membrana tiveram a expressão aumentada nas células, contrastando com a diminuição na expressão de proteínas relacionadas à transcrição, metabolismo de carbono, e do ferro, além de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. Myktyczuk *et al.* (2011) analisaram os efeitos da diminuição da temperatura nas linhagens D6 e F1 de *A. ferrooxidans* e observaram resultados semelhantes com proteínas envolvidas no metabolismo de energia e de carbono, além de chaperonas, proteínas envolvidas na transcrição com expressão aumentada em ambas as linhagens. Porém, várias proteínas de membrana, além de outras relacionadas ao metabolismo de fosfato e algumas chaperonas foram diferencialmente expressas entre as duas linhagens, as quais possuem temperaturas de crescimento diferentes. Isto destaca a variabilidade encontrada entre as linhagens de *A. ferrooxidans*, que acaba se refletindo também na análise do proteoma.

A resistência a metais pesados em *A. ferrooxidans* também foi analisada por proteoma. Almárcegui *et al.* (2014) observaram que várias proteínas de membrana tiveram um aumento na expressão quando células de *A. ferrooxidans* foram cultivadas na presença de cobre. Além disso, proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos também tiveram os níveis de expressão aumentados. Foi sugerido que estes aminoácidos poderiam estar relacionados à resistência ao cobre por possuírem a capacidade de se ligarem a este metal. Além disso, a diminuição da expressão de proteínas de membrana responsáveis pelo transporte do cobre foi também associada à resistência ao metal. Estes mecanismos compõem uma barreira contra o cobre em excesso no citoplasma da bactéria. Já Dekker *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da exposição de *A. ferrooxidans* ao metal radioativo urânio e observaram resultados semelhantes aos observados por Almárcegui *et al.* (2014). Várias proteínas relacionadas ao estresse oxidativo tiveram a expressão aumentada nas células cultivadas em contato com o metal. Além disso, a expressão de uma importante proteína de membrana possivelmente envolvida no transporte do urânio teve a expressão diminuída, indicando que a

célula responde por diferentes vias a exposição ao metal radioativo, diminuindo a sua entrada no citoplasma e respondendo contra o estresse oxidativo causado dentro da célula pelo urânio.

Levando em consideração a importância de *A. ferrooxidans* na biolixiviação, o objetivo deste capítulo foi realizar uma análise proteômica em larga escala de células expostas ao NaCl por longos períodos (30 culturas sucessivas – células *salt-30*) e células não submetidas a este tipo de estresse (células controle).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Bactérias e condições de crescimento

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem LR de *A. ferrooxidans* (Garcia Jr, 1991). A bactéria foi cultivada em meio líquido T&K modificado (Tuovinen & Kelly, 1972), contendo em g/L: (0,4) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, (0,4) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (0,4) $(NH_4)_2SO_4$ e (33,4) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 1,8 ajustado com H_2SO_4 . O meio de cultura foi autoclavado sem $FeSO_4$ e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . A bactéria foi cultivada sob agitação a 250 rpm, em temperatura de 30°C.

As células cultivadas na presença de 100 mM de NaCl por 30 subculturas sucessivas (células *salt-30*) e as células cultivadas na ausência de NaCl (células controle) foram coletadas quando o nível de oxidação do Fe^{2+} presente no meio atingiu 80%. O cultivo de células (em triplicata) foi monitorado pela titulação da oxidação do ferro no meio de cultura com dicromato de potássio – $K_2Cr_2O_7$ (Garcia Jr *et al.*, 1995). As células foram coletadas por filtração em membrana Millipore (0,45 μm) e lavadas com água ácida (pH 1,8).

2.2.2. Extração de proteínas

A extração de proteínas de *A. ferrooxidans* foi realizada conforme descrito por Smolka *et al.* (2003). As células (aproximadamente 100 mg) foram lavadas três vezes com 1 mL de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8,8, 3 mM KCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA e 1 mM fluoreto de fenilmetanosulfonil - PMSF) e centrifugadas por 2 minutos a 12.000 rpm. A lise das células foi realizada com uma solução contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,5% (m/v) SDS, 5 mM EDTA e 1 mM de PMSF. Em seguida foi adicionado à solução Ditioneitol (DTT) a uma concentração final de 100 mM. As amostras foram deixadas em banho-maria com água fervente por 5 minutos e logo em seguida foram centrifugadas por 2 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica das amostras foi determinada seguindo o método de Bradford (Bradford, 1976). Os experimentos de proteoma foram realizados no Laboratório do Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.2.3. 1D-SDS-PAGE, digestão das proteínas e extração dos peptídeos

Aproximadamente 20 µg de extrato protéico de cada amostra e cada replicata foram submetidos à eletroforese unidimensional (1D) em gel de poliacrilamida (4% *stacking* - 12% *resolving*) (Invitrogen) em um sistema de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra Cell™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Todos os géis de poliacrilamida foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Ao término da eletroforese, cada coluna do gel (correspondendo a uma réplica do extrato protéico) foi dividida em nove partes - correspondendo a nove amostras de proteínas - para posterior digestão com tripsina. Cada uma das partes foi tratada com solução descorante (50% v/v acetonitrila e 50% 25 mM NH_4HCO_3), reduzidas com 10 mM de DTT por 45 minutos a 56°C e alquiladas com 55 mM de iodoacetamida por 30 minutos a temperatura ambiente na ausência da luz. Após este processo as proteínas foram digeridas com tripsina (Promega) por um período de 16 horas a 37°C.

Após a digestão com tripsina, os peptídeos foram extraídos do gel adicionando-se uma solução de acetonitrila (ACN) 50% e ácido trifluoroacético (TFA) a 5% por três vezes. Em seguida a solução de acetonitrila (ACN) 50% e ácido trifluoroacético (TFA) a 5% contendo os peptídeos foi deixada a temperatura ambiente para sua evaporação e os peptídeos foram suspensos em solução de ácido fórmico 0,1% ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$).

A purificação dos peptídeos foi realizada em uma coluna de purificação C_{18} Ultra-Micro SpinColumns (Harvard Apparatus). Os peptídeos foram eluídos das colunas com uma solução de 70% de ACN, 30% de água e 0,1% de ácido fórmico e após a secagem foram armazenados a -20°C. Para cada amostra de células controle e células *salt-30* foram feitas triplicatas independentes (num total de 3 amostras x 9 partes de gel).

2.2.4. Cromatografia Líquida – MS/MS e análise dos dados

As amostras foram analisadas utilizando-se um cromatógrafo EASY-nLC II (Proxeon Biosystems) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). A análise foi realizada com aproximadamente 4 µg dos extratos de peptídeos purificados inseridos em uma coluna capilar de fase reversa C_{18} . Esta coluna possui 18 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro, empacotada com esferas de resina especial ReproSil-Pur C_{18} -AQ de 3 µm). A eluição dos peptídeos foi realizada inserindo-se uma solução com diferentes gradientes. Primeiro foi utilizado um gradiente - fase A - composto de 85% de

água, 15% de ACN e 0,1% de ácido fórmico, seguido por um segundo gradiente - fase B - composto de 15% de água, 85% de ACN e 0,1% de ácido fórmico.

O gradiente iniciou-se com 5% da fase móvel B, alcançando 40% após 95 minutos, 100% após 20 minutos e mais 5 minutos com esta solução. O fluxo da solução foi mantido constante em 200 nL.min⁻¹. Antes da inserção de um novo extrato de peptídeos, a coluna de fase reversa C₁₈ foi reequilibrada adicionando-se 10 µL de ácido fórmico 0,1% a um fluxo variável, de modo que a pressão interna da coluna atingisse 250 bar.

Após a aplicação das amostras (células controle e células *salt-30*) correspondentes às partes do gel de 1 a 9 (as replicatas biológicas foram aplicadas juntas), a coluna foi lavada com um gradiente iniciando-se com 5% da fase B, alcançando 90% após 15 minutos, mantendo-se nesta concentração por mais 5 minutos, baixando para 5% após 9 minutos, mantendo-se por mais 1 minuto nesta concentração, aumentando em seguida para 50% após 15 minutos, aumentando novamente para 90% após 3 minutos e mantendo-se nesta concentração por mais 2 minutos, em uma inserção constante de 300 nL.min⁻¹. Esta fase é importante para que qualquer peptídeo de uma das condições que ficasse retido na coluna não se juntasse aos peptídeos de outra condição que seriam aplicados logo em seguida.

Os espectros de massa foram obtidos através de aquisição dependente de dados, a qual consiste na coleta de dados via varredura automática dos *scans* do MS e espectros de massa em tandem (MS/MS). Cada *scan* do MS de primeira ordem foi gravado no OrbitrapTM (faixa de massa, m/z de 300-2.000 e resolução de 60.000) ao mesmo tempo que o MS/MS dos seis íons mais intensos analisados dos *scans* de primeira ordem foram isolados, fragmentados e gravados via LTQ. A fragmentação no LTQ foi realizada através de dissociação induzida por colisão (utilizando uma energia normalizada de 35; 250 milissegundos de Ativação Q, 10 milissegundos de Tempo de Ativação) e os íons selecionados para a fragmentação foram excluídos de serem resselecionados por 60 segundos. Os arquivos com os dados brutos das replicatas foram convertidos para a extensão .ms2 pelo programa RawXtract versão 1.9.9.1. Em seguida, o *Peptide Spectrum Match* (PSM) - busca do peptídeo em banco de dados - foi realizado pelo programa ProLuCID, versão 1.0.0.31. O PSM utilizou a base de dados de proteínas obtida no NCBI (palavra chave = *A. ferrooxidans*), a qual foi processada com o programa FastDBXtractor, versão 1.0. As configurações de busca foram: a) a base de dados *A. ferrooxidans*; b) a oxidação de metionina como parâmetro variável; c) a carbamido-metilização de cisteína como parâmetro fixo. A tolerância de massa do principal íon foi de 40 ppm e a tolerância MS/MS foi de 600 ppm.

Após a busca, os dados brutos foram filtrados no programa SearchEngineProcessor (versão: março/2012) e a quantificação relativa foi estimada utilizando-se contagem espectral com o programa *PatternLab for Proteomics*. Estes dados brutos foram visualizados no programa *Xcalibur*, versão 2.1 e processados através do programa *Proteome Discoverer*, versão 1.3. Neste programa, o número de proteínas, os grupos protéicos e o número de peptídeos foram filtrados com *False Discovery Rate* (FDR) de menos de 1% e peptídeos de classe 1 utilizando-se o programa *Proteome Discoverer*. O genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (NCBI Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=acidithiobacillus+ferrooxidans>) foi utilizado para a obtenção de informações sobre as proteínas identificadas (identificação do gene que codifica a proteína, além do tamanho, ponto isoelétrico e peso molecular da proteína), e quando os dados referentes à massa molecular e ao ponto isoelétrico não estavam disponíveis na base de dados NCBI, estes foram obtidos utilizando-se a ferramenta *Compute pI/MW* (www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Uma análise pelo programa *Blast2GO* (Conesa *et al.*, 2005) foi realizada para classificar as proteínas por Ontologias Genéticas (GO). As proteínas identificadas foram classificadas pelos termos GO: função molecular e processos biológicos. Para a o teste de enriquecimento de termos GO das proteínas encontradas exclusivamente em uma das condições, controle (72 proteínas) ou *salt-30* (29 proteínas), foi utilizado o pacote *topGO* do *Bioconductor* no programa estatístico R (Alexa & Rahnenfuhrer, 2010). O teste de Fisher foi utilizado para inferir termos GO diferencialmente representados em cada uma das duas condições. Os termos GO do conjunto de proteínas anotadas em *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Quick GO - <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>), foram utilizados como base.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os padrões protéicos das células controle e *salt-30* são mostrados na Figura 2.1a. No gel de poliacrilamida, bandas protéicas proeminentes ao redor de 22, 40 e 70 kDa foram observadas em ambas as condições e a presença destas bandas foi um dos fatores que guiaram a segmentação do gel em nove frações para o processo de digestão das proteínas com tripsina.

Utilizando-se as estratégias *Gel LC-MS/MS* e *Proteome Discoverer*, como ferramenta de busca, filtros de 1% de FDR e ranqueamento 1, foram identificadas 379 proteínas. Deste total, 278 proteínas eram comuns em ambas as condições, 72 proteínas foram encontradas exclusivamente na condição controle e 29 proteínas foram encontradas apenas na condição *salt-30* (Figura 2.2b).

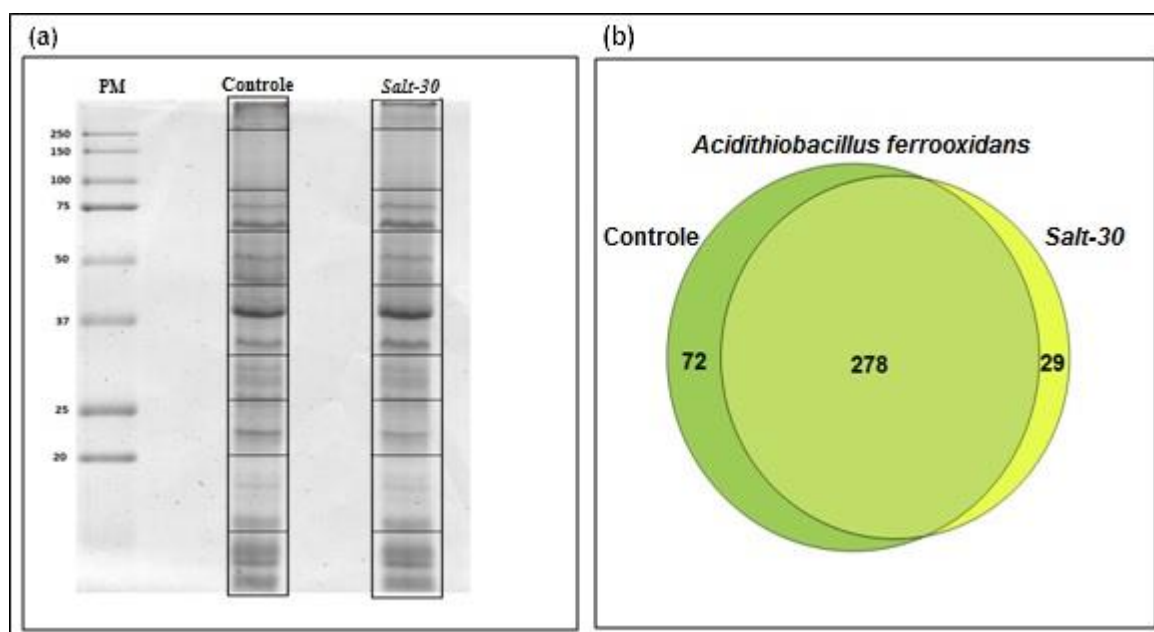


Figura 2.1. (a) Eletroforese unidimensional (1D SDS-PAGE) mostrando os padrões das proteínas isoladas das células de *A. ferrooxidans* controle e *salt-30*. (b) Diagrama de Venn ilustrando o número de proteínas comuns a ambas as condições e específicas a cada uma.

Os padrões de ponto isoelétrico (pI) das proteínas identificadas mostrou-se bastante similar em ambas as condições, com valores de pI variando entre 4 – 7 e 9 – 10 (Anexo I). O conjunto de proteínas com pI básico foi composto principalmente por proteínas

ribossomais, além de proteínas relacionadas à membrana celular e ao periplasma. Algumas das proteínas periplasmáticas foram detectadas somente nas células controle, tais como a lipoproteína da família NLP/P60 (AFE_1828), a subunidade II da citocromo c oxidase (AFE_3150) e a proteína de membrana da família OMP85 (AFE_1452), entre outras. Algumas proteínas, por outro lado, foram encontradas somente nas células *salt-30*, tais como a proteína da família YceI (AFE_0461), a proteína de efluxo de membrana externa (AFE_3265), entre outras. As proteínas associadas à membrana e ao periplasma possuem um alto pI para enfrentar o ambiente ácido em que *A. ferrooxidans* é encontrada (Chi *et al.*, 2007).

As proteínas com o pI abaixo de 7 foram a maioria (aproximadamente 69% do total) e são associadas ao citoplasma. Quando as proteínas detectadas em cada condição foram comparadas, foi observado nas células *salt-30* um decréscimo das proteínas com pI ácido e um aumento das proteínas com o pI básico (Anexo I). Além disso, a média do pI das proteínas *salt-30* foi um pouco maior que o pI observado nas proteínas das células controle (média do pI das proteínas das células *salt-30* = 7,14 e média do pI das proteínas das células controle = 6,57). Estes resultados não foram estatisticamente significativos devido ao baixo número de proteínas encontradas apenas em *salt-30*, mas podem refletir um mecanismo de resposta das células de *A. ferrooxidans* à presença do NaCl.

O software *Blast2GO* classificou 286 das 350 proteínas identificadas na condição controle (278 proteínas expressas em ambas as condições e 72 proteínas expressas somente nas células controle), e classificou também 245 das 307 proteínas encontradas nas células *salt-30* (278 proteínas expressas em ambas as condições e 29 proteínas expressas somente nas células *salt-30*) (Figura 2.1b).

A análise comparativa de GOs mostrou que o padrão de classificação foi bastante similar tanto em células controle quanto em células *salt-30*, assim como nas duas categorias analisadas - Processos biológicos e Função molecular. Ao comparar os termos GO de todas as proteínas de células controle com células *salt-30* não houve nenhum termo GO diferencialmente representado; as pequenas diferenças observadas não foram significativamente diferentes de zero. Isso sugere um padrão protéico estável, apesar do maior número de proteínas encontradas nas células controle. Neste estudo foi utilizado o terceiro nível de classificação de GOs. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 2.2.

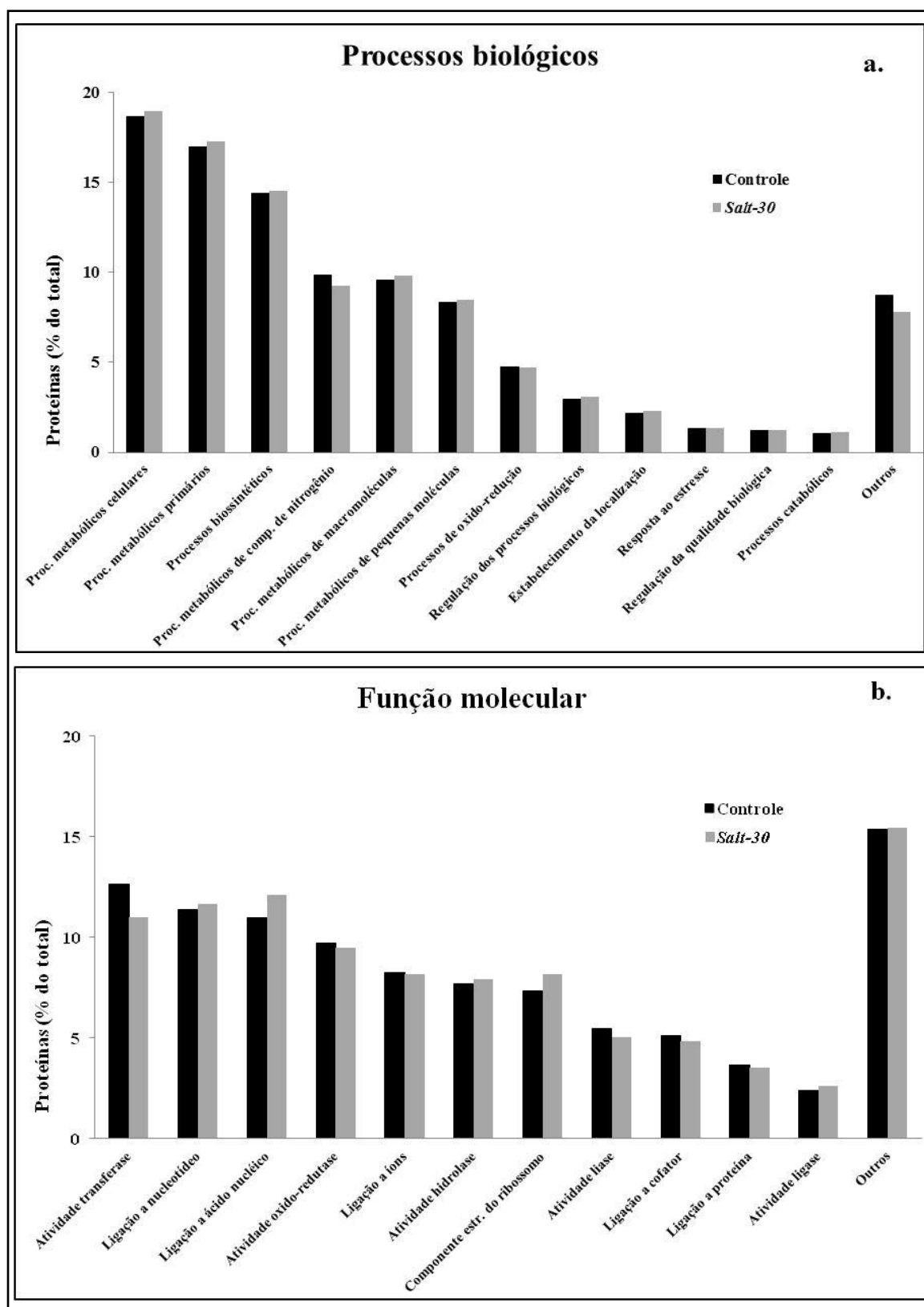


Figura 2.2. Ontologias Genéticas de Processos biológicos (a) e Função molecular (b) das proteínas identificadas pelo proteoma de *A. ferrooxidans* nas células controle (barras em preto) e células *salt-30* (barras em cinza). A análise pelo programa Blast2GO foi realizada para demonstrar as subcategorias das proteínas identificadas. O eixo Y representa o percentual de proteínas que foram anotadas em cada categoria de GO.

Já a análise dos termos GO das proteínas encontradas somente na condição controle mostrou que na categoria Processos Biológicos alguns termos foram mais frequentes, incluindo os relacionados à biossíntese e metabolismo de isoprenóides (GO:0006720 e GO:0008299), terpenóides (GO:0016114 e GO:0006721), metabolismo de ácidos carboxílicos (GO:0006082), aminoácidos (GO:0006520), ácidos orgânicos (GO:0006082) entre outros, sugerindo que estes processos foram afetados nas células *salt-30*. Contudo, nas células *salt-30*, na categoria Processos Biológicos, foi observado um aumento de termos relacionados à biossíntese de menaquinonas (GO:0009233, GO:0009234) e seus precursores, tais como a vitamina K (GO:0042371, GO:0042373) e outras vitaminas lipossolúveis (GO:0006775, GO:0042362), além da respiração aeróbica (GO:0009060). É interessante notar que várias proteínas relacionadas ao metabolismo de energia não foram detectadas nas células *salt-30*; contudo, as análises de GOs sugerem que os termos na categoria Processos Biológicos nestas células podem ilustrar que outras vias de transporte de elétrons podem estar sendo utilizadas quando as células estão na presença de sal.

Agrupamentos de Genes Ortólogos (COGs) das proteínas disponíveis na base de dados do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 foram utilizados para classificar as proteínas identificadas e os resultados foram utilizados para inferir suas funções (Mykytczuk *et al.*, 2011). Assim como nas Ontologias Genéticas, a classificação em COGs apresentou um padrão similar em ambas as condições estudadas (dados não mostrados).

Os padrões de expressão das proteínas serão discutidos de acordo com os COGs encontrados na análise do proteoma.

Biossíntese de aminoácidos. Os padrões de expressão de proteínas mostraram-se semelhantes nas duas condições (controle e *salt-30*). Entretanto, algumas proteínas foram detectadas somente nas células controle, como a 2-isopropilmalato sintase (AFE_1989), relacionada à biossíntese da leucina. Na bactéria *Desulfovibrio vulgaris*, a expressão do gene que codifica esta proteína foi elevada quando as células foram expostas por curtos períodos ao NaCl; por outro lado, a exposição destas células por longos períodos ao NaCl resultou na diminuição dos níveis de expressão do gene (He *et al.*, 2010). É possível que o mesmo fenômeno esteja ocorrendo em *A. ferrooxidans*, uma vez que a enzima não foi detectada nas células *salt-30*.

Embora vários estudos tenham mostrado a produção de diversos aminoácidos nas bactérias submetidas a estresse osmótico, ainda não há estudos mostrando o mesmo comportamento em *A. ferrooxidans*. Conforme observado na análise proteômica, a expressão

de proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos ou outros osmólitos não foi detectada somente nas células *salt-30*. Além disso, o meio de cultivo de *A. ferrooxidans* não fornece aminoácidos para a sua utilização, cabendo à própria célula a produção destes compostos. Segundo Zammit e colaboradores (2012), a resposta das bactérias *Acidithiobacillus caldus* e *Acidimicrobium ferrooxidans* aos íons cloreto não envolveu a expressão de proteínas relacionadas à biossíntese de osmólitos, sendo a energia direcionada à manutenção da homeostase celular (Gahan *et al.*, 2010). Portanto, a biossíntese de osmólitos parece não ser uma estratégia adotada pelas células de *A. ferrooxidans* quando mantidas sob estresse salino.

Envelope celular. O estresse osmótico causado pelo NaCl também afetou a expressão de algumas proteínas de membrana, como por exemplo, a proteína de membrana externa pertencente à família OMP85 (AFE_1452), não detectada nas células *salt-30*. Esta proteína está presente em todas as bactérias (Gentle *et al.*, 2004; Bos *et al.*, 2007), possuindo semelhança com a proteína YaeT de *Escherichia coli*, a qual é uma proteína de membrana conservada tanto em procariotos quanto em eucariotos (Kim *et al.*, 2007). Esta proteína exerce um papel essencial para a montagem da membrana celular externa e a viabilidade celular em *Neisseria meningitidis* (Genevrois *et al.*, 2003; Voulhoux & Tommassen, 2004). Proteínas de membrana externa são conhecidas por desempenhar um papel fundamental na adaptação das células a mudanças ambientais (Bos *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2009; Kulp & Kuehn, 2010). Sendo assim, devido à importância da proteína OMP85 na homeostase celular, a alteração nos níveis de expressão desta proteína em células *salt-30* poderia causar diferentes efeitos negativos na estrutura da membrana celular de *A. ferrooxidans*.

Duas proteínas relacionadas à mobilidade celular - proteína da biogênese da pilina tipo IV (AFE_0967) e proteína PilT (AFE_0264) - não foram encontradas nas células *salt-30*. Estas proteínas estão relacionadas com a biossíntese da pilina tipo IV, a qual está envolvida com vários processos, tais como, mobilidade, sinalização e comunicação celular, além de transferência genética, entre outras (Craig *et al.*, 2004; Ossa Henao *et al.*, 2014). PilT é descrita como uma proteína relacionada à troca dos *pili* da bactéria, processo necessário para sua retração (Alm & Mattick, 1995; Mattick, 2002). Segundo Ossa Henao e colaboradores (2014), a expressão do gene que codifica a proteína PilT é maior em células de *A. ferrooxidans* não ligadas a um substrato. Nas células *salt-30* a presença do NaCl poderia estar alterando a expressão desta proteína, podendo assim refletir na mobilidade e comunicação destas células, redirecionando a energia utilizada nestes processos para outras funções essenciais.

A proteína transportadora de acil malonil-CoA (*fabD*, AFE_1907) – também conhecida como *MCAT* – foi detectada somente nas células *salt-30*. Esta é uma importante enzima catalisadora na transferência do radical malonil do malonil-CoA para as proteínas transportadoras de acil (ACP), tornando-se assim um importante componente na biossíntese de ácidos graxos (Zhang *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). A expressão desta proteína nas células *salt-30* enfatiza o envolvimento da membrana celular de *A. ferrooxidans* na resposta ao estresse causado pelo NaCl.

Processos celulares. Três proteínas relacionadas à adaptação a condições atípicas – a) a proteína da família de estresse universal (AFE_2133), b) a proteína similar a proteína PhoH (AFE_0597) e c) a proteína arsenato redutase (AFE_2860) – foram detectadas somente nas células *salt-30*. As proteínas da família de estresse universal podem ser encontradas tanto em organismos procariontes quanto em organismos eucariontes, sendo induzidas na presença de diferentes tipos de estresse, tais como altas temperaturas, estresse oxidativo, privação de nutrientes entre outros (Liu *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2011). Esta proteína foi induzida em células de *Lysteria monocytogenes* expostas a altos níveis de salinidade (35 e 65 g/L de NaCl) (Esvan *et al.*, 2000). O aumento na expressão desta proteína em *A. ferrooxidans* sugere que esta proteína pode estar envolvida em um dos mecanismos de defesa da bactéria contra o estresse causado pelo NaCl. Com relação à proteína similar a proteína PhoH, esta apresenta-se como um membro do *regulon* fosfato em *E. coli*, respondendo à privação de fosfato (Kazakov *et al.*, 2003). Ambas as proteínas foram superexpressas em células da linhagem D6 de *A. ferrooxidans* submetidas a baixas temperaturas (Mykytczuk *et al.*, 2011). A proteína arsenato redutase (ArsC) converte arsenato tóxico em arsenito, porém não há estudos relacionando a expressão desta proteína em condições de estresse salino. O aumento da expressão da proteína da família de estresse universal em células *salt-30* ilustra a importância desta proteína na resposta de células de *A. ferrooxidans* ao estresse salino. Ainda, o aumento da expressão de proteínas não relacionadas ao estresse salino - a proteína semelhante a PhoH e a proteína arsenato redutase - sugere que a resposta celular ao estresse salino trata-se de um mecanismo muito complexo.

Metabolismo de energia. A exposição ao NaCl alterou a expressão de diferentes proteínas relacionadas ao metabolismo de energia de *A. ferrooxidans*. Algumas destas proteínas não foram detectadas nas células *salt-30*, tais como a NuoB (subunidade B da NADH-quinona oxidorreductase, AFE_2629), a NuoF (subunidade F da NADH-quinona

oxidorreductase, AFE_2625) e a chaperona ResC (proteína da biogênese do citocromo tipo c, AFE_3113). Estas proteínas fazem parte da via “*uphill*” em *A. ferrooxidans*, onde os elétrons são transferidos do Fe^{2+} para o NADH (Quatrini *et al.*, 2009). Ribeiro e colaboradores (2011) mostraram que, em *A. ferrooxidans*, a proteína NuoG (subunidade G da NADH-quinona oxidorreductase), que também faz parte desta via, teve a expressão aumentada em células expostas ao estresse causado por altas temperaturas, sugerindo que a translocação de prótons através da membrana aumentou durante este tipo de estresse. No caso do estresse salino, a diminuição da expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo de energia sugere um decréscimo na translocação de prótons através da membrana, afetando a produção de energia (oxidação do Fe^{2+}). A diminuição da expressão da proteína CoxB (subunidade II da citocromo c oxidase do tipo aa₃, AFE_3150), que faz parte da via “*downhill*”, onde os elétrons são transferidos do Fe^{2+} para as oxidases terminais, corrobora com esta hipótese.

A proteína HybC (AFE_0702) é descrita como uma subunidade de uma hidrogenase semelhante às hidrogenases encontradas em cianobactérias. Valdés e colaboradores (2008) sugeriram que a hidrogenase pode estar envolvida na fixação do nitrogênio. Em cianobactérias, foi observado que a deleção da subunidade maior da hidrogenase, que contém o sítio ativo, interrompeu a atividade da enzima em células mutantes (Appel *et al.*, 2000). A presença desta proteína somente nas células controle de *A. ferrooxidans* parece sugerir que a fixação do nitrogênio pela bactéria pode ter sido prejudicada na presença de NaCl.

Quatro tiorredoxinas (enzimas relacionadas ao estresse oxidativo) foram expressas tanto em células controle quanto em células *salt-30* sugerindo que o NaCl, pelo menos em células cultivadas na presença de NaCl durante longos períodos, não ocasionou estresse oxidativo. Ribeiro e colaboradores (2011) mostraram que duas tiorredoxinas de *A. ferrooxidans* apresentaram uma diminuição da expressão durante o estresse causado por altas temperaturas, indicando que este tipo de estresse também não levou a um estresse oxidativo nas células. Assim como em *A. ferrooxidans*, o estresse oxidativo também não foi observado em células de *Corynebacterium glutamicum* expostas a altos níveis de salinidade (750 mM), uma vez que não foram observadas alterações nos padrões de expressão das tiorredoxinas ou das tiorredoxinas redutases (Fränzel *et al.*, 2010).

O complexo piruvato desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato, gerando acetil-CoA, CO₂ e NADH, sendo esta uma etapa essencial do metabolismo central de carbono (Powles & Rawlings, 1997; Patel *et al.*, 2014). Duas das três proteínas do complexo da piruvato desidrogenase não foram detectadas nas células *salt-30* (subunidades

beta, E1 – AFE_3069, e E2 e E3 – AFE_3067). Uma possível explicação para a diminuição dos níveis de expressão destas proteínas seria que a presença de NaCl pode ter afetado negativamente o metabolismo central de carbono e, como consequência, o metabolismo de energia das células *salt-30* de *A. ferrooxidans*.

“Destino de proteínas”. As proteínas ClpP (AFE_9010) e ClpA (AFE_0520), as quais formam o complexo Clp protease (Ollinger *et al.*, 2012), não foram detectadas nas células *salt-30*. O complexo Clp protease dependente de ATP, em células bacterianas, é responsável pela degradação seletiva de diferentes proteínas, impactando no “controle de qualidade” das proteínas assim como na regulação de vários processos celulares (Baker & Sauer, 2006; Kress *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011). A expressão da proteína ClpA aumentou em células de *A. ferrooxidans* submetidas ao estresse por altas temperaturas (Ribeiro *et al.*, 2011). Uma vez que o complexo Clp é dependente de ATP para sua atividade (Janska *et al.*, 2010), é possível que a baixa disponibilidade de ATP possa ter causado a diminuição da atividade desta protease e, consequentemente, a baixa expressão das proteínas que formam este complexo nas células *salt-30*.

A serina protease da família DO/DeqQ (AFE_1396), detectada nas células *salt-30*, pertence à família de proteínas HtrA (Chi *et al.*, 2007) e encontra-se localizada no periplasma. Estudos demonstraram que esta enzima funciona tanto como uma protease em resposta ao estresse causado por altas temperaturas quanto como uma chaperona em baixas temperaturas (Kim *et al.*, 2003). Em *A. ferrooxidans* esta proteína teve a expressão aumentada quando células foram submetidas ao estresse causado por altas temperaturas (Ribeiro *et al.*, 2011). De acordo com Kim e colaboradores (2005), esta proteína possui um importante papel durante o estresse causado pelo aumento da temperatura, assim como em outros tipos de estresse, uma vez que esta proteína é responsável pela degradação de outras proteínas desnaturadas em bactérias nestas condições. Foi observado em mutantes de *Burkholderia cenocepacia* que não possuíam o gene *htrA*, que o crescimento celular foi prejudicado na presença de NaCl (Flanagan *et al.*, 2007). Desta forma, o aumento dos níveis de expressão desta serina protease em *A. ferrooxidans* sugere que esta proteína poderia desempenhar um papel importante na sobrevivência da bactéria, possivelmente devido à sua função chaperona que pode estar protegendo algumas proteínas periplasmáticas contra os efeitos negativos do NaCl, mesmo após longos períodos de exposição ao estresse salino.

Funções regulatórias e transcrição. Uma proteína reguladora de transcrição pertencente à família Fur (AFE_1955) foi detectada nas células *salt-30*. Esta proteína controla

a expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados à homeostase do ferro, ao metabolismo de energia, entre outros (Hall & Foster, 1996; Quatrini *et al.*, 2007) e o aumento da sua expressão foi descrito anteriormente em células de *A. ferrooxidans* submetidas ao estresse causado por altas temperaturas (Ribeiro *et al.*, 2012) e na presença de baixas concentrações de Fe^{2+} (Ferraz *et al.*, 2011). O aumento dos níveis de expressão da proteína Fur nas células *salt-30* parece sugerir que o sistema de transporte de ferro foi afetado na presença de NaCl, reforçando a ideia de que os sistemas de transporte em *A. ferrooxidans* podem ser afetados por diferentes fatores ambientais.

Os processos de transcrição também parecem ter sido afetados em *A. ferrooxidans* na presença de NaCl, uma vez que quatro importantes proteínas não foram detectadas nas células *salt-30*. A polirribonucleotídeo nucleotidil-transferase, exonuclease 3'-5' de RNA (AFE_0395) está envolvida na degradação de RNA e, em *Streptococcus mutans*, foi observada uma superexpressão desta proteína em células tolerantes ao ambiente ácido (Len *et al.*, 2004). Esta proteína também foi superexpressa em células da linhagem D6 de *A. ferrooxidans* expostas ao estresse por baixas temperaturas (Mykytczuk *et al.*, 2011). Nas células *salt-30* a diminuição dos níveis de expressão desta proteína sugere um efeito negativo do NaCl na degradação do RNA.

As outras três proteínas que não foram detectadas nas células *salt-30* foram: duas das quatro subunidades da RNA polimerase (subunidades Omega, AFE_0564, e beta, AFE_0321) e o fator sigma da RNA polimerase, RpoD (AFE_2336), também chamado σ^{70} , sendo este um fator de iniciação de transcrição (Wösten, 1998; Gruber & Gross, 2003; Werner & Grohmann, 2011). A diminuição dos níveis de expressão destas proteínas sugere que a presença do NaCl afetou a síntese, assim como a degradação de RNA na célula.

Transporte e ligação. A presença de NaCl também alterou a expressão de algumas proteínas de transporte em *A. ferrooxidans*. A proteína do sistema de transporte de fosfato, PhoU (AFE_1440) desempenha um importante papel na captação de fosfato em *E. coli* (Muda *et al.*, 1992) e sua ausência nas células *salt-30* sugere uma alteração no sistema de captação de fosfato nestas células. A proteína TolB (AFE_0067), a qual desempenha um importante papel na ligação estrutural entre as proteínas de membrana externa e os peptideoglicanos, é uma importante proteína relacionada à estabilização da membrana celular externa (Chi *et al.*, 2007). A ausência da proteína TolB em células *salt-30* é outro indicativo dos efeitos negativos do NaCl na membrana externa de *A. ferrooxidans*. A proteína putativa de efluxo de magnésio e cobalto (AFE_0599), encontrada apenas nas células *salt-30*, está

relacionada com a resistência ao cobalto e com a homeostase do magnésio em *E. coli* (Kazakov *et al.*, 2003). Até o momento, esta proteína não foi relacionada ao estresse salino em bactérias.

A expressão de algumas proteínas com funções ainda não estabelecidas em *A. ferrooxidans* também foi aumentada nas células *salt-30*. A proteína da família YceI (AFE_0461) é uma proteína periplasmática possivelmente relacionada com o sistema de transporte de elétrons em *Thermus thermophilus* (Handa *et al.*, 2005). Esta proteína foi superexpressa em células de *E. coli* submetidas ao estresse osmótico (Weber *et al.*, 2006). Já em células de *A. ferrivorans* e *A. caldus*, a proteína YceI, após o contato com o NaCl, apresentou seus níveis de expressão diminuídos (Zammit *et al.*, 2012). A proteína YchF - ligante de GTP - (*ychF*, AFE_2147) é encontrada em quase todos os organismos, sendo que em *Haemophilus influenzae* esta proteína funciona como um fator de tradução dependente de GTP (Teplyakov *et al.*, 2003).

A subunidade B da proteína heterodissulfeto redutase (AFE_2554) está relacionada com o metabolismo de sulfato em *A. ferrooxidans* (Quatrini *et al.*, 2009). A proteína da família ErfK/YbiS/YcfS/YnhG (AFE_0382) foi descrita em *Mycobacterium tuberculosis* como uma lipoproteína putativa (Sutcliffe & Harrington, 2004) e o aumento dos níveis de expressão desta proteína torna-se mais um indicativo dos efeitos do NaCl na membrana de *A. ferrooxidans*.

2.4. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que o NaCl afetou a expressão de proteínas relacionadas a diferentes funções biológicas nas células *salt-30* de *A. ferrooxidans*. Algumas destas proteínas desempenham um papel chave na resposta da bactéria ao NaCl e, sendo assim, podem atuar como biomarcadores da resposta ao estresse salino em *A. ferrooxidans*. Estes biomarcadores poderão ser muito úteis nas operações de biolixiviação onde a água disponível para biolixiviação contém sal.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexa, A. & Rahnenfuhrer, J. (2010). *topGO: topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology*. R package version 2.20.0. <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html>.

Alexander, B.; Leach, S. & Ingledew, W. J. (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology*, 133:1171-1179.

Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1995). Identification of a gene, *pilV*, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Molecular Microbiology*, 16(3):485-496.

Almárcegui, R. J.; Navarro, C. A.; Paradela, A.; Albart, J. P.; von Bernath, D. & Jerez, C. A. (2014). New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 13(2):946-960.

Appel, J.; Phunpruch, S.; Steinmüller, K. & Schulz, R. (2000). The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(5-6):333-338.

Baker, T. A. & Sauer, R. T. (2006). ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(12):647-653.

Kress, W.; Maglica, Z. & Weber-Ban, E. (2009). Clp chaperone-proteases: structure and function. *Research in Microbiology*, 160(9):618-628.

Bos, M. P.; Robert, V. & Tommassen, J. (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annual Review of Microbiology*, 61:191-214.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248-254.

Chao, T.-C. & Hansmeier, N. (2012). The current state of microbial proteomics: Where we are and where we want to go. *Proteomics*, 12:638-650.

Chen, W.; Golden, D. A. & Critzer, F. J. (2014). *Salmonella* survival and differential expression of fatty acid biosynthesis-associated genes in a low-water-activity food. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2):133-138.

Chi, A.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Mackey, A. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. & Jerez, C. A. (2007). Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6(12):2239-2251.

Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M. & Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18):3674-3676.

Craig, L.; Pique, M. E. & Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews*, 2:363-378.

Dahouk, S. A.; Jubier-Maurin, V.; Neubauer, H. & Köhler, S. (2013). Quantitative analysis of the *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to long-term starvation. *BMC Microbiology*, 13:199. doi: 10.1186/1471-2180-13-199.

Dekker, L.; Arsène-Ploetze, F. & Santini, J. M. (2016). Comparative proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in the presence and absence of uranium. *Research in Microbiology*, doi: 10.1016/j.resmic.2016.01.007, in press.

Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Koppineedi, P. R. & Bond, P. L. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*, 149(8):1959-1970.

- Esvan, H.; Minet, J.; Lachie, C. & Cormier, M. (2000). Proteins variations in *Listeria monocytogenes* exposed to high salinities. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3):151-155.
- Ferraz, L. F. C.; Verde, L. C. L.; Vicentini, R.; Felício, A. P.; Ribeiro, M. L.; Alexandrino, F.; Novo, M. T. M.; Garcia Jr, O.; Rigden, D. J. & Ottoboni, L. M. M. (2011). Ferric ion uptake genes are differentially expressed in the presence of copper sulfides in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3):609-617.
- Flannagan, R. S.; Aubert, D.; Kooi, C.; Sokol, P. A. & Valvano, M. A. (2007). *Burkholderia cenocepacia* requires a periplasmic HtrA protease for growth under thermal and osmotic stress and for survival in vivo. *Infection and Immunity*, 75(4):1679-1689.
- Fränzel, B.; Trötschel, C.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; Poetsch, A. & Wolters, D. A. (2010). Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. *Proteomics*, 10(3):445-457.
- Gahan, C. S.; Sundkvist, J.; Dopson, M. & Sandström, A. (2010). Effect of chloride on ferrous iron oxidation by a *Leptospirillum ferriphilum*-dominated chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3):422-431.
- Garcia Jr O. (1991). Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia*, 20:1-6.
- Genevrois, S.; Steeghs, L.; Roholl, P.; Letesson, J. J. & van der Ley, P. (2003). The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *The EMBO Journal*, 22(8):1780-1789.
- Gentle, I.; Gabriel, K.; Beech, P.; Waller, R. & Lithgow, T. (2004). The OMP85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *The Journal of Cell Biology*, 164(1):19-24.
- Gomes, C. S.; Izar, B.; Pazan, F.; Mohamed, W.; Mraheil, M. A.; Mukherjee, K.; Billion, A.; Aharonowitz, Y.; Chakraborty, T. & Hain, T. (2011). Universal stress proteins are important

for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo. *PLoS One*, 6(9):e24965. doi: 10.1371/journal.pone.0024965.

Gruber, T. M. & Gross, C. A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Review of Microbiology*, 57:441-466.

Hall, H. K. & Foster, J. W. (1996). The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *Journal of Bacteriology*, 178(19):5683-5691.

Handa, N.; Terada, T.; Doi-Katayama, Y.; Hirota, H.; Tame, J. R. H.; Park, S. Y.; Kuramitsu, S.; Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2005). Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Science*, 14(4):1004-1010.

He, Z.; Zhong, H.; Hu, Y.; Xiao, S.; Liu, J.; Xu, J. & Li, G. (2005). Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(5):545-549.

Hödar, C.; Moreno, P.; di Genova, A.; Latorre, M.; Reyes-Jara, A.; Maas, A.; González, M. & Cambiazo, V. (2012). Genome wide identification of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 233270) transcription factors and comparative analysis of ArsR and MerR metal regulators. *BioMetals*, 25(1):75-93.

Hong, S. K.; Kim, K. H.; Park, J. K.; Jeong, K. W.; Kim, Y. & Kim, E. E. (2010). New design platform for malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase. *FEBS Letters*, 584(6):1240-1244.

Janska, H.; Piechota, J. & Kwasniak, M. (2010). ATP-dependent proteases in biogenesis and maintenance of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(6-7):1071-1075.

Kao, D. Y.; Cheng, Y. C.; Kuo, T. Y.; Lin, S. B.; Lin, C. C.; Chow, L. P. & Chen, W. J. (2009). Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6):2079-2085.

Kazakov, A. E.; Vassieva, O.; Gelfand, M. S.; Osterman, A. & Overbeek, R. (2003). Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. *In Silico Biology*, 3(1-2):3-15.

Kelly, D. P. & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2):511-516.

Kim, D. Y.; Kim, D. R.; Ha, S. C.; Lokanath, N. K.; Lee, C. J.; Hwang, H. Y. & Kim, K. K. (2003). Crystal structure of the protease domain of a heat-shock protein HtrA from *Thermotoga maritima*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(8):6543-6551.

Kim, S.; Malinverni, J. C.; Sliz, P.; Silhavy, T. J.; Harrison, S. C. & Kahne, D. (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science*, 317(5840):961-964.

Kulp, A. & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology*, 64:163-184.

Len, A. C. L.; Harty, D. W. S. & Jacques, N. A. (2004). Stress-responsive proteins are upregulated in *Straptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology*, 150(5):1339-1351.

Li, Q.; Ren, Y.; Qiu, G.; Li, N.; Liu, H.; Dai, Z.; Fu, X.; Shen, L.; Liang, Y.; Yin, H. & Liu, X. (2011). Insights into the pH up-shift responsive mechanism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Folia Microbiologica*, 56(5):439-451.

Liu, J.; Lou, Y.; Yokota, H.; Adams, P. D.; Kim, R. & Kim, S. H. (2005). Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16):15960-15966.

Liu, W. T.; Karavolos, M. H.; Bulmer, D. M.; Allaoui, A.; Hormaeche, R. D. C. E.; Lee, J. J. & Khan, C. M. A. (2007). Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microbial Pathogenesis*, 42(1):2-10.

- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56:289-314.
- Moiser, A. C.; Li, Z.; Thomas, B. C.; Hettich, R. L.; Pan, C. & Banfield, J. F. (2015). Elevated temperature alters proteomic responses of individual organisms within a biofilm community. *The ISME Journal*, 9:180-194.
- Muda, M.; Rao, N. N. & Torriani, A. (1992). Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology*, 174(24):8057-8064.
- Mykytczuk, N. C.; Trevors, J. T.; Foote, S. J.; Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. & Twine, S. M. (2011). Proteomic insights into cold adaptation of psychrotrophic and mesophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(2):259-277.
- Mukhopadhyay, A.; He, Z.; Alm, E. J.; Arkin, A. P.; Baidoo, E. E.; Borglin, S. C.; Chen, W.; Hazen, T. C.; He, Q.; Holman, H. Y.; Huang, K.; Huang, R.; Joyner, D. C.; Katz, N.; Keller, M.; Oeller, P.; Redding, A.; Sun, J.; Wall, J.; Wei, J.; Yang, Z.; Yen, H. C.; Zhou, J. & Keasling, J. D. (2006). Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an integrated genomics approach. *Journal of Bacteriology*, 188(11):4068-4078.
- Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic *Thiobacillus prosperus*. *Microbiology*, 155(4):1302-1309.
- Ollinger, J.; O'Malley, T.; Kesicki, E. A.; Odingo, J. & Parish T. (2012). Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *Journal of Bacteriology*, 194(3):663-668.
- Ouyang, J.; Guo, W.; Li, B.; Gu, L.; Zhang, H. & Chen, X. (2013). Proteomic analysis of differential expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivated in high potassium concentration. *Microbiological Research*, 168(7):455-460.

Ossa Henao, D. M.; Vicentini, R.; Rodrigues, V. D.; Bevilacqua, D. & Ottoboni, L. M. M. (2014). Differential gene expression in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR planktonic and attached cells in the presence of chalcopyrite. *Journal of Basic Microbiology*, 54(7):650-657.

Quatrini, R.; Lefimil, C.; Veloso, F. A.; Pedroso, I.; Holmes, D. S. & Jedlicki, E. (2007). Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic Acids Research*, 35(7):2153-2166.

Quatrini, R.; Appia-Ayme, C.; Denis, Y.; Jedlicki, E.; Holmes, D. S. & Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, 10:394. doi: 10.1186/1471-2164-10-394.

Patel, M. S.; Nemeria, N. S.; Furey, W. & Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(24):16615-16623.

Powles, R. & Rawlings, D. (1997). The pyruvate dehydrogenase complex of the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* has an unusual E2-E3 subunit fusion. *Microbiology*, 143(7):2189-2195.

Razzel, W. E. & Trussell, P. (1963). Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*. *Journal of Bacteriology*, 85:595-603.

Ribeiro, D. A.; Maretto, D. A.; Nogueira, F. C.; Silva, M. J.; Campos, F. A. P.; Domont, G. B.; Poppi, R. J. & Ottoboni, L. M. M. (2011). Heat and phosphate starvation effects on proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6):1469-1479.

Ribeiro, D. A.; Ferraz, L. F. C.; Vicentini, R. & Ottoboni, L. M. M. (2012). Gene expression modulation by heat stress in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101:583-593.

Romero, J.; Yañez, C.; Vásquez, M.; Moore, E. R. B. & Espejo, R. T. (2003). Characterization and identification of an iron-oxidizing, *Leptospirillum*-like bacterium,

present in the high sulfate leaching solution of a commercial bioleaching plant. *Research in Microbiology*, 154(5):353-359.

Shiers, D. W.; Blight, K. R. & Ralph, D. E. (2005). Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron oxidising bacteria. *Hydrometallurgy*, 80(1-2):75-82.

Smolka, M. B.; Martins-de-Souza, D.; Winck, F. V.; Santoro, C. E.; Castellari, R. R.; Ferrari, F.; Brum, I. J.; Galembeck, E.; Della Coletta Filho, H.; Machado, M. A.; Marangoni, S. & Novello, J. C. (2003). Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics*, 3(2):224-237.

Steiner, P. & Sauer, U. (2001). Proteins induced during adaptation of *Acetobacter aceti* to high acetate concentrations. *Applied Environmental Microbiology*, 67(12):5474-5481.

Sutcliffe, I. C. & Harrington, D. J. (2004). Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5):645-659.

Teplyakov, A.; Obmolova, G.; Chu, S. Y.; Toedt, J. Eisenstein, E.; Howard, A. J. & Gilliland, G. L. (2003). Crystal structure of the YchF protein reveals binding sites for GTP and nucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 185(14):4031-4037.

Tuovinen, O. H. & Kelly, D. P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 12(4):311-346.

Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R. 2nd.; Eisen, J. A. & Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9:257. doi: 10.1186/1471-2164-9-597.

Vera, M.; Krok, B.; Bellenberg, S.; Sand, W. & Poetsch, A. (2013). Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics*, 13(7):1133-1144.

- Voulhoux, R. & Tommassen, J. (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Research in Microbiology*, 155(3):129-135.
- Weber, A.; Kögl, S. A. & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(20):7165-7175.
- Werner, F. & Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9:85-98.
- Wösten, M. M. S. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3):127-150.
- Wu, X.; Hu, Q.; Hou, D.; Miao, B. & Liu, X. (2010). Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains possessing dissimilar copper resistance. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(6):491-498.
- Xiao, S.; Chao, J.; Wang, W.; Fang, F.; Qui, G. & Liu, X. (2009). Real-time PCR analysis of the heat-shock response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Folia Biologica*, 55(1):1-6.
- Zammit, C. M.; Mangold, S.; rao Jonna, V.; Mutch, L. A.; Watling, H. R.; Dopson, M. & Watkin, E. L. J. (2012). Bioleaching in brackish waters – effect of chloride ions on the acidophile population and proteome of model species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1):319-329.
- Zhang, L.; Liu, W.; Xiao, J.; Hu, T.; Chen, J.; Cken, K.; Jiang, H. & Shen, X. (2007). Malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure and its interaction with acyl carrier protein. *Protein Science*, 16(6):1184-1192.

2.6. ANEXO I

Figuras Suplementares

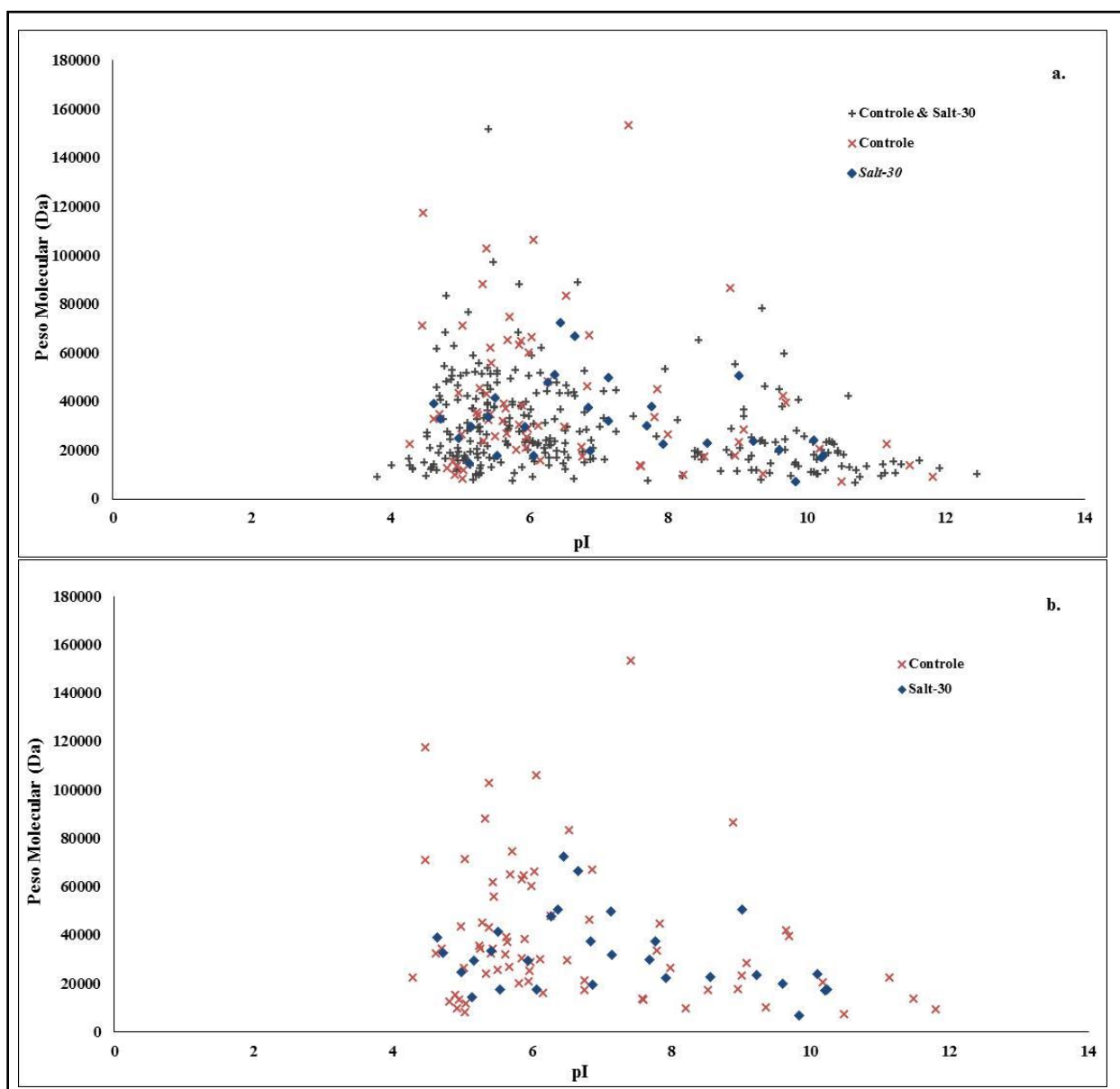


Figura Suplementar S1: Distribuição do ponto isoelétrico (pI) das proteínas de *A. ferrooxidans* encontradas neste estudo. (a) distribuição do pI das proteínas de *A. ferrooxidans* encontradas em ambas as condições (+), proteínas encontradas somente na condição controle (x) e somente na condição salt-30 (♦). (b) proteínas encontradas somente na condição controle (x) e somente nas células salt-30 (♦).

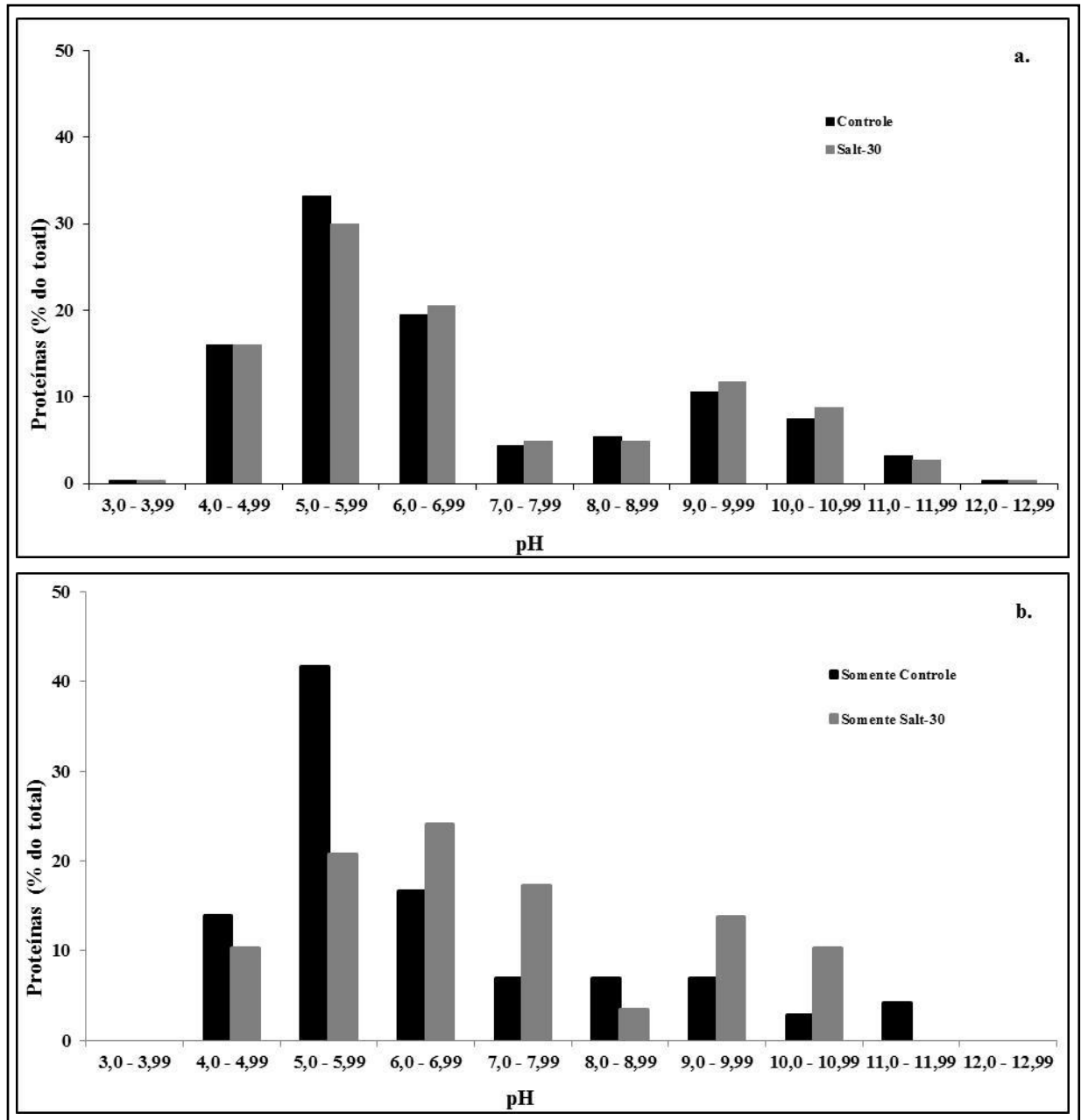


Figura Suplementar S2: Comparação dos valores dos pontos isoelétricos das proteínas encontradas na condição controle (barras pretas) e na condição *salt-30* (barras cinzas). **(a)** valores de ponto isoelétrico de todas as proteínas encontradas na condição controle ou *salt-30*. **(b)** valores de ponto isoelétrico das proteínas encontradas somente na condição controle (barras pretas) ou *salt-30* (barras cinzas).

CAPÍTULO 3

**Análise comparativa do transcriptoma de células controle e *salt-shock* de
*Acidithiobacillus ferrooxidans***

3.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a aplicação de tecnologias de sequenciamento da chamada “segunda geração”, ou “sequenciamento em larga-escala”, tem aumentado a quantidade de dados disponíveis sobre o genoma e o transcriptoma de micro-organismos (van Vilet, 2010; Martin & Wang, 2011; Liu *et al.*, 2014; de Sá *et al.*, 2015). A técnica denominada RNA-Seq permite a leitura de todas as sequências de RNA do micro-organismo, sem a necessidade de se conhecer anteriormente sua sequência genômica, como no caso da técnica de PCR em Tempo Real e da técnica do *microarray*. A técnica do RNA-Seq permite ainda a identificação de transcritos novos e raros e até mesmo a correção da anotação do genoma do organismo (Mutz *et al.*, 2013; de Sá *et al.*, 2015). Ainda entre as vantagens desta técnica, destacam-se o alto número de sequências obtidas, resolução de bases a um único nucleotídeo e análise de praticamente todos os genes do genoma (McClure *et al.*, 2013). Deste modo, a aplicação da técnica do RNA-Seq em micro-organismos pode fornecer dados que visem a compreensão dos mecanismos moleculares de resposta a variações ambientais, condições de estresse, interação com outros micro-organismos, entre muitos outros.

Nesse sentido, foram publicados vários trabalhos descrevendo os mecanismos de resposta das bactérias aos mais variados tipos de estresse ambiental, incluindo o estresse causado pelo NaCl (Baldrige & Contreras, 2014; Tribelli *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; de Sá *et al.*, 2016). Oliver *et al.* (2009) avaliaram o estresse causado pela falta de nutrientes na fase estacionária em culturas de *Listeria monocytogenes*, identificando vários genes regulados pelo fator de transcrição sigma δ^B . Jin *et al.* (2012) observaram que a aclimação de *Bifidobacterium longum* subespécie *longum* BBMN68 a ambientes ácidos se deu pela variação na expressão de 538 genes. Diversas vias metabólicas foram alteradas e os níveis de expressão de genes que codificam chaperonas e de genes envolvidos em comunicação celular registraram um aumento.

Em *Mezorhizobium alhagi*, a resposta ao estresse causado pelo contato com o NaCl (0.4 M) envolveu o aumento dos níveis de expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pela internalização de osmoprotetores e de proteínas transportadoras de íons. O aumento dos níveis de expressão de genes envolvidos no metabolismo de energia e a diminuição dos níveis de expressão de genes relacionados ao sistema de secreção de proteínas, além de outros importantes processos celulares também foram considerados mecanismos de resposta ao estresse salino (Liu *et al.*, 2014).

A bactéria oxidante de metano “*Ca. Methylacidiphilum fumariolicum*” apresentou variação nos níveis de expressão de genes que codificam metano-oxigenases, hidrogenases, nitrito redutases, entre outras enzimas, e o sequenciamento do RNA ajudou a compreender o metabolismo da bactéria quando submetida a baixas concentrações de oxigênio ou nitrogênio (Khadem *et al.*, 2012). A análise de RNA-Seq mostrou que a resposta ao estresse causado pelo cobre em *Streptomyces lividans* envolve muito mais genes que estudos anteriores haviam mostrado. Em *Salmonella enterica*, foi mostrado que grande parte do genoma é “desligado”, e que genes que codificam proteínas envolvidas na proteção do DNA, proteínas *heat-shock* e outras proteínas com funções regulatórias da transcrição estavam ativados nas células submetidas ao estresse causado pela dessecação e privação de nutrientes (Deng & Zhang, 2012). Esses estudos destacam o potencial da técnica do RNA-Seq para compreender a fisiologia de bactérias submetidas a diferentes tipos de estresse, elucidando inúmeras vias regulatórias e metabólicas que ainda não são conhecidas.

Em *A. ferrooxidans*, é de extrema importância o conhecimento dos mecanismos de resposta ao estresse salino para compreendermos os efeitos negativos dos íons cloreto na expressão dos genes na célula. O contato com o NaCl certamente resulta na mudança dos níveis de expressão de inúmeros genes, impactando vias metabólicas, biossíntese de compostos e até mesmo a sobrevivência do micro-organismo. Assim, a análise por RNA-Seq da expressão dos genes em *A. ferrooxidans* poderá elucidar o que ocorre na célula submetida ao estresse salino. Este capítulo apresenta os mecanismos de resposta das células de *A. ferrooxidans* expostas ao estresse salino por curtos períodos.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Linhagens de bactérias e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizada a linhagem LR de *A. ferrooxidans* (Garcia Jr, 1991). A bactéria, isolada de efluente ácido de coluna de lixiviação em mina de Urânio em Lagoa Real, Bahia, Brasil (Garcia Jr, 1991), foi cultivada a 30°C, 250 rpm, em meio T&K líquido (Tuovinen & Kelly, 1972), com pequenas modificações. O meio é composto por (em g/L): (0,4) $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, (0,4) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (0,4) $(NH_4)_2SO_4$ e (33,4) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 1,8 ajustado com H_2SO_4 . O meio foi autoclavado sem o $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, que foi esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . O crescimento de *A. ferrooxidans* foi monitorado por titulação do ferro com dicromato de potássio – $K_2Cr_2O_7$ (Garcia Jr *et al.*, 1995). Para os experimentos de RNA-Seq, as células foram cultivadas em duplicatas independentes na presença (*salt-shock*) e ausência (controle) de 100 mM de NaCl.

3.2.2. RNA-Seq de *A. ferrooxidans*

3.2.2.1. Isolamento de RNA

Foi isolado o RNA das células controle e *salt-shock* de *A. ferrooxidans* LR segundo método descrito por Winderickx & Castro (1994). O esquema de crescimento e obtenção das células encontra-se ilustrado na Figura 3.1. As células foram lavadas com água-DEPC e suspensas em 1 mL de tampão de extração: EDTA 1 mM, LiCl 0,1M, Tris 0,1 M, pH 7,5. A seguir, foi adicionado 1 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1, v/v/v) contendo 100 μl de SDS 10% e as amostras foram agitadas em um vórtex por 2 minutos. Após centrifugação por 3 minutos (8000 rpm, 4°C) a fase aquosa foi transferida para um novo tubo eppendorf e esta foi novamente tratada com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1, v/v/v). Este processo foi repetido até que a interface não fosse mais visível.

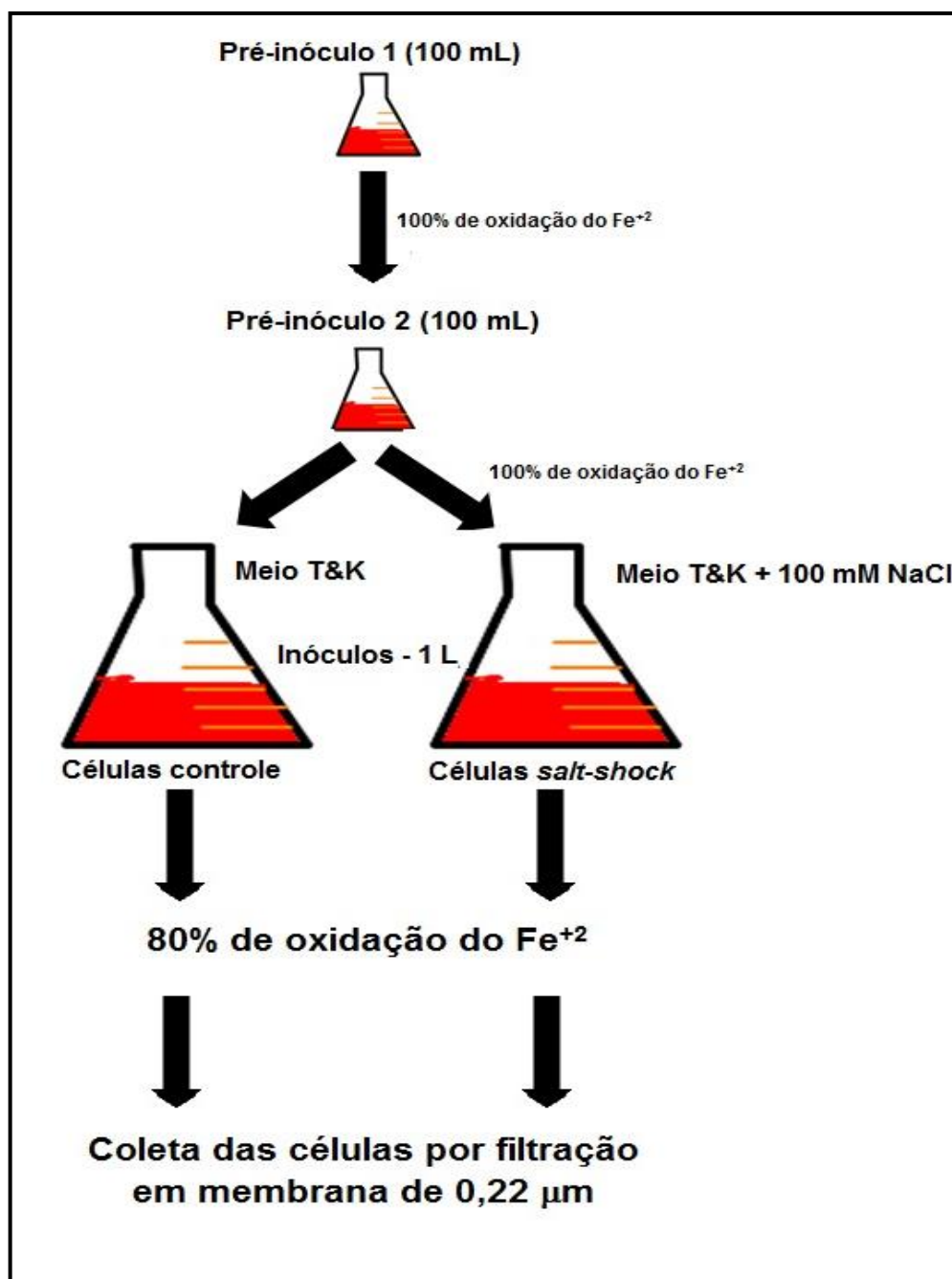


Figura 3.1. Esquema de crescimento e coleta das células de *A. ferrooxidans* controle e *salt-shock* para a extração de RNA. O cultivo foi feito em duplicata.

O RNA foi então precipitado com 1/20 do volume de acetato de potássio 40% e 2 volumes de etanol absoluto. O RNA foi mantido a -20°C durante a noite. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos (8000 rpm, 4°C). O precipitado foi lavado com etanol 70% e mantido a temperatura ambiente para secar. Ele foi solubilizado em aproximadamente 100 µl de água-DEPC e estocado a -80°C. A qualidade do RNA foi aferida

por eletroforese em gel de 1% de agarose e 6% de formaldeído em tampão MOPS 1X (Tampão MOPS 10x: 41,8 g de MOPS, 16,6 mL de acetato de sódio 3 M, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0, água q.s.p. 1000 mL, pH 7,0). Possíveis contaminações com DNA genômico foram evitadas por meio do tratamento da amostra de RNA com DNase (concentração final - 0,15 U/ μ L). O RNA foi estocado a -80°C até ser enviado para análise. O RNA foi quantificado com o *Qubit[®] RNA Assay Kit* (Invotrogen), que fornece dados precisos da quantidade de RNA isolado (Khudyakov *et al.*, 2012).

3.2.2.2. Construção das bibliotecas de RNA

Após a comprovação da boa qualidade do RNA (visualizado em gel desnaturante de agarose), cerca de 5 μ g de cada duplicata foram enviados para *The Interdisciplinary Center for Biotechnology Research* (ICBR, Universidade da Flórida, Estados Unidos). Nesse local, a concentração do RNA foi novamente determinada por meio do espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop[®] Technologies, Inc) e a qualidade do material foi avaliada no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc). Novamente comprovada a boa qualidade do RNA, 2 μ g da amostra foram utilizados para o “enriquecimento” do RNA mensageiro (mRNA) com o MICROBExpress[™] Bacterial mRNA Enrichment Kit (Ambion[®]). O mRNA foi posteriormente fragmentado utilizando-se cátions divalentes a 94°C, seguido pela síntese da primeira fita de cDNA utilizando-se transcriptase reversa e *primers* aleatórios. A síntese da segunda fita de cDNA, seguida pela degradação da fita de RNA foi feita com a DNA polimerase I e a RNase H, respectivamente. À fita de cDNA foi inserida uma cauda de poli-A e, a seguir, foram inseridos adaptadores específicos Illumina para cada replicata (4 adaptadores para as duas replicatas de controle e *salt-shock*). Finalmente, as bibliotecas foram enriquecidas por 12 ciclos de amplificação. As bibliotecas *TruSeq* foram em seguida purificadas e enviadas para a geração de *clusters* e posterior sequenciamento na plataforma Illumina GAIIx.

3.2.2.3. Sequenciamento pelo Illumina GAIIx

As bibliotecas *TruSeq* amplificadas foram novamente quantificadas utilizando-se o kit *Agilent DNA high-sensitivity* em um Bioanalyzer e por PCR em Tempo Real. Baseado nos valores calculados, as bibliotecas foram reunidas de forma equimolar, diluídas a uma concentração de 10 nM e aplicadas em uma *lane* da *flowcell* de sequenciamento *paired-end* para a geração dos *clusters* no aparelho *cBot* (Illumina). Na reação, a concentração das bibliotecas foi de 9 pM. As bibliotecas foram sequenciadas em sequências curtas (*reads*) de 2x100 bases no Illumina GAIIx. A análise das imagens com as bases sendo incorporadas e a nomeação das bases foi feita usando os programas fornecidos pela Illumina, após a filtragem da pureza para confirmação das bases. O sequenciamento foi realizado no Núcleo *NextGen Sequencing* da Divisão de Genômica da ICBR (*The Interdisciplinary Center for Biotechnology Research*), na Universidade da Flórida.

3.2.2.4. Análise dos resultados

Os dados foram fornecidos na extensão “fastq” e analisados por meio do programa CLCbio (<http://www.clcbio.com/index.php?id=1240>) (CLC bio, Cambridge, MA). Neste programa, as *reads* geradas foram selecionadas de modo que a sua qualidade média apresentasse um valor de, ao menos, 20. Ao serem alinhadas ao genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (disponível no site do NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=acidithiobacillus+ferrooxidans>), uma variação máxima de 5% foi aceita para serem selecionadas; caso contrário, seriam descartadas. Neste caso, pode haver anotação de *reads* aos pares ou únicos. As *reads* correspondentes a cada gene foram identificadas e, em seguida, fez-se o cálculo da abundância da expressão de cada gene identificado. A unidade utilizada para representar a expressão de um dado gene é o RPKM (*reads* por quilobase por milhão de bases no genoma). Quanto maior o RPKM, maior o número de *reads* mapeadas a esse gene, ou seja, mais expresso o gene foi. Após isso, o teste estatístico de Baggerly (2004) foi aplicado para comparar os RPKMs das condições controle e *salt-shock* para que pudessem ser calculadas as variações relativas nos níveis de expressão dos genes entre as condições (*fold changes*). O genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 foi usado para obter as anotações dos genes (identificação, tamanho e símbolo do gene; ponto isoelétrico hipotético e peso molecular das proteínas correspondentes). As proteínas

codificadas pelos genes identificados também foram ordenadas nas categorias celulares funcionais (*Clusteres* de Genes Ortólogos, *COGs*) de acordo com o genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

3.2.3. Validação dos resultados encontrados pelo RNA-Seq por PCR em Tempo Real

O RNA foi isolado de células de *A. ferrooxidans*, cultivadas ou não na presença de NaCl, a partir de quatro culturas independentes. A quantificação e a análise da qualidade do RNA foram realizadas como descrito no item 3.2.2.1.

Os *primers* utilizados para os experimentos de PCR em Tempo Real foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), utilizando como molde o genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Para a amplificação do gene constitutivo *alaS* (controle endógeno), que codifica a proteína alanil-tRNA sintetase, foram utilizados os *primers* alaS13 (direto - GTGCCTTTCCCGAACTCACG) e alaS3 (reverso - TCCTCCAGCAGACTGAGTCC) (Yarzabal *et al.*, 2004). Os *primers* utilizados nas análises da expressão dos genes selecionados são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. *Primers* desenhados para a realização dos experimentos de PCR em Tempo Real.

* Os símbolos “↑” (aumento da expressão) e “↓” (diminuição da expressão) representam os resultados da expressão detectados pelo RNA-Seq.

<i>Locus (NCBI)</i>	<i>Nome da proteína (↑↓)*</i>	<i>Primer direto (5' – 3')</i>	<i>Primer reverso (5' – 3')</i>	<i>Fragmento (pb)</i>
<i>Voltage-gated</i>				
AFE_2225	<i>chloride channel (↑)</i>	CGCTCGCGTCTTCTATCAGT	CATTCTTGCAACCGCAACCA	118
<i>Transposon</i>				
AFE_0596	<i>transposase A (↑)</i>	GCGTGCGTCCAGTAGACTTC	CGCGAAGGCCAACAATTCA	123
<i>Heavy-metal</i>				
AFE_0654	<i>binding protein (↑)</i>	AGGCGTATCTGGCGTTGAAA	TAGCCTTCTTCCTTGACCGC	111
<i>Dethibiotin</i>				
AFE_1410	<i>synthetase (bioD-1) (↓)</i>	GGAGGTATTACAGCACCGGG	CGGTATTGCTCTACCGGAC	133
<i>Outer</i>				
AFE_3068	<i>membrane efflux protein (↓)</i>	CCCCAAAGTGTTTTGCTGG	CTTTCGGTGTCCAGAGGGTC	108
<i>Transcriptional</i>				
AFE_3059	<i>regulator OmpR (↓)</i>	TGGAAGGGCAGGGTTTCATC	CAGACGCTGACAGATGCTGA	140
<i>Hydrogenase-</i>				
AFE_0944	<i>4, G subunit (hyfG) (↓)</i>	GATGCCCATGAGATTCCGGT	CGTTCCTCCAGGTGCAGAAT	104

A quantificação dos níveis de expressão dos genes selecionados foi realizada por PCR em tempo real no equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). A reação (com um volume total de 12,5 µl) foi preparada da seguinte maneira: 6,5 µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Invitrogen), 1 µL (2,5 µM) de cada *primer*, 3 µl de água Milli-Q e 1µl de cDNA (100 ng). Para as amplificações foram utilizadas as condições descritas a seguir: 2 minutos a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação por 15 s a 95°C, hibridização por 20 s a 60°C e extensão por 30 s a 72°C, seguida da uma análise de curva de dissociação (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s, iniciando-se em 95°C). Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do Ct (*threshold cycle*) foi utilizada para avaliação dos níveis de expressão gênica, calculando-se o $\Delta Ct = Ct \text{ do gene endógeno} - Ct \text{ do gene alvo}$. O programa *Real-Time System RQ Study Software* versão 1.3.1 (Applied Biosystems), que acompanha o sistema, foi utilizado para coleta dos dados. Os genes analisados tiveram seus níveis de expressão normalizados com o gene constitutivo *alaS* e os níveis de expressão relativa dos genes foi determinado pelo método do $2^{\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ condição tratada} - \Delta Ct \text{ condição controle}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Todos os dados foram expressos como média, acrescidos de seu desvio padrão, e a análise estatística foi feita com o Teste *t*, o qual foi utilizado para verificar se os valores dos níveis de expressão relativa de cada gene estavam significativamente diferentes de 1 (nível de expressão relativa = 1, significa que os níveis de expressão dos genes na condição controle e na presença de 100 mM de NaCl são iguais). Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ e expressão relativa $\geq 1,5$.

Para o teste de eficiência dos *primers*, o DNA genômico de *A. ferrooxidans* foi amplificado em oito concentrações (DNA bruto e diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}). Após a amplificação, foram obtidas as curvas padrão e os valores do *slope*, o qual indica a eficiência da amplificação utilizando o par de *primers* e do R^2 , coeficiente de correlação que mede a acurácia da reta ($1 - 0,99$).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Sequenciamento e comparação dos transcriptomas de *A. ferrooxidans* (RNA-Seq)

A análise dos dados do RNA-Seq mostrou que cerca de 85% das *reads* geradas alinharam-se contra o genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. A Tabela 3.2 mostra os dados brutos obtidos pelo sequenciamento do RNA.

Tabela 3.2. Alinhamento das *reads* utilizando o genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

	CONTROLE 1	CONTROLE 2	SALT-SHOCK 1	SALT-SHOCK 2
Nº de <i>reads</i>	17615997	16363599	24126804	17731925
<i>Reads</i> únicos	409679	281339	443730	469239
<i>Reads</i> pareados	17206318	16082260	23683074	17262686

A análise comparativa dos transcriptomas mostrou que 322 genes apresentaram os padrões de expressão significativamente alterados em células *salt-shock* em relação à condição controle ($p < 0,05$). Deste montante, 184 genes apresentaram níveis de expressão aumentados e 138 genes apresentaram níveis de expressão diminuídos na presença de 100 mM de NaCl.

A análise dos *Clusters* de Genes Ortólogos (COGs), disponíveis na base de dados do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, foi realizada para classificar as proteínas codificadas pelos genes identificados e os resultados foram utilizados para inferir as funções das proteínas na fisiologia celular, nas condições analisadas (Mykytczuk *et al.*, 2011). Esta classificação destacou diferenças em várias categorias, como processos celulares, elementos móveis, funções regulatórias e metabolismo intermediário central. Já as categorias relacionadas à *protein fate* e síntese de proteínas mostraram uma representatividade maior de genes com níveis de expressão significativamente diminuídos (Figura 3.2). Destaca-se também o alto número de genes relacionados a funções hipotéticas e desconhecidas.

A análise dos genes diferencialmente expressos nas células *salt-shock* permitiu identificar várias vias que podem ter sido alteradas pela presença do NaCl.

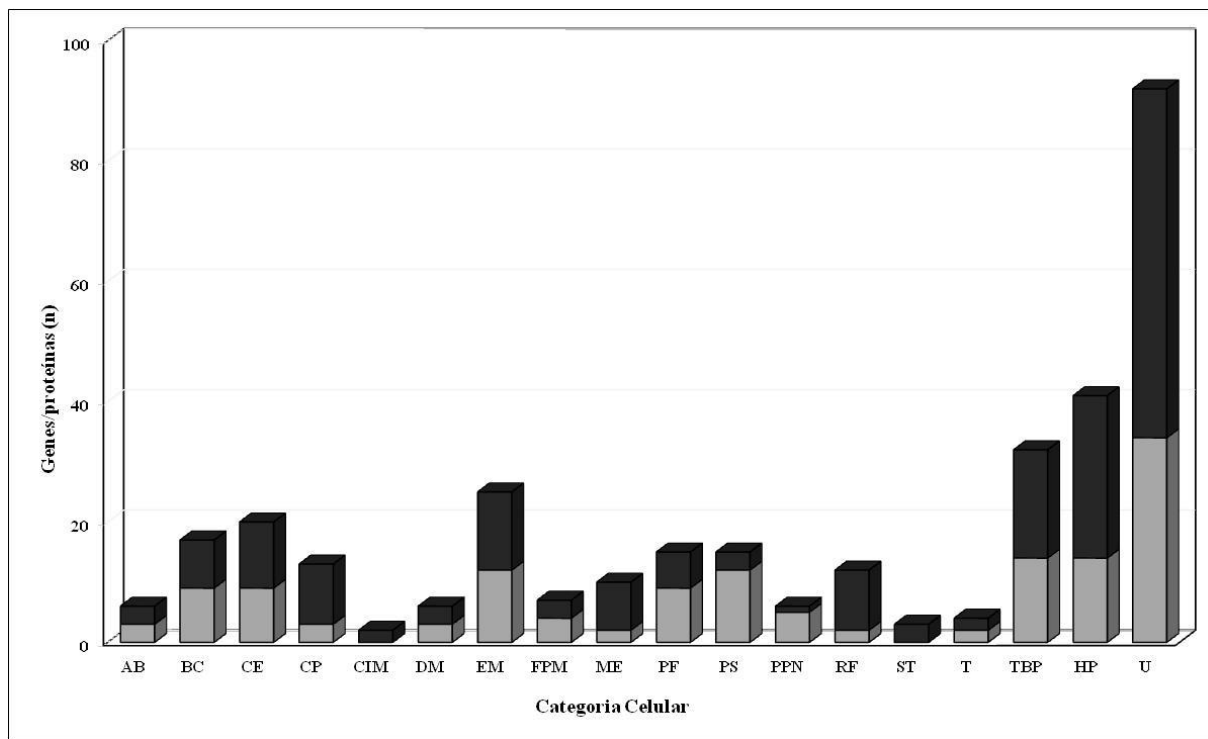


Figura 3.2. Categorias celulares das proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos nas células *salt-shock* de *A. ferrooxidans*. Genes/proteínas com os níveis de expressão aumentados (barras pretas), e genes/proteínas com os níveis de expressão diminuídos (barras cinzas). Os dados são mostrados como o número absoluto de genes/proteínas diferencialmente expressos em função de cada categoria celular mencionada. AB – biossíntese de aminoácidos; BC – biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores, CE – envelope celular; CIM – metabolismo intermediário central; CP – processos celulares; DM – metabolismo de DNA; EM – metabolismo de energia; FPM – metabolismo de ácidos graxos e fosfolipídeos; ME – funções de elementos móveis e extra-cromossomais; PF – “destino” de proteína (*protein fate*); PS – síntese de proteínas; PPN – purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos; RF – funções regulatórias; ST – transdução de sinal; TBP – proteínas de transporte e ligação; T – transcrição; HP – proteínas hipotéticas; U – função desconhecida.

3.3.1.1. Alterações na membrana celular de *A. ferrooxidans* causadas pelo NaCl

O envelope celular de *A. ferrooxidans* funciona, assim como em qualquer outro organismo, como uma barreira contra alterações ambientais e é uma das estruturas mais afetadas da célula quando esta é exposta ao estresse salino, funcionando como um dos primeiros mecanismos na resposta celular. No envelope celular estão localizados vários transportadores, lipoproteínas, glicoproteínas, peptidoglicanos, entre outros componentes, que têm como função proteger a célula de íons, expulsando-os do meio intracelular e mudando de conformação para proteger a célula dos danos por eles causados (Silhavy *et al.*, 2010). A análise por espectroscopia RAMAN mostrou que o contato com o NaCl causou alterações significativas na membrana das células de *A. ferrooxidans*. Neste trabalho verificou-se que vários genes relacionados à membrana celular apresentaram padrões de expressão alterados nas células *salt-shock*.

- Efluxo de íons Cl^- da célula: ação dos transportadores de cloreto e outros transportadores

Dois dos três genes que codificam transportadores de íons cloreto (*voltage-gated chloride channel*, AFE_2225 e AFE_2226) tiveram a expressão aumentada nas células *salt-shock*. Estes transportadores pertencem à família de transportadores ClC (*Voltage-gated ClC family*), que por sua vez pertencem à superfamília conservada de transportadores de cloreto CLC (*Chloride Transporters Proteins*), presentes em organismos que vão desde bactérias até mamíferos (Jentsch *et al.*, 1999). São proteínas ligadas à membrana celular e transportam, além de íons cloreto, íons brometo e íons iodeto. Estes transportadores são dímeros, e possuem em *A. ferrooxidans*, 10 domínios transmembrana. Cada monômero possui um poro de transporte de Cl^- (Jentsch *et al.*, 2002) e, segundo estudos, cada poro funciona como um canal de troca iônica: uma de suas funções é realizar o efluxo do íon cloreto concomitantemente à entrada do íon H^+ , sendo isso possível devido ao gradiente de concentração gerado (Lisal & Maduke, 2008). Deste modo, os íons cloreto presentes no meio ativam estes transportadores para contrabalancear as concentrações de Cl^- intra e extracelulares. A literatura carece de estudos relacionando a expressão dos transportadores da família ClC e o estresse salino em bactérias; porém, diversos estudos correlacionaram o aumento da expressão de transportadores da superfamília CLC e o estresse salino em arroz (Walia *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Jossier *et al.*, 2010), entre outros.

Outros genes que codificam transportadores de íons também apresentaram níveis de expressão aumentados em células expostas ao NaCl. Alguns genes que codificam proteínas transportadoras de metais pesados, como AFE_1224 (*heavy metal-binding protein, putative*), AFE_0929 (*outer membrane toxin secretion efflux protein, putative*) e também transportadores de prótons, como AFE_2272 (*MotA-TolQ-ExbB proton channel family protein*) são exemplos de genes que apresentaram aumento nos níveis de expressão. O gene AFE_0929 possui uma alta similaridade com o gene da proteína TolC de diversas bactérias (cerca de 75 – 90%). Esta proteína possui relação com o efluxo de diversos componentes tóxicos nas células de *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas (Koronakis *et al.*, 2004). Uma das possíveis funções desta proteína pode ser também o efluxo dos íons cloreto tóxicos, auxiliando na restauração rápida da homeostase celular. O gene que codifica a proteína transportadora de íons cloreto para o exterior da célula apresentou os níveis de expressão aumentados. Essa proteína pertence a superfamília de proteínas facilitadoras do transporte (AFE_2227, *major facilitator family transporter*). Proteínas desta superfamília encontram-se presentes em praticamente todos os organismos e, entre os produtos transportados, incluem-se ânions inorgânicos, como o Cl^- (Pao *et al.*, 1998; Fluman & Bibi, 2009).

O aumento da expressão de genes que codificam transportadores de íons cloreto em *A. ferrooxidans* pode ter afetado outros mecanismos celulares, como por exemplo, a geração de energia. Como os canais de cloreto estão envolvidos na troca de prótons (saída de Cl^- e entrada de H^+), a geração de energia pode ser prejudicada, uma vez que ela é dependente do gradiente de potencial, ou seja, uma maior concentração de prótons no meio extracelular para a geração de ATP pelas ATP sintases. Outros mecanismos devem ser ativados para a manutenção da homeostase de uma maneira geral na célula. Nesse sentido, foi registrada também uma regulação positiva da expressão do gene que codifica a proteína de efluxo de prótons (AFE_2222, *plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase*). Essa proteína transporta para o meio externo da célula os íons H^+ contra o gradiente de concentração, sendo dependente de ATP (Kühlbrandt, 2004). Sua função em *A. ferrooxidans* pode estar relacionada à tentativa da célula de restabelecer o gradiente de potencial, a fim de compensar a atividade dos transportadores de cloreto.

O sistema de transporte da superfamília ABC (*ATP-Binding Cassete proteins*) apresentou um padrão diferenciado na resposta ao estresse osmótico em *A. ferrooxidans*. Os genes AFE_0120 e AFE_0121 apresentaram uma regulação positiva nos níveis de expressão em células *salt-shock*. Estes transportadores encontram-se localizados no periplasma da bactéria, normalmente transportando peptídeos sinalizadores que permitem à bactéria

responder a estímulos ambientais (Detmers *et al.*, 2001). Além disso, uma das funções preditas deste transportador consiste em reciclar peptídeos da membrana celular de bactérias, como *E. coli* (Detmers *et al.*, 2001). Em *A. ferrooxidans* este transportador pode estar desempenhando a função de reciclar eventuais proteínas de membrana degradadas pelas flutuações na osmolaridade do meio.

Foi registrado ainda o aumento dos níveis de expressão do gene AFE_0306 (*multidrug resistance protein, SMR family*), o qual codifica uma proteína relacionada com o transporte de compostos hidrofóbicos e confere às bactérias resistência a diversos antibióticos (Bay *et al.*, 2008). A indução deste gene em células de *A. ferrooxidans* é, de certa forma, inesperada, e uma vez que não há estudos sobre a importância deste transportador em *A. ferrooxidans*, seria interessante que sua relação com o estresse salino e outros tipos de estresse fosse investigada.

Alguns genes que codificam proteínas transportadoras do tipo ABC tiveram os padrões de expressão regulados negativamente nas células *salt-shock* (AFE_2392, AFE_2438, AFE_2486, AFE_2863, AFE_3097). Uma análise das sequências destas proteínas mostrou que cada uma possui um domínio protéico diferente, que incluem transporte de lipídeos, drogas e outros componentes peptídicos (AFE_3097, AFE_2863, AFE_2486), resistência a solventes orgânicos (AFE_2392) e ligação a metais pesados (AFE_2438). Estas proteínas transportam inúmeras substâncias para dentro ou para fora das células. Fica claro o acentuado efeito do NaCl em *A. ferrooxidans*, onde várias vias de comunicação celular foram afetadas nas células estressadas.

Genes que codificam proteínas transportadoras de outros íons também apresentaram níveis de expressão diminuídos em células *salt-shock*, tais como os genes que codificam proteínas de transporte de efluxo da família RND (*efflux transporter, RND family, MFP subunit*, AFE_0736 e AFE_3069) além do gene que codifica a proteína transportadora da família AcrB-AcrD-AcrF (AFE_3071). Estas proteínas estão relacionadas ao transporte e resistência à drogas, pertencendo à superfamília RND (resistência-nodulação-divisão) (Nakaido, 1996; Putman *et al.*, 2000). Estas proteínas estão também relacionadas à resistência a metais pesados. Um grande número de genes que codificam estas proteínas são encontrados no genoma da bactéria, o que pode ser explicado, em parte, pelo ambiente com altas concentrações de metais em que *A. ferrooxidans* normalmente é encontrada. A diminuição da expressão destes genes pode estar relacionada a um possível objetivo de poupar energia.

- Genes relacionados à composição da membrana: biossíntese de lipopolissacarídeos

Alguns genes relacionados à manutenção da estrutura da membrana celular também apresentaram padrões de expressão alterados em células submetidas ao estresse salino. O gene que codifica a proteína TolB (*tol-pal system beta propeller repeat protein TolB*, AFE_2957) foi negativamente regulado na presença de NaCl. A proteína TolB interage com a proteína Pal formando o sistema Tol-Pal, o qual associa-se à membrana bacteriana externa e parece desempenhar um papel essencial na integridade da membrana celular (Abergel *et al.*, 1999). Este sistema possui a função de transportar componentes lipopolissacarídicos para membrana (Godlewska *et al.*, 2009). A diminuição nos níveis de expressão deste gene parece indicar que os íons cloreto afetaram a estrutura da membrana celular de *A. ferrooxidans*, e corrobora com os dados encontrados com o estudo do proteoma, onde em células expostas ao NaCl por longos períodos, esta proteína também apresentou níveis de expressão diminuídos. Tais fatos demonstram que a presença do NaCl pode estar comprometendo a expressão desta proteína por várias gerações. Alguns genes que codificam proteínas de membrana também apresentaram padrões de expressão diminuídos (*membrane protein, putative* – AFE_0978, AFE_1145, AFE_2971). A diminuição dos níveis de expressão da proteína LolB (*outer membrane lipoprotein LolB, putative*, AFE_0343) foi outro exemplo dos efeitos do NaCl na membrana celular. Esta proteína, localizada na membrana externa, desempenha função de transferência de lipoproteínas do citoplasma para a membrana externa da célula (Tokuda & Matsuyama, 2004). A presença do NaCl pode ter prejudicado a expressão do gene que codifica esta proteína e, como consequência, a distribuição das lipoproteínas na membrana celular de *A. ferrooxidans* pode ter sido prejudicada.

Outros genes também foram modulados negativamente em células cultivadas na presença de NaCl. Um destes genes (*glycosyl transferase, group 2 family protein*, AFE_0974) codifica a proteína glicosil-transferase do grupo 2, a qual possui alta similaridade com a proteína HpnI, produtora de hopanóides em bactérias – terpenóides localizados na membrana de bactérias e, segundo os poucos estudos disponíveis, aumentam a estabilidade da membrana celular, modulando a sua permeabilidade (Welandar *et al.*, 2009). A diminuição da expressão deste gene pode ser uma resposta do contato das células de *A. ferrooxidans* com o NaCl, com a diminuição da produção de lipídeos e derivados na membrana celular. Outro gene relacionado à biossíntese de componentes lipopolissacarídicos (LPS) de membrana que também apresentou diminuição nos níveis de expressão foi o gene que codifica a CMP-3-deoxi-D-manooculosonato (*kdsB*, *3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase*,

AFE_2546). Esta proteína é considerada um alvo potencial de drogas antibacterianas (Yi *et al.*, 2011). A diminuição da produção de LPS mostra uma alteração na membrana celular causada pelo NaCl. O mesmo acontece para o gene *lpxK*, o qual codifica a proteína tetracildissacarídeo 4-quinase, que catalisa a produção do lipídeo IVa, importante componente estrutural em células bacterianas (Raetz *et al.*, 2009).

Se alguns genes apresentaram modulação negativa nos níveis de expressão nas células de *A. ferrooxidans*, outros apresentaram padrões de expressão aumentados, como por exemplo o gene AFE_1235 (*glycosyl transferase, group 2 family protein*). Este gene está relacionado à biossíntese do *core* dos lipopolissacarídeos, onde *core* refere-se à região estrutural onde os lipídeos conectam-se aos polissacarídeos, mantendo assim a conformação estrutural do complexo (Kabanov *et al.*, 2010). O mesmo vale para o gene AFE_2794 (*lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyl transferase*), o qual possui alta identidade com o gene da glicosil-transferase da família 2 de outros micro-organismos acidófilos (90-96%, BLAST). O gene (AFE_0186) e o gene putativo (AFE_0751) que codificam a D-alanil-D-alanina carboxi-peptidase, uma enzima que participa da etapa final da síntese de peptideoglicanas da membrana externa de bactérias Gram-negativas e positivas, foram modulados positivamente nas células *salt-shock*. Outro gene que participa da via da biossíntese de peptideoglicanos é o *murC* (AFE_2821, *UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase*). Os peptideoglicanos são importantes componentes estruturais da membrana de bactérias e conferem rigidez às estruturas externas. O aumento da expressão dos genes que codificam precursores destas moléculas sugere um mecanismo de defesa da célula contra a entrada dos íons cloreto.

Outro gene ativado pelo estresse salino foi o gene AFE_0149 (*mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase*). A enzima codificada por este gene possui como funções: **a)** inserir resíduos de manose em glicolipídeos e glicofosfolipídeos de membrana – importantes na estrutura e comunicação celulares – e **b)** participar na biossíntese de polissacarídeos (Pelissier *et al.*, 2010).

Os padrões diferenciados na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipopolissacarídeos de membrana sugerem uma flutuação na fluidez da membrana celular de *A. ferrooxidans* em resposta à exposição ao NaCl.

- Genes relacionados à composição da membrana: lipídeos e fosfolipídeos

Alterações na composição de lipídeos e fosfolipídeos de membrana em resposta ao estresse salino são bem conhecidas, como por exemplo, mudanças na saturação de ácidos graxos, assim como mudanças na composição dos fosfolipídeos de membrana (Tsuzuki *et al.*, 2011). Estas alterações encontram-se descritas em diversos grupos de bactérias (Thiemann & Imhoff, 1991; Joset *et al.*, 1996; Guerzoni *et al.*, 2001; Fraenzel *et al.*, 2010; Tsuzuki *et al.*, 2011; entre outros).

Um dos componentes-chave da biossíntese de ácidos graxos, os quais formam o esqueleto da membrana celular, o gene *fabD* (AFE_1180, *malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase*), apresentou níveis de expressão diminuídos nas células *salt-shock*. A proteína codificada por este gene transfere o radical malonil para a proteína acil transportadora (ACP) (Serre *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2010). Em *A. ferrooxidans* este gene também apresentou uma diminuição em seus níveis de expressão quando a célula foi submetida à privação de fosfato (Ribeiro *et al.*, 2011), o que sugere que diferentes tipos de estresse podem modular a expressão deste gene, resultando em alterações na composição de lipídeos de membrana em *A. ferrooxidans*. Curiosamente, em células cultivadas na presença de NaCl por longos períodos (células *salt-30*), a expressão da proteína codificada por este gene apresentou um aumento (como observado nos experimentos do proteoma de *A. ferrooxidans*). A diminuição nos níveis de expressão o gene *fabD* pode indicar uma modulação na expressão causada pelo NaCl, onde o impacto inicial do estresse salino acaba por prejudicar a expressão deste gene, resultando em diminuição da síntese de lipídeos de membrana. O aumento da expressão do gene *fabD* com o tempo parece refletir o processo de aclimatização da célula ao NaCl. As diferenças encontradas nas estruturas de membrana (detectadas pelos experimentos de RAMAN em células *salt-30*) indicam que os efeitos do NaCl em *A. ferrooxidans* são muito mais complexos e envolvem vários mecanismos.

Outros genes do operon *fab* (Figura 3.3), *fabH* (AFE_1181, *3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III*) e *acpP* (AFE_1178, *acyl carrier protein*) também apresentaram os níveis de expressão diminuídos. O gene *gspA* (AFE_0969, *glycerol-3-phosphate dehydrogenase*), outro gene relacionado à biossíntese de fosfolipídeos, também apresentou diminuição dos níveis de expressão. Os efeitos do NaCl na biossíntese de ácidos graxos nas células de *A. ferrooxidans* submetidas ao estresse salino parece, portanto, ser bem acentuado.

Por outro lado, a síntese de fosfatidilgliceróis parece ter aumentado em resposta ao estresse salino em *A. ferrooxidans*, uma vez que dois genes relacionados à produção desta

molécula apresentaram padrões de expressão aumentados (os genes *pgsA* - *CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase*, AFE_2187, e *CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, putative* – AFE_1187). Os fosfatidilgliceróis (PGs) são um dos principais fosfolípidos de membrana de bactérias e possuem uma carga negativa, ao contrário das fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas. Esta característica permite interações eletrostáticas mais fortes entre as moléculas de PGs, e como consequência, uma membrana com maior concentração dessas moléculas torna-se mais compacta. Dessa forma, a membrana torna-se menos permeável à entrada de moléculas ou íons (Zhao *et al.*, 2008). Em *E. coli*, o gene *pgsA* foi induzido pelo estresse osmótico (Romantsov *et al.*, 2009), assim como em *Bacillus subtilis* (López *et al.*, 2006). Uma maior produção de PGs reflete, portanto, um interessante mecanismo de defesa da célula contra o estresse osmótico.

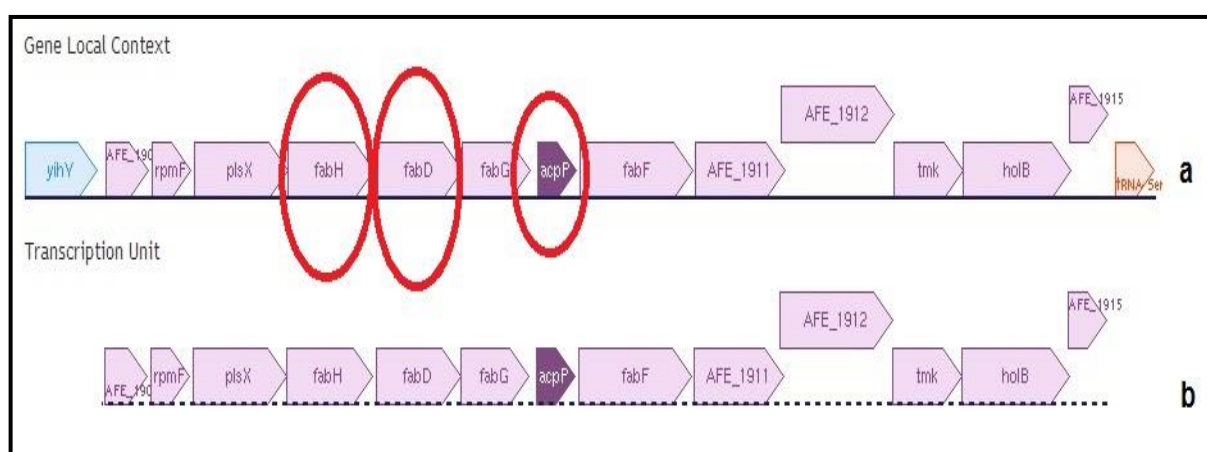


Figura 3.3. Genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos em *A. ferrooxidans* ATCC 23270, com expressão reduzida em células *salt-shock*. **(a)** Representação gráfica do operon *fab*. **(b)** Representação gráfica hipotética do transcrito deste operon. A linha tracejada indica que não há confirmação experimental de que estes genes fazem parte de um operon; isto foi predito por análise computacional. Os dados foram obtidos no *BioCyc Database Collection*, utilizando a base de dados do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponível no NCBI.

Alguns mecanismos de resposta de *A. ferrooxidans* ao NaCl no que se refere a membrana celular podem ser destacados:

- Aumento da atividade de transportadores de Cl^- para o meio extracelular.
- Possível participação de transportadores de metais pesados e outras substâncias no efluxo de Cl^- da célula e diminuição dos transportadores não relacionados.
- Alteração da composição de proteínas de membrana associadas a outras moléculas, como lipopolissacarídeos e glicolipídeos.
- Diminuição da produção de fosfolipídeos e aumento da produção de fosfatidilgliceróis na membrana, com o objetivo de aumentar a rigidez e diminuir a permeabilidade da membrana.

Estes mecanismos de resposta mostram que *A. ferrooxidans* reagiu à presença do NaCl alterando a permeabilidade da membrana plasmática, bem como mudando o perfil de macromoléculas, de modo a manter um melhor equilíbrio na presença de estresse osmótico.

3.3.1.2. *Efeitos do NaCl no metabolismo de energia em A. ferrooxidans*

O estresse salino causou mudanças no comportamento de vários genes relacionados ao metabolismo de energia em células de *A. ferrooxidans*. O complexo de transferência de elétrons envolve a proteína NADH-quinona oxidoredutase, onde os genes *nuoH* (AFE_0481, subunidade H), *nuoK* (AFE_0484, subunidade K) e *nuoL* (AFE_0485, subunidade L), os quais codificam algumas das subunidades desta enzima, apresentaram aumento nos níveis de expressão. Esta proteína está envolvida na transferência dos elétrons do Fe^{+2} para o NAD^+ . É importante ressaltar que esta enzima também está envolvida na translocação de H^+ para o periplasma, regenerando o NADH (Valdés *et al.*, 2008). Um aumento da NADH-quinona oxidoredutase pode significar um aumento na demanda celular de NADH, que pode estar sendo requisitado para os processos celulares em resposta ao estresse causado pelo NaCl. Vale também ressaltar que a análise do proteoma também acusou o aumento dos níveis protéicos de algumas subunidades deste complexo.

Outro gene relacionado ao efluxo de prótons que também teve os níveis de expressão aumentado foi o gene *cyoD* que codifica a subunidade IV do citocromo *o* (AFE_2405, *cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit IV*). Os citocromos são proteínas

‘terminais’ onde os elétrons são transferidos para o oxigênio (O₂) com o concomitante efluxo de prótons para o periplasma (Abramson *et al.*, 2000). Apesar de estar mais relacionado ao metabolismo de enxofre (Valdés *et al.*, 2008), este citocromo pode estar sendo ativado para aumentar a força protomotora (PMF) da célula, a fim de restabelecer o potencial de membrana necessário para a geração de energia.

Foi observada uma diminuição dos níveis de expressão de quase todos os genes que codificam a subunidade F1 da ATP sintase ou ATPase, onde ocorre a conversão do ADP em ATP. Os genes com expressão afetada foram *atpH* (AFE_3126, subunidade delta), *atpA* (AFE_3127, subunidade alfa), *atpG* (AFE_3128, subunidade gama) e *atpD* (AFE_3129, subunidade beta). O aumento da NADH-quinona oxidoredutase pode ser uma tentativa de reverter a baixa produção de ATP, translocando prótons para o periplasma. A presença do NaCl pode estar ocasionando estresse oxidativo nas células já que foi detectado o aumento da expressão da enzima antioxidante AFE_1616 (*antioxidant, AhpC-Tsa family*). Nas análises do proteoma, não foi registrado aumento da atividade de enzimas antioxidantes, e essa análise foi realizada em células expostas ao NaCl por longos períodos. Isso mostra que o processo de aclimação de *A. ferrooxidans* ao NaCl inclui uma possível diminuição do estresse oxidativo que parece ocorrer quando as células são submetidas ao NaCl por curtos períodos.

A hidrogenase do tipo 4 também parece ter diminuído em *A. ferrooxidans*, uma vez que cinco dos seis genes que codificam a enzima apresentaram padrões de expressão diminuídos. Supõe-se que a enzima forma um supercomplexo com a formato desidrogenase (Valdés *et al.*, 2008), acoplando a redução do hidrogênio com o efluxo de prótons para o periplasma. Este complexo também está envolvido na transferência de energia em *A. ferrooxidans*, e a diminuição na expressão dos genes que formam o complexo sugere que o NaCl afetou este mecanismo de efluxo de prótons na célula.

De uma maneira geral, as enzimas da via glicolítica não apresentaram variações nos níveis de expressão, com exceção do aumento da expressão do gene *zwf*, o qual codifica a enzima glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (G6PD, AFE_1069), catalisadora da conversão da glicose-6-fosfato em glucogalactona-6-fosfato. Em *E. coli*, essa enzima participa da via das pentoses fosfato (Zhao *et al.*, 2004). Em compensação, o gene *citZ*, que codifica a enzima citrato sintase (AFE_0045, *citrate synthase II*) apresentou níveis de expressão diminuídos. A enzima citrato sintase controla a entrada de carbono no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ou ciclo de Krebs), o qual vai gerar energia para a célula via ATP (Krishnan *et al.*, 2003). A diminuição dos níveis de expressão do gene que codifica esta enzima em *A. ferrooxidans* sugere que a atividade do Ciclo de Krebs na célula está sendo diminuída, e como

consequência, a diminuição da produção de energia da célula, possivelmente devido à baixa atividade das ATPases.

Em relação ao metabolismo de energia, foram observadas as seguintes alterações em células *salt-shock*:

- Diminuição da expressão dos genes que codificam as proteínas responsáveis pela geração de energia – ATP sintases.
- Aumento da expressão dos genes que codificam a oxidase terminal NADH-quinona oxidoreductase, na tentativa de restabelecer o potencial de membrana, a fim de retomar a geração de energia.
- Diminuição da expressão de genes que codificam a hidrogenase tipo IV.
- Diminuição da expressão de genes que codificam as enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o que pode resultar na queda da atividade das ATPases na célula.
- Possível estresse oxidativo causado pelo NaCl quando as células são mantidas por curtos períodos ao contato com o NaCl.

3.3.1.3. Efeito do NaCl em processos celulares gerais: divisão, síntese de componentes celulares, síntese de proteínas

Os efeitos do NaCl em *A. ferrooxidans* afetaram vários processos celulares. São eles:

Metabolismo, síntese e reparo de ácidos nucleicos:

Vários genes das vias do metabolismo de DNA apresentam padrões de expressão alterados. O gene *maf-2* (AFE_1204) apresentou um aumento nos níveis de expressão em células *salt-shock*. Pouco se sabe sobre a proteína codificada por este gene em *A. ferrooxidans*, entretanto em *Bacillus subtilis*, a estrutura cristalina da proteína indicou que ela se liga ao DNA, podendo ter relação com o mecanismo de reparo (Minasov *et al.*, 2000). Briley Jr e colaboradores (2011) confirmaram que a proteína Maf se liga a outras proteínas e possui como função bloquear a divisão celular.

Os genes *smc* (AFE_2287, *chromosome segregation protein SMC*) e *minD* (AFE_3012, *septum site-determining protein minD*) apresentaram padrões de expressão diminuídos. Foi demonstrado que a proteína codificada pelo gene *smc* é essencial na

condensação e segregação do cromossomo e no prosseguimento da divisão celular em bactérias (Britton *et al.*, 1998; Graumann, 2001). O gene *minD* codifica a proteína MinD, a qual associa-se às proteínas MinC e MinE, e está relacionada com a formação do septo, importante estrutura na divisão celular bacteriana (Marston *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2001). Além disso, o gene AFE_3022 (*DNA replication and repair protein RecF*), que codifica a proteína de reparo e recombinação RecF, apresentou níveis de expressão diminuídos.

Outros genes essenciais relacionados à replicação do DNA apresentaram padrões de expressão diminuídos. O gene da DNA helicase, *rep* (AFE_0910) e o gene que codifica a subunidade *epsilon* da DNA polimerase III, *dnaQ* (AFE_2637), apresentaram diminuição dos níveis de expressão. Em *B. subtilis*, a ausência do gene *rec* é letal (Petit & Erlich, 2002), já que a proteína codificada por este gene é essencial para o prosseguimento da replicação do DNA cromossômico bacteriano. Outro gene com diminuição nos níveis de expressão é o gene AFE_1499 (*DNA-binding protein, HU family*). Proteínas da família HU possuem importante participação nos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA, ficando intimamente ligada a este, estabilizando-o (Balandina *et al.*, 2002). A diminuição dos níveis de expressão deste gene pode ter relação com a provável diminuição das taxas de crescimento celular, com a consequente diminuição dos níveis de replicação. A diminuição da expressão dos genes acima mencionados indica claramente uma diminuição nos níveis de síntese de DNA.

O gene *dnaQ* (AFE_2637, *DNA polymerase III, epsilon subunit*) também apresentou níveis de expressão diminuídos. A proteína DnaQ é uma subunidade da holoenzima DNA polimerase que possui atividade de “revisão” exonucleásica 5'→3' do DNA, corrigindo eventuais erros na adição de novos nucleotídeos na nova fita de DNA da bactéria em processo de divisão celular (Huang *et al.*, 1997). A diminuição desta atividade exonucleásica de revisão do DNA pode gerar consequências desastrosas para a célula, mas também pode representar uma estratégia adotada por *A. ferrooxidans*: o estresse ambiental eleva as taxas de mutação, aumentando a variabilidade das células (Capy *et al.*, 2000). Esta estratégia pode ser um importante mecanismo adaptativo das células, e pode estar sendo utilizada em *A. ferrooxidans*.

Outros genes relacionados ao metabolismo do DNA apresentaram regulação positiva dos níveis de expressão. Os genes AFE_0723 e AFE_0726, os quais codificam as subunidades R e S do sistema de restrição e modificação do tipo I (*type I restriction-modification system*) foram exemplos desta regulação positiva. O sistema R-S de restrição e modificação é uma estratégia adotada por bactérias contra a inserção de DNA exógeno, tais

como os bacteriófagos. Assim, a bactéria evita a inserção de DNA letal, como o de bacteriófagos líticos, além da inserção de genes exógenos que irão demandar um gasto energético desnecessário (Waldron & Lindsay, 2006). A literatura ainda carece de estudos que associem a exposição de bactérias a algum tipo de estresse e a modulação da expressão dos genes que codificam estas proteínas.

O estresse salino também provocou um aumento na atividade de transposases em *A. ferrooxidans*. Diversos trabalhos na literatura reportam a correlação entre estresse ambiental e aumento da variabilidade genética, resultante da atuação de mutações e rearranjos no genoma dos organismos. Os elementos transponíveis são um dos principais componentes de qualquer bactéria, representando de 3% a 50% do total do genoma (Capy, 2000; Tenaillon, *et al.*, 2004). De acordo com o genoma anotado de *A. ferrooxidans*, há atualmente 47 genes identificados que codificam elementos transponíveis, e cinco destes genes apresentaram padrões de expressão aumentados nas células submetidas ao estresse salino (AFE_0598, AFE_2014, AFE_2015, AFE_3134 e AFE_1430). A atividade de transposases em *A. ferrooxidans* parece refletir o comportamento já registrado em diversos organismos onde o aumento da variabilidade das células resulta em uma maior possibilidade de sobrevivência a ambientes hostis. O aumento da variabilidade genética parece estar associado à provável diminuição da atividade exonucleásica reparadora da DNA polimerase e a possível participação do sistema de restrição e modificação do tipo I.

As principais alterações celulares relacionadas à síntese de DNA nas células de *A. ferrooxidans* foram:

- Retardamento do crescimento e divisão celular.
- Possível diminuição da fidelidade de replicação, com eventual aumento de mutações no DNA. Este processo, associado ao aumento da atividade dos elementos transponíveis, pode ter como objetivo aumentar a variabilidade da bactéria, em resposta ao estresse salino.
- Aumento da atividade do sistema de modificação e restrição do DNA.

Síntese de proteínas e estabilização do *pool* protéico

Células submetidas a diferentes tipos de estresse, tais como: estresse oxidativo (Ling & Söll, 2010), privação de nutrientes (Takayama & Kjellberg, 2000) e alterações de pH (Amaro *et al.*, 1991) respondem modificando os padrões de síntese de proteínas. Além dos

efeitos do NaCl detalhados anteriormente, seus efeitos na síntese de proteínas também foram evidenciados em *A. ferrooxidans*.

Quando a bactéria é submetida a uma situação de estresse, a síntese de proteínas é diminuída. Neste caso, há a conversão dos ribossomos ativos – subunidades 30S e 50S – em complexos traducionais inativos – 100S e 70S – ocorrendo um processo denominado de “hibernação do ribossomo”. Neste caso, a ação da proteína de interface da subunidade ribossomal YfiA é responsável por este fenômeno, complexando os ribossomos, diminuindo a atividade dos processos traducionais e afetando a síntese protéica (Polikanov *et al.*, 2012). Não obstante, a ligação da proteína YfiA ao ribossomo impede sua reciclagem e a iniciação da tradução no ribossomo, bloqueando o sítio de ligação dos RNA transportadores e dos fatores de iniciação da tradução IF-1 e IF-3 (Ueta *et al.*, 2005; Polikanov *et al.*, 2012). A indicação de que o fenômeno da “hibernação do ribossomo” está ocorrendo em *A. ferrooxidans* se dá pelo aumento dos níveis de expressão do gene *yfiA* (AFE_0086, *ribosomal subunit interface protein*), com a concomitante diminuição da expressão do fator de iniciação da tradução IF-1, o gene *ihfA* (AFE_2683, *translation initiation factor IF-1*).

Também foi registrada a diminuição na expressão de alguns genes que codificam RNA transportadores: treonil-tRNA sintetase, *thrS* (AFE_0489), histidil-tRNA sintetase, *hisS* (AFE_1156) e seril-tRNA sintetase, *serS* (AFE_2652). Estes fatores deixam claro que o NaCl diminuiu a síntese de proteínas em *A. ferrooxidans*.

Além da diminuição da síntese de proteínas, a manutenção da integridade das proteínas também foi afetada em *A. ferrooxidans*. Foi registrada uma diminuição dos níveis de expressão do gene *grpE* (AFE_0439), o qual codifica a co-chaperona GrpE. Esta proteína interage com o complexo de estabilização de proteínas DnaK/DnaJ, e sua diminuição pode afetar a formação do complexo (GrpE/ DnaK/DnaJ), resultando em uma maior degradação protéica.

Outro gene que apresentou padrões de expressão diminuídos foi o *secB* (AFE_0968, *preprotein translocase, SecB subunit*), que codifica uma importante proteína que direciona e protege outras proteínas secretórias nascentes em direção à membrana celular, como por exemplo, proteínas de membrana externa (de Keyzer *et al.*, 2003; Papanikou *et al.*, 2007). Uma diminuição da SecB poderia resultar em um menor transporte de proteínas de membrana em *A. ferrooxidans*. Não obstante, foi detectada a diminuição da expressão do gene da serina protease, da família DO/DeqQ (AFE_1685). Esta proteína, também conhecida como protease HtrA (*High temperature requirement protease A*, ou protease dependente de alta

temperatura), funciona como uma chaperona, podendo proteger proteínas de membrana em *E. coli* (Singh *et al.*, 2011; Meltzer *et al.*, 2009).

A atividade proteolítica, contudo, parece ter aumentado nas células de *A. ferrooxidans* submetidas ao estresse salino, já que os níveis de expressão dos genes AFE_2517 (*ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS*) e AFE_2335 (*hydrogenase maturation protease*) aumentaram. A proteína ClpS e a *hydrogenase maturation protease* estão envolvidas na degradação de proteínas anormais na célula (Baker & Sauer, 2006). O estresse causado pelo NaCl pode aumentar os níveis de proteínas com conformação incorreta o que justificaria o aumento da expressão destes genes.

Foi registrado um aumento nos níveis de expressão do gene que codifica a *small heat-shock protein* Hsp20 (AFE_1009, *heat shock protein*, *Hsp20 family*) nas células *salt-shock*. Essa família de proteínas são chaperonas que agem prevenindo a agregação de proteínas durante diferentes tipos de estresse (Bepperling *et al.*, 2012). O aumento da expressão deste gene sugere uma tentativa de *A. ferrooxidans* de proteger as proteínas durante o estresse salino. O aumento da expressão deste gene pode ser uma boa alternativa já que esta chaperona não é dependente de ATP (Bepperling *et al.*, 2012) e, como mencionado anteriormente, a produção de ATP está prejudicada nas células *salt-shock*.

Os principais efeitos do NaCl em *A. ferrooxidans*, no que se refere à síntese de proteínas são:

- Diminuição da atividade dos ribossomos associada à não-ligação de fatores de tradução e diminuição da quantidade de aminoacil-tRNA sintetases;
- Diminuição dos níveis de transporte de proteínas extra-citoplasmáticas;
- Aumento da atividade de proteases, possivelmente devido ao aumento na quantidade de proteínas anômalas nas células *salt-shock*, em parte pela diminuição da expressão da co-chaperona GrpE;
- Aumento da expressão da proteína de resposta ao estresse, *heat-shock* Hsp20, na tentativa de restabelecer a homeostase celular.

Fica claro, aqui, que a estratégia celular adotada foi a de poupar energia, como observado nos processos relacionados à síntese de DNA, para direcioná-la à manutenção da homeostase celular.

Efeitos do NaCl na biossíntese de moléculas e sua consequência em processos celulares diversos em *A. ferrooxidans*

De uma maneira geral, os níveis de expressão de genes relacionados à síntese de cofatores, nucleotídeos e nucleosídeos, entre outros, foram diminuídos nas células *salt-shock*. Uma vez que estes componentes estão relacionados ao crescimento e divisão celular, a diminuição dos níveis de expressão destes genes reflete a necessidade da célula sob estresse salino em direcionar a energia para funções mais básicas. Por outro lado, eventuais genes com níveis de expressão aumentados podem indicar mecanismos de reversão de uma situação de estresse salino que pode ser prejudicial à célula.

Neste sentido, alguns genes que apresentam níveis de expressão aumentados podem ser destacados. O gene AFE_0924, o qual codifica a proteína NUDIX hidrolase, é um destes exemplos. Este gene encontra-se presente em todos os grupos de organismos, e em alguns casos está relacionado à “faxina celular” de diversos metabólitos endógenos modificados que podem ser potencialmente prejudiciais, como por exemplo nucleotídeos, nucleosídeos, aminoácidos ou outras moléculas oxidadas ou ligadas a algum radical (Bessman *et al.*, 1996; Moreno-Bruna *et al.*, 2001). Desta forma, o NaCl poderia estar afetando a estrutura destas moléculas, justificando o aumento da expressão deste gene.

Outro gene que apresentou a expressão aumentada é o gene *gshB*, que codifica a glutatona sintetase, responsável por catalisar a biossíntese da glutatona. A glutatona é uma enzima responsável pela detoxificação de diversos compostos, e está relacionada à adaptação de bactérias e outros organismos frente a diversos tipos de estresse (Ricciolo *et al.*, 2000). Aqui se evidencia mais uma vez a relação entre estresse salino e a geração de estresse oxidativo em células *salt-shock* de *A. ferrooxidans* já que a glutatona é um importante antioxidante.

A diminuição da síntese de nucleotídeos foi evidenciada pela diminuição dos níveis de expressão de diversos genes: *purD* (AFE_0837, *phosphoribosylamine--glycine ligase*); *purA* (AFE_1197, *adenylosuccinate synthetase*); *add* (AFE_2267, *adenosine deaminase*); *guaB* (AFE_1308, *inosine-5-monophosphate dehydrogenase*); *pyrE* (AFE_2136, *orotate phosphoribosyltransferase*). Foi detectada também a diminuição da expressão do gene *bioD-1* (AFE_1410, *dethiobiotin synthetase*), participante da biossíntese de biotina ou vitamina B₇, que é um importante cofator de diversas enzimas de várias vias metabólicas (Streit & Entcheva, 2003; Lin & Cronan, 2011).

A produção de isoprenóides também parece ter sido afetada nas células de *A. ferrooxidans*, com a diminuição dos níveis de expressão do gene *ispD* (AFE_2662, 2-C-

methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase). Isoprenóides são moléculas que apresentam diversas funções em bactérias, tais como formação de pigmentos e componentes de membrana, transporte de elétrons, entre outros (Kannenbergh & Poralla, 1999). Entre os isoprenóides destacam-se os terpenóides, onde se incluem os hopanóides. A diminuição dos níveis de expressão do gene *ispD* está em concomitância com a diminuição da glicosil-transferase (AFE_0974) indicando novamente que o NaCl afetou a estrutura da membrana celular de *A. ferrooxidans*.

A biossíntese do heme – outro cofator importante na célula – pode ter sido afetada nas células *salt-shock*, já que os níveis de expressão dos genes *hemC* (AFE_3033, *prophobilinogen deaminase*) e *hemD* (AFE_3034, *uroporphyrinogen-III synthase*), genes possivelmente co-transcritos do genoma de *A. ferrooxidans* (Figura 3.4), foram diminuídos. O heme é o grupo prostético de citocromos, catalases e peroxidases, essenciais para a sobrevivência da célula (Sasarman *et al.*, 1987). Os citocromos são essenciais para a respiração celular, uma vez que são componentes de cadeias de transporte de elétrons (Heinemann *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que há várias vias de transporte de elétrons na célula que podem ter sido afetadas pelo NaCl, além de muitas outras enzimas que utilizam o heme como cofator que também foram afetadas.

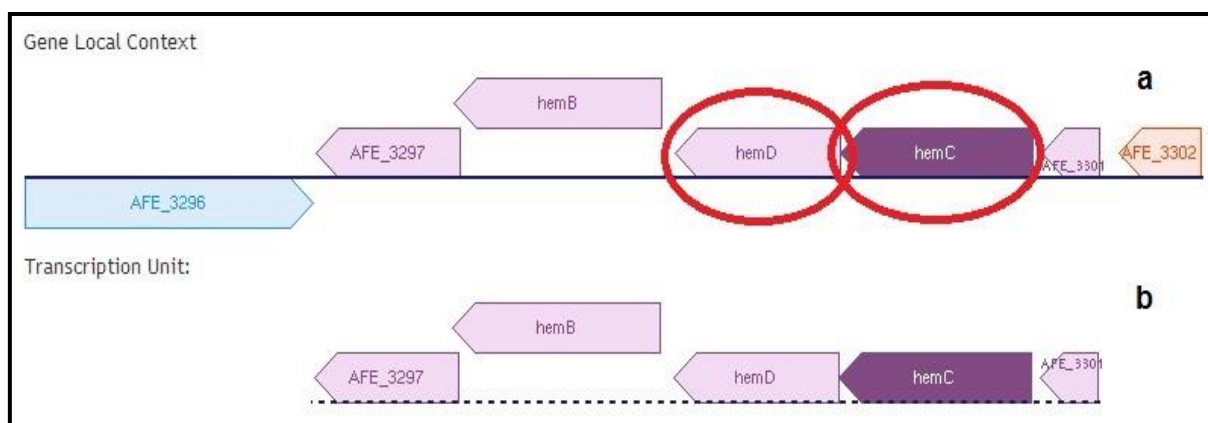


Figura 3.4. Genes relacionados à biossíntese do heme em *A. ferrooxidans* ATCC 23270, com expressão diminuída nas células *salt-shock*. **(a)** Representação gráfica da região do genoma que contém o provável *operon hem*. **(b)** Representação gráfica hipotética do transcrito do *operon hem*. A linha tracejada indica que não há confirmação experimental de que estes genes fazem parte de um *operon*; isto foi predito por análise computacional. Os dados foram obtidos com o programa *BioCyc Database Collection*, utilizando a base de dados do genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponível no NCBI.

As principais alterações causadas pelo NaCl na biossíntese de moléculas (nucleotídeos, cofatores, dentre outras) foram:

- Aumento da expressão de genes relacionados à proteção da célula contra moléculas prejudiciais, possivelmente geradas pelo estresse salino;
- Diminuição da expressão de genes relacionados à biossíntese de componentes de membrana, nucleotídeos e cofatores, diretamente relacionados ao crescimento celular e que foram afetadas pelo estresse.

3.3.1.4. Reguladores de transcrição em *A. ferrooxidans*

O genoma anotado de *A. ferrooxidans* possui 7 fatores de transcrição sigma preditos: sigma-54 (*rpoN*), sigma-32 (*rpoH*), sigma-70 (*rpoD*), sigma-24, (*rpoE*) e sigma-38 (*rpoS*), além de dois fatores descritos como da família sigma-70 (AFE_0760 e AFE_1253), estes últimos descritos como os principais fatores de transcrição em *E. coli* (Browning & Busby, 2004). Além disso, *A. ferrooxidans* possui outros 80 reguladores da transcrição de diversas famílias e outros hipotéticos (Hödar *et al.*, 2012), ou seja, são diversos genes que controlam a expressão de outros genes em *A. ferrooxidans*.

Entre os reguladores presentes em *A. ferrooxidans*, merece destaque o fator de transcrição sigma-E, *rpoE* (AFE_1687, RNA polymerase sigma-E factor), ou δ^E , o qual apresentou um aumento nos níveis de expressão. A proteína RpoE regula, entre outras vias, a expressão de várias proteínas relacionadas ao envelope celular, como proteases periplasmáticas, foldases e chaperonas. O fator de transcrição é descrito como um regulador da resposta ao estresse, e em *E. coli* e *Yersinia pestis* ele é essencial para a sobrevivência da célula (Davis & Waldor, 2009; Mutalik *et al.*, 2009). Em *Streptococcus mutans*, a inativação do gene *rpoE* prejudicou a biossíntese de biofilme, diminuiu a resistência a antibióticos e a resistência a condições de estresse (Xue *et al.*, 2010). Em *E. coli* foi descrita a participação do regulador δ^E em mecanismos de mutagenese em células estressadas (Gibson *et al.*, 2010).

Outro fator de transcrição importante é o sigma-70, ou δ^{70} (AFE_1253, RNA polymerase sigma-70 factor family), que também apresentou níveis de expressão aumentados em *A. ferrooxidans* (células *salt-shock*). Os membros da família do fator δ^{70} são os mais estudados em bactérias e atuam na regulação de genes pertencentes a diferentes vias (Paget & Helmann, 2003), o que pode estar ocorrendo em *A. ferrooxidans*.

Variações na de expressão de outros genes reguladores, pertencentes a diferentes famílias, também foram encontradas. Duas cópias do regulador da transcrição da família ArsR

(AFE_029, *transcriptional regulator, ArsR*; AFE_0734, *transcriptional regulator, ArsR family*) apresentaram níveis de expressão aumentados nas células *salt-shock*. A família ArsR está envolvida na regulação de genes relacionados à resistência (efluxo) de íons de metais pesados e outros compostos tóxicos à célula (Busenlehner *et al.*, 2003).

Outro fator de regulação da transcrição que apresentou os níveis de expressão aumentados foi o regulador da família Fis (AFE_2834, *transcriptional regulator, Fis family*), pertencente à superfamília HTH (*helix-turn-helix domain*), encontrada em praticamente todos os organismos. O fator de regulação Fis pode agir tanto como ativador quanto como repressor da transcrição e muitos estudos sugerem sua participação na repressão de eventos que envolvem síntese de ácidos nucleicos e duplicação celular (Froelich *et al.*, 1996; González-Gil *et al.*, 1998; Browning *et al.*, 2000). Nesse sentido, pode haver uma relação entre o aumento dos níveis de expressão do gene *fis* e a supressão de eventos envolvendo o crescimento celular.

Foi registrado ainda o aumento dos níveis de expressão do gene *hupR* (AFE_2340), que modula a expressão de hidrogenases. Em várias bactérias como *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium meliloti*, a ligação da proteína HupR defosforilada ao sítio de ligação do fator sigma ativa a transcrição dos genes de hidrogenases, porém a forma fosforilada da proteína HupR reprime a transcrição (Davies *et al.*, 2006). O aumento nos níveis de expressão do gene *hupR* associado à diminuição dos níveis de expressão dos genes da hidrogenase-4 pode explicar este fenômeno nas células de *A. ferrooxidans*.

Os reguladores da transcrição dependentes de δ^{54} (*enhancer-binding proteins*, EBPs) também apresentaram aumento nos níveis de expressão. Estes reguladores normalmente são ATPases tipo AAA⁺ e se ligam à proteína RpoN ou δ^{54} , a qual modula a atividade da RNA polimerase (Studholme & Dixon, 2003). Dois reguladores da transcrição dependentes de δ^{54} apresentaram um aumento nos níveis de expressão: AFE_2090 e AFE_2347. Os reguladores da transcrição dependentes de δ^{54} de *A. ferrooxidans* certamente têm importante papel na modulação da regulação de vários genes.

Como foi observado, diferentes vias metabólicas e processos celulares são regulados por diferentes fatores de transcrição em *A. ferrooxidans* com várias consequências para a célula. O padrão observado de expressão destes reguladores está em concordância com o comportamento de vários genes com expressão diferencial nas células *salt-shock*.

Este é o primeiro trabalho que analisa, em larga-escala, os efeitos do NaCl no transcriptoma das células de *A. ferrooxidans*.

3.3.2. Validação dos experimentos de RNA-Seq por PCR em Tempo Real

Alguns genes foram selecionados e tiveram a expressão analisada por PCR em Tempo Real, para validar os resultados encontrados com o transcriptoma de *A. ferrooxidans*. As proteínas codificadas por estes genes desempenham papéis importantes na resposta das células de *A. ferrooxidans* ao NaCl. Este tipo de validação tem sido utilizado em vários trabalhos (Yoder-Himes *et al.*, 2009; Croucher & Thomson, 2010; Li *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2015). Os resultados são mostrados na Tabela 3.3 e na Figura 3.5.

Tabela 3.3. Expressão relativa dos genes selecionados para validação dos dados de RNA-Seq.

Locus (NCBI)	Proteína	Valor de expressão relativa ¹	<i>p</i> -valor ²
AFE_2225	voltage-gated chloride channel	5,24 (± 0,79)	0,009
AFE_0596	transposon transposase A	3,34 (± 0,82)	0,04
AFE_0654	heavy metal-binding protein	3,41 (± 0,35)	0,03
AFE_1410	dethiobiotin synthetase	-2,31 (± 0,35)	0,02
AFE_3068	outer membrane efflux protein	-3,57 (± 0,85)	0,01
AFE_3059	transcriptional regulator OmpR	-3,92 (± 1,44)	0,02
AFE_0944	hydrogenase-4, G subunit	-3,81 (± 0,22)	0,0007

¹ Os valores de expressão relativa foram obtidos a partir de RNA isolado de quatro culturas independentes. Os valores apresentados representam a média da expressão dos genes em células salt-shock em relação ao controle. O desvio padrão está representado entre parênteses. ² Valor de *p* obtido com o Teste t.

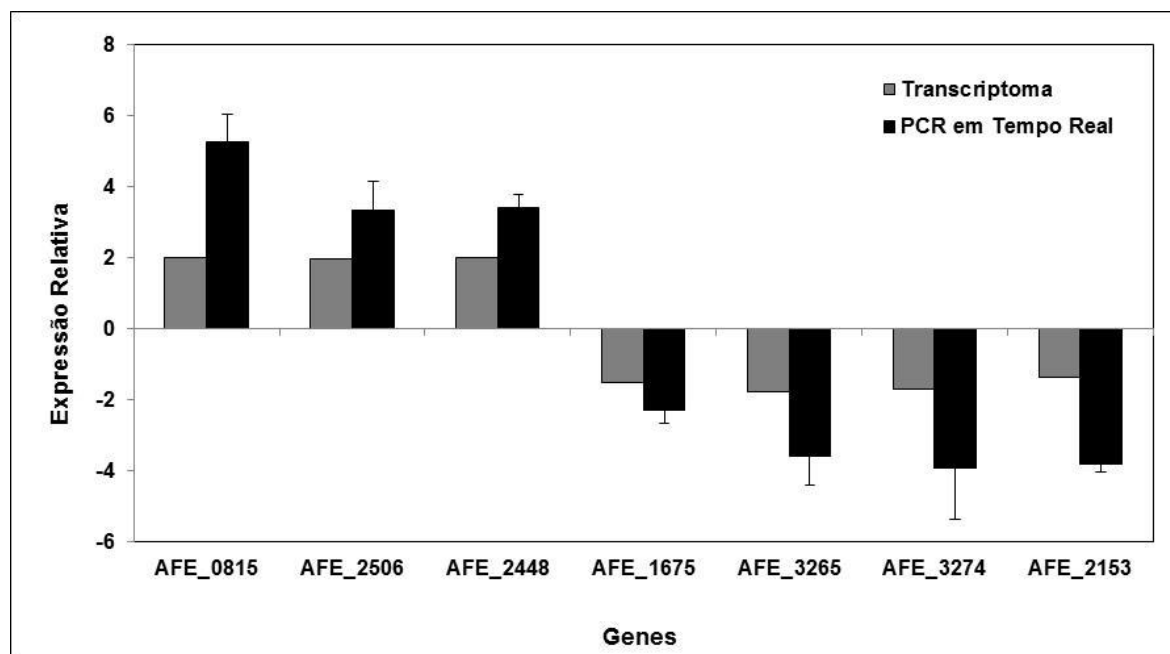


Figura 3.5. Expressão dos genes selecionados obtida por RNA-Seq (barras cinzas) e PCR em Tempo Real (barras pretas). Genes: AFE_2225: *voltage-gated chloride channel*; AFE_0596: *transposon transposase A*; AFE_0654: *heavy metal-binding protein*; AFE_1410: *dethiobiotin synthetase*; AFE_3068: *outer membrane efflux protein*; AFE_3059: *transcriptional regulator OmpR*; AFE_0944: *hydrogenase-4, G subunit*.

Na Figura 3.5, pode-se observar que os resultados obtidos por PCR em tempo real corroboram os resultados no RNA-Seq, ilustrando assim a representatividade e acurácia das técnicas.

Cabe ressaltar que os dados obtidos são provenientes de amostras de RNA diferentes que foram utilizadas para cada uma das técnicas. Fang & Cui (2011) sugeriram que uma mesma amostra de RNA utilizada tanto para ensaios de sequenciamento quanto para experimentos de PCR em Tempo Real apenas valida a técnica da PCR em si. A validação do estudo, bem como as conclusões finais, devem vir de diferentes replicatas biológicas de uma mesma população, sendo este fato aplicável tanto para estudos de RNA-Seq quanto para estudos de *microarray*.

3.4. CONCLUSÕES

A análise do transcriptoma de células controle e *salt-shock* de *A. ferrooxidans* mostrou que o NaCl afeta a expressão de genes envolvidos nos mais diferentes processos da bactéria. A alteração dos níveis de expressão de genes que codificam proteínas transportadoras, além daquelas envolvidas na modificação da fluidez na membrana dificultando a entrada e maximizando o efluxo de íons Cl^- , indicou modificações estruturais na membrana celular da bactéria. A diminuição nos níveis de expressão de genes relacionados à geração de energia na célula, resulta na diminuição dos processos de crescimento que pode ter sido afetado também pela diminuição dos níveis de expressão de genes relacionados a síntese de proteínas, DNA, entre outras moléculas importantes no crescimento. O aumento na expressão de genes relacionados ao estresse (proteases, chaperonas e transposases) mostra que a bactéria tende a diminuir as atividades celulares relacionadas ao crescimento para aumentar a produção de proteínas relacionadas ao estresse garantido assim a sobrevivência da célula.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abergel, C.; Bouveret, E.; Claverie, J. M.; Brown, K.; Rigal, A.; Lazdunski, C. & Bénédicti, H. (1999). Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure*, 7(10):1291-1300.

Abramson, J.; Riistama, S.; Larsson, G.; Jasaitis, A.; Svensson-Ek, M.; Laakkonen, L.; Puustinen, A.; Iwata, S. & Wilkström, M. (2000). The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* 'its ubiquinone binding site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(10):910-917.

Amaro, A. M.; Chamorro, D.; Seeger, M.; Arredondo, R.; Peirano, I. & Jerez, C. A. (1991). Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 173(2):910-915.

Baggerly, K. A.; Deng, L.; Morris, J. S. & Aldaz, C. M. (2004). Overdispersed logistic regression for SAGE: modeling multiple groups and covariates. *BMC Bioinformatics*, 5:144, doi:10.1186/1471-2105-5-144.

Baker, T. A. & Sauer, R. T. (2006). ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(12):647-653.

Balandina, A.; Kamashev, D. & Rouviere-Yaniv, J. (2002). The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31):27622-27628.

Baldrige, K. C. & Contreras, L. M. (2014). Functional implications of ribosomal RNA methylation in response to environmental stress. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(1):69-89.

Bay, D. C.; Rommens, K. L.; Turner, R. J. (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778(9):1814-1838.

Bepperling, A.; Alte, F.; Kriehuber, T.; Braun, N.; Weinkauff, S.; Groll, M.; Haslbeck, M. & Buchner, J. (2012). Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50):20407-20412.

Bessman, M. J.; Frick, D. N. & O’Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(41):25059-25062.

Browning, D. F.; Cole, J. A. & Busby, S. J. W. (2000). Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly. *Molecular Microbiology*, 37(5):1258-1269.

Briley, K. Jr; Prepiak, P.; Dias, M. J.; Hahn, J. & Dubnau, D. (2011). Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Molecular Microbiology*, 81(1):23-39.

Britton, R. A.; Lin, D.C. H. & Grossmann, A. D. (1998). Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes & Development*, 12(9):1254-1259.

Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1):57-65.

Busenlehner, L. S.; Pennella, M. A. & Giedroc, D. P. (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3):131-143.

Capy, P.; Gasperi, G.; Biémont, C. & Bazin, C. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85:101-106.

Croucher, N. J.; Thomson, N. R. (2010). Studying bacterial transcriptomes using RNA-Seq. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5):619-624.

- Cruz, A.; Rodrigues, R.; Pinheiro, M. & Mendo, S. (2015). Transcriptomes analysis of *Aeromonas molluscorum* Av27 cells exposed to tributyltin (TBT): Unravelling the effects from the molecular level to the organism. *Marine Environmental Research*, 109:132-139.
- Davies, K. M.; Skamnaki, V.; Johnson, L. N. & Vénien-Bryan, C. (2006). Structural and functional studies of the response regulator HupR. *Journal of Molecular Biology*, 359(2):276-288.
- Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2009). High-throughput sequencing reveals suppressors of *Vibrio cholerae* *rpoE* mutations: one fewer porin is enough. *Nucleic Acids Research*, 37(17):5757-5767.
- de Keyzer, J.; van der Does, C. & Driessen, A. J. M. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(10):2034-2052.
- Deng, X.; Li, Z. & Zhang, W. (2012). Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*, 30(1):311-315.
- de Sá, P. H. C. G.; Veras, A. A. O.; Carneiro, A. R.; Pinheiro, K. C.; Pinto, A. C.; Soares, S. C.; Schneider, M. P. C.; Azevedo, V.; Silva, A. & Ramos, R. T. J. (2015). The impact of quality filter for RNA-Seq. *Gene*, 563(2):165-171.
- De Sá, P. H.; Veras, A. A.; Carneiro, A. R.; Baraúna, R. A.; Guimarães, L. C.; Pinheiro, K. C.; Pinto, A. C.; Soares, L. C.; Schneider, M. P.; Azevedo, V.; Silva, A. & Ramos, R. T. (2016). *Corynebacterium pseudotuberculosis* RNA-seq data from abiotic stresses. *Data Brief*, 5:963-966.
- Detmers, F. J. M.; Lanfermeijer, F. C. & Poolman, B. (2001). Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Research in Microbiology*, 152(3-4):245-258.
- Dutzler, R. (2004). Structural basis for ion conduction and gating in ClC chloride channels. *FEBS Letters*, 564(3):229-233.

- Fang, Z. & Cui, X. (2011). Design and validation issues in RNA-Seq experiments. *Briefings in Bioinformatics*, 12(3):280-287.
- Fluman, N. & Bibi, E. (2009). Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomes*, 1794(5):738-747.
- Fränzel, B.; Tröetschel, C.; Rückert, C.; Kalinowski, J.; Poetsch, A. & Wolters, D. A. (2010). Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to salt-stress conditions. *Proteomics*, 10(3):445-457.
- Froelich, J. M.; Phuong, T. K. & Zyskind, J. W. (1996). Fis binding in the *dnaA* operon promoter region. *Journal of Bacteriology*, 178(20):6006-12.
- Fu, X.; Wang, D.; Yin, X.; Du, P. & Kan, B. (2014). Time course transcriptome changes in *Shewanella algae* in response to salt stress. *PLOS One*, 9(5):e96001, doi:10.1371/journal.pone.0096001.
- Garcia Jr, O. (1991). Isolation and purification of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* from some coal and uranium mines of Brazil. *Revista de Microbiologia*, 20:1-6.
- Garcia Jr, O.; Tuovinen, O. H. & Bigham, J. M. (1995). Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(6):508–514.
- Gibson, J. L.; Lombardo, M. J.; Thornton, P. C.; Hu, K. H.; Galhardo, R. S.; Beadle, B.; Habib, A.; Magner, D. B.; Frost, L. S.; Herman, C.; Hastings, P. J. & Rosenberg, S. M. (2010). The sigma(E) stress response is required for stress-induced mutation and amplification in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 77(2):415-430.
- Godlewska, R.; Wiśniewska, K.; Pietras, Z. & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2009). Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. *FEMS Microbiology Letters*, 298(1):1-11.

González-Gil, G.; Kahmann, R. & Muskhelishvili, G. (1998). Regulation of *crp* transcription by oscillation between distinct nucleoprotein complexes. *The EMBO Journal*, 17(10):2877-2885.

Graumann, P. L. (2001). SMC proteins in bacteria: Condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie*, 83(1):53-59.

Guerzoni, M. E.; Lanciotti, R. & Cocconcelli, P. S. (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 147(Pt 8):2255-2264.

Hödar, C.; Moreno, P.; di Genova, A.; Latorre, M.; Reyes-Jara, A.; Maass, A.; González, M. & Cambiazo, V. (2012). Genome wide identification of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) transcription factors and comparative analysis of ArsR and MerR metal regulators. *Biometals*, 25(1):75-93.

Heinemann, I. U.; Jahn, M. & Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 474(2):238-251.

Hong, S. K.; Kim, K. H.; Park, J. K.; Jeong, K. W.; Kim, Y. & Kim, E. E. (2010). New design platform for malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase. *FEBS Letters*, 584(6):1240-1244.

Huang, Y.; Braithwaite, D. K. & Ito, J. (1997). Evolution of *dnaQ*, the gene encoding the editing 3' to 5' exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme in Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 400(1):94-98.

Jentsch, T. J.; Friedrich, T.; Schriever, A. & Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *European Journal of Physiology*, 437(6):783-795.

Jentsch, T. J.; Stein, V.; Weinreich, F. & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82(2):503-568.

Jin, J.; Zhang, B.; Guo, H.; Cui, J.; Jiang, L.; Song, S.; Sun, M. & Ren, F. (2012). Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by

gene expression profile using RNA-Sequencing. *PLOS One*, 7(12):e50777, doi:10.1371/journal.pone.0050777.

Joset, F.; Jeanjean, R. & Hagemann, M. (1996). Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events. *Physiologia Plantarum*, 96(4):738-744.

Jossier, M.; Kroniewicz, L.; Dalmas, F.; LeThiec, D.; Ephritikhine, G.; Thomine, S.; Barbier-Brygoo, H.; Vavasseur, A.; Filleur, S. & Leonhardt, N. (2010). The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *The Plant Journal*, 64(4):563-576.

Kabanov, D. S. & Prokhorenko, I. R. (2010). Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-Negative bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 75(4):383-404.

Kannenbergh, E. L. & Poralla, K. (1999). Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften*, 86(4):168-176.

Khadem, A. F.; Pol, A.; Wiczorek, A. S.; Jetten, M. S. M. & Op den camp, H. J. (2012). Metabolic regulation of “*Ca. Methylacidiphilum fumariolicum*” SolV cells grown under different nitrogen and oxygen limitations. *Frontiers in Microbiology*, 3:266, doi:10.3389/fmicb.2012.00266.

Khudyakov, J. I.; D’haeseleer, P.; Borgolin, S. E.; DeAngelis, K. M.; Woo, H.; Lindquist, E. A.; Hazen, T. C.; Simmons, B. A. & Thelen, M. P. (2012) Global transcriptome response to ionic liquid by a tropical rain forest soil bacterium, *Enterobacter lignolyticus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32):E2173-E2182.

Koronakis, V.; Eswaran, J. & Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annual Reviews of Biochemistry*, 73:467-489.

Krishnan, H. B.; Kim, W. S.; Sun-Hyung, J.; Kim, K. Y. & Jiang, G. (2003). Citrate synthase mutants of *Sinorhizobium fredii* USDA257 form ineffective nodules with aberrant ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6):3561-3568.

Kühlbrandt, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4):282-295.

Lawson, E. N.; Nicholas, C. J. & Pellat, H. (1995). The toxic effects of chloride ions on *Thiobacillus ferrooxidans*. In: Vagras, T.; Jerez, C. A.; Wiertz, J. V. & Toledo, H. (Eds.). *Biohydrometallurgy Processing*, pp. 165-174. Universidad de Chile, Santiago.

Li, J. S.; Bi, Y. T.; Dong, C.; Yang, J. F. & Liang, W. D. (2011) Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of *Streptococcus thermophilus*. *PLOS One*, 6(10):e25777, doi:10.1371/journal.pone.0025777.

Lin, S. & Cronan, J. E. (2011). Closing in on complete pathways of biotin synthesis. *Molecular BioSystems*, 7(6):1811-21.

Ling, J. & Söll, D. (2010). Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9):4028-4033.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-408.

Lísal, J. & Maduke, M. (2008). The CIC-0 chloride channel is a 'broken' Cl⁻/H⁺ antiporter. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8):805-810.

Liu, X.; Luo, Y.; Mohamed, O. A.; Liu, D. & Wei, G. (2014). Global transcriptome analysis of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2 under salt stress. *BMC Microbiology*, 14:319, doi:10.1186/s12866-014-0319-y.

López, C. S.; Alice, A. F.; Heras, H.; Rivas, E. A. & Sánchez-Rivas, C. (2006). Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology*, 152(Pt 3):605-616.

- Marston, A. L.; Thomaides, H. B.; Edwards, D. H.; Sharpe, M. E. & Errington, J. (1998). Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes & Development*, 12(21):3419-3430.
- Martin, J. A. & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10):671-682.
- McClure, R.; Balasubramanian, D.; Sun, Y.; Bobrovskyy, M.; Sumby, P.; Genco, C. A.; Vanderpool, C. K. & Tjaden, B. (2013). Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 41(14):e140, doi:10.1093/nar/gkt444.
- Meltzer, M.; Hasenbein, S.; Mamant, N.; Merdanovic, M.; Poepsel, S.; Hauske, P.; Kaiser, M.; Huber, R.; Krojer, T.; Clausen, T. & Ehrmann, M. (2009). Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 160(9):660-666.
- Minasov, G.; Teplova, M.; Stewart, G. C.; Koonin, E. V.; Anderson, W. F. & Egli, M. (2000). Functional implications from crystal structures of the conserved *Bacillus subtilis* protein Maf with and without dUTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12):6328-6333.
- Moreno-Bruna, B.; Baroja-Fernández, E.; Muñoz, F. J.; Bastarrica-Berasategui, A.; Zanduetta-Criado, A.; Rodríguez-López, M.; Lasa, I.; Akazawa, T. & Pozueta-Romero, J. (2001). Adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase prevents glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14):8128-8132.
- Mutalik, V. K.; Nonaka, G.; Ades, S. E.; Rhodius, V. A. & Gross, C. A. (2009). Promoter strength properties of the complete Sigma E regulon of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 191(23):7279-7287.
- Mutz, K. O.; Heilkenbrinker, A.; Lönne, M.; Walter, J. G. & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(1):22-30.

- Mykytczuk, N. C.; Trevors, J. T.; Foote, S. J.; Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. & Twine, S. M. (2011). Proteomic insights into cold adaptation of psychrotrophic and mesophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(2):259-277.
- Nakaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(20):5853-5859.
- Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic '*Thiobacillus prosperus*'. *Microbiology*, 155(Pt 4):1302-1309.
- Oliver, H. F.; Orsi, R. H.; Ponnala, L.; Keich, U.; Wang, W.; Sun, Q.; Cartinhour, S. W.; Filiatrault, M. J.; Wiedmann, M. & Boor, K. J. (2009). Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. *BMC Genomics*, 10:641, doi:10.1186/1471-2164-10-641.
- Paget, M. S. B. & Helmann, J. D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biology*, 4(1):203.
- Pao, S. S.; Paulsen, I. T. & Saier Jr, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1):1-34.
- Papanikou, E.; Karamanou, S. & Economou, A. (2008). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11):839-851.
- Pelissier, M. C.; Lesley, S. A.; Kuhn, P. & Bourne, Y. (2010). Structural insights into the catalytic mechanism of bacterial guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase and its regulation by divalent ions. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(35):27468-27476.
- Petit, M. A. & Erlich, D. (2002). Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins. *The EMBO Journal*, 21(12):3137-3147.

Polikanov, Y. S.; Blaha, G. M. & Steitz, T. A. (2012). How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science*, 336(6083):915-918.

Putman, M.; van Deen, H. W. & Konings, W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4):672-693.

Raetz, C. R.; Guan, Z.; Ingram, B. O.; Six, D. A.; Song, F.; Wang, X. & Zhao, J. (2009). Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *Journal of Lipid Research*, 50:S103-S108.

Ribeiro, D. A.; Maretto, D. A.; Nogueira, F. C.; Silva, M. J.; Campos, F. A.; Domont, G. B.; Poppi, R. J. & Ottoboni, L. M. (2011). Heat and phosphate starvation effects on proteome, morphology and chemical composition of the biomining bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 27(6):1469-1479.

Riccilo, P. M.; Muglia, C. I.; de Bruijn, F. J.; Roe, A. J.; Booth, I. R. & Aguilar, O. M. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*, 182(6):1748-1753.

Romantsov, T.; Guan, Z. & Wood, J. M. (2009). Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(10):2092-2100.

Sakai, N.; Yao, H.; Watanabe, N.; Yumoto, F.; Tanokura, M. & Tanaka, I. (2001). The three-dimensional structure of septum site-determining protein MinD from *Pyrococcus horikoshii* OT3 in complex with Mg-ADP. *Structure*, 9(9):817-826.

Serre, L.; Verbree, E. C.; Dauter, Z.; Stuitje, A. R. & Derewenda, Z. S. (1995). The *Escherichia coli* malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase at 1.5-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22):12961-12964.

Shiers, D. W.; Blight, K. R. & Ralph, D. E. (2005). Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 80(1-2):75-82.

Silhavy, T. J.; Kahne, D. & Walker, S. (2010) The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5):a000414, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

Singh, N.; Kuppli, R. R. & Bose, K. (2011). The structural basis of mode of activation and functional diversity: a case study with HtrA family of serine proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 516(2):85-96.

Streit, W. R. & Entcheva, P. (2003). Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(1):21-31.

Studholme, D. J. & Dixon, R. (2003). Domain architectures of sigma-54 dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology*, 185(6):1757-1767.

Takayama, K. & Kjellberg, S. (2000). The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environmental Microbiology*, 2(4):355-365.

Tenaillon, O.; Denamur, E. & Matic, I. (2004). Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Trends in Microbiology*, 12(6):264-270.

Thiemann, B. & Imhoff, J. F. (1991). The effect of salt on the lipid composition of *Ectothiorhodospira*. *Archives of Microbiology*, 156(5):376-384.

Tribelli, P. M.; Solar Vereno, E. C.; Ricardi, M. M.; Gómez-Lozano, M.; Raiger Iutsman, L. J.; Molin, S. & López, N. I. (2015). Novel essential role of ethanol oxidation genes at low temperature revealed by transcriptome analysis in the antarctic bacterium *Pseudomonas extremaustralis*. *PLoS One*, 10(12):e0145353, doi:10.1371/journal.pone.0145353.

Tsuzuki, M.; Moskvina, O. V.; Kuribayashi, K. S.; Sato, K.; Retamal, S.; Abo, M.; Zeilstra-Ryalls, J. & Gomelsky, M. (2011). Salt stress-induced changes in the transcriptome, compatible solutes, and membrane lipids in the facultatively phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21):7551-7559.

- Tuovinen, O. H. & Kelly, D. P. (1972). Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ores. *Journal of Basic Microbiology: Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 12(4):311-346.
- Ueta, M.; Yoshida, H.; Wada, C.; Baba, T.; Mori, H. & Wada, A. (2005). Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, 10(12):1103-1112.
- Valdés, J.; Veloso, F.; Jedlicki, E. & Holmes, D. (2003). Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics*, 4(1):51, doi:10.1186/1471-2164-4-51.
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R. 2nd.; Eisen, J. A.; Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9:597, doi:10.1186/1471-2164-9-597.
- Van Vilet, A. H. (2010). Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 302(1):1-7.
- Walia, H.; Wilson, C.; Zeng, L.; Ismail, A. M.; Condamine, P. & Close, T. J. (2007). Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed *japonica* and *indica* rice genotypes during panicle initiation stage. *Plant Molecular Biology*, 63(5):609-623.
- Waldron, D. E. & Lindsay, J. A. (2006). Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *Journal of Bacteriology*, 188(15):5578-5585.
- Welander, P. V.; Hunter, R. C.; Zhang, L.; Sessions, A. L.; Summons, R. E. & Newman, D. K. (2009). Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Bacteriology*, 191(9):6145-6156.
- Xue, X.; Tomasch, J.; Sztajer, H. & Wagner-Döbler, I. (2010). The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *Journal of Bacteriology*, 192(19):5081-5092.

Winderickx, J. & Castro, J. M. (1994). Practical course in molecular biology of microorganisms. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, p.59.

Yarzabal, A.; Appia-Ayme, C.; Ratouchniak, J. & Bonnefoy, V. (2004). Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology*, 150(Pt 7):2113-2123.

Yi, L.; Velasquez, M. S.; Holler, T. P. & Woodard, R. W. (2011). A simple assay for 3-deoxy-d-manno-octulosonate cytidyltransferase (KdsB) and its use as a pathway screen. *Analytical Biochemistry*, 416(2):152-158.

Yoder-Himes, D. R.; Chain, P. S. G.; Zhu, Y.; Wurtzel, O.; Rubin, E. M.; Tiedje, J. M. & Sorek, R. (2009). Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10):3976-3981.

Zhao, J.; Baba, T.; Mori, H. & Shimizu, K. (2004). Global metabolic response of *Escherichia coli* to *gnd* or *zwf* gene-knockout, based on ¹³C-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1):91-98.

Zhao, W.; Róg, T.; Gurtovenko, A. A.; Vattulainen, I. & Karttunen, M. (2008). Role of phosphatidylglycerols in the stability of bacterial membranes. *Biochimie*, 90(6):930-938.

Zhang, L.; Liu, W.; Xiao, J.; Hu, T.; Chen, K.; Jiang, H. & Shen, X. (2007). Malonyl-CoA: acyl carrier protein transacylase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure and its interaction with acyl carrier protein. *Protein Science*, 16(6):1184-1192.

Zhang, H.; Ehrenkaufer, G. M.; Manna, D.; Hall, N. & Singh, U. (2015). High throughput sequencing of *Entamoeba* 27nt small RNA population reveals role in permanent gene silencing but no effect on regulating gene expression changes during stage conversion, oxidative, or heat shock stress. *PLoS One*, 10(8):e0134481, doi:10.1371/journal.pone.0134481.

CAPÍTULO 4

Sequenciamento do genoma de *Thiobacillus prosperus* DSM 14174

4.1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Thiobacillus prosperus* foi isolada na ilha de Vulcano, Itália, e descrita pela primeira vez por Hubber & Stetter (1989). Esta bactéria é Gram-negativa, quimiolitotrófica, capaz de crescer a 20-45°C (37°C ótima) e em valores de pH entre 1,0 e 4,5 (pH 2,0 ótimo). Os isolados de *T. prosperus* observados em microscópio de contraste de fase se mostraram como pequenos bastonetes, com 0,4 – 1,0 µm de comprimento e 0,2 - 0,4 µm de largura, com um flagelo polar de 0,4 µm de comprimento (Huber & Stetter, 1989). Esta bactéria requer íons cloreto para o seu crescimento (Nicolle *et al.*, 2009), suportando concentrações de até 6% de NaCl (Huber & Stetter, 1989), sendo o crescimento ótimo em meio contendo entre 1% e 2% de NaCl (Daves-Belmar *et al.*, 2008). A bactéria *T. prosperus* obtém energia por meio da oxidação de ferro e compostos de enxofre (Huber & Stetter, 1989; Nicolle *et al.*, 2009; Ossandon *et al.*, 2014) e pode desempenhar um papel importante em operações de biolixiviação em locais onde a água disponível para o processo contém sal (Huber & Stetter, 1989).

O genoma da linhagem tipo de *T. prosperus*, DSM-5130, foi sequenciado (Ossandon *et al.*, 2014) e genes envolvidos na adaptação de organismos a ambientes com alta osmolaridade foram encontrados. Entre estes genes estão os envolvidos na biossíntese de solutos compatíveis como a ectoína, sacarose e glicina betaína. Genes que codificam transportadores do tipo ABC envolvidos na captação de ectoína e glicina betaína também foram encontrados no genoma da bactéria (Ossandon *et al.*, 2014). Várias bactérias adotam o acúmulo de solutos compatíveis como estratégia de adaptação a alta osmolaridade, entre elas estão os membros das famílias Ectothiorhodospiraceae (gêneros *Alkalilimnicola*, *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Thioalkalicoccus*, *Ectothiorhodosinus*, *Thioalkalivibrio*) (Bowers *et al.*, 2009; Sorokin *et al.*, 2014; Banciu & Muntyan, 2015; DasSarma & DasSarma, 2015), Família Halomonadaceae (gêneros *Halomonas*, *Chromohalobacter*) (Bowers *et al.*, 2009) e Família Bacillales (gênero *Bacillus*) (Galinski, 1993; Bowers *et al.*, 2009).

A bactéria *Thiobacillus prosperus* foi classificada originalmente como um membro do gênero *Thiobacillus* (Huber & Stetter, 1989). Contudo, o sequenciamento do gene de rRNA 16S de isolados mostrou que a bactéria estava relacionada à família Ectothiorhodospiraceae (Simmons & Norris, 2002). Recentemente, Cárdenas *et al.* (2015) utilizaram dados de filogenia do gene de rRNA 16S, análise filogenômica de várias proteínas

(*multiprotein phylogeny*) e identidade média de nucleotídeos (*ANI - average nucleotide identity*) para reclassificar *T. prosperus* DSM 5130. Os autores constataram que esta linhagem faz parte de um novo gênero dentro da família Ectothiorhodospiraceae, sendo assim renomeada como *Acidihalobacter prosperus* (Cárdenas *et al.*, 2015).

Este capítulo descreve o sequenciamento do genoma da linhagem DSM 14174 de *T. prosperus* e uma análise detalhada dos genes envolvidos na tolerância ao sal encontrados. Uma análise filogenética também foi realizada.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Sequenciamento e anotação do genoma de *T. prosperus* DSM 14174

A linhagem de *T. prosperus* DSM 14174 e seu respectivo DNA genômico foram obtidos na coleção DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, <http://www.dsmz.de>). O DNA foi enviado para o Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e o sequenciamento do genoma da bactéria foi realizado em um sequenciador Illumina HiSeq2500. Duas bibliotecas *paired-end* com insertos de 400 pb forneceram 235.599.366 *reads* de 100 pb. As *reads* foram pré-processadas no NGS QC Toolkit versão 2.2.9 (Patel & Jain, 2012), utilizando cortes de qualidade e tamanho mínimos de 20 e 70 pb, respectivamente. *Reads* com bases ambíguas foram removidos da análise. O parâmetro *K-mer Count*, presente no programa *Jellyfish mer*, versão 2.1.4, foi utilizado para estimar o tamanho do genoma em 3,8 Mpb e cobertura de 5.201x (Marçais & Kingsford, 2011). Os *reads* foram reamostrados para uma cobertura de aproximadamente 100x, montados com o programa SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) e o preenchimento dos *gaps* foi realizado com o IMAGE versão 2.4 (Tsai *et al.*, 2010). A montagem final resultou em 73 *contigs* (N50: 160.012 pb; conteúdo de GC: 61,82%), totalizando 3.533.291 pb. *Open Reading frames (ORFs)* foram preditas com o GLIMMER-3 (Delcher *et al.*, 1999) e a anotação do genoma foi realizada no servidor *Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST)* versão 4.0 (Aziz *et al.*, 2008). Um mapa circular do genoma foi criado no CGView (Grant & Stothard, 2008).

4.2.2. Genes envolvidos na tolerância ao sal em *T. prosperus* DSM 14174

Para a análise dos genes que possuem relação com a tolerância ao NaCl em *T. prosperus*, os genomas de 40 bactérias da família Ectothiorhodospiraceae, juntamente com *T. prosperus* DSM 14174, foram submetidos a uma análise usando o algoritmo *OrthoMCL*, presente no software *get_homologues* (Contreras-Moreira & Vinuesa, 2013). Os genomas utilizados nas análises foram obtidos nas plataformas IMG (<http://img.jgi.doe.gov/er>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) (Benson *et al.*, 2012; Markowitz *et al.*, 2012). São eles: *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130 (NZ_JQSG01000001.1); *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 (NC_008340.1); *Aquisalimonas asiatica* CGMCC1.6291 (Gp0014851);

Arhodomonas aquaeolei DSM_8974 (NZ_KB894800.1); *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* ATCC 51935 (NZ_KK214998.1); *Ectothiorhodospira* sp. PHS1 (NZ_AGBG01000001.1); *Halorhodospira halochloris* cepa A (CP007268.1); *Halorhodospira halophila* SL1 (NC_008789.1); *Nitrococcus mobilis* Nb-231 (NZ_AAOF00000000.1); *Spiribacter salinus* M19-40 (NC_021291.1); *Spiribacter* sp. UAH-SP71 (NC_022664.1); *Thermithiobacillus tepidarius* DSM 3134 (NZ_AUIS00000000.1); *Thioalkalivibrio nitratreducens* DSM 14787 (NC_019902.2); *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (NZ_CP007029.1); *Thioalkalivibrio* sp. AL5 (NZ_ARKN00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. AL21 (NZ_ARLR00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALgr1 (NZ_ARJZ00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ2 (NZ_ARKB00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ4 (NZ_ARHX00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ5 (NZ_ARHY00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ8 (NZ_ARIF00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ9 (NZ_AQYE00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ11 (NZ_AQXP00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ12 (NZ_ARKA00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ15 (NZ_ARTU00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ20 (NZ_ARKO00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ21 (NZ_ARKP00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALRh (NZ_ARLV00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ARh4 (NZ_ARJY00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. HL-Eb18 (NZ_AQOW00000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (NC_013889.1); *Thioalkalivibrio sulfidophilus* HLEbGr7 (NC_011901.1); *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* ARhD1 (NZ_AQZO00000000.1); *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh2 (NZ_ARQK00000000.1); *Thioalkalivibrio versutus* AL2 (Gp0014851); *Thioalkalivibrio versutus* D301 (NZ_CP011367.1); *Thiohalomonas denitrificans* HLD2 (Gp0099425); *Thiohalospira halophilus* HL3 (Gp0099397) e *Thiorhodospira sibirica* ATCC 700588 (NZ_AGFD00000000.1). Para esta análise, foi utilizada uma cobertura de alinhamento mínimo de 75% e um *e-value* máximo de $1e^{-5}$, juntamente com o parâmetro $-t$ (para a identificação dos genes únicos presentes em cada um dos genomas). Os genes encontrados somente em *T. prosperus* DSM 14174 ou presentes tanto em *T. prosperus* DSM 14174 quanto em *A. prosperus* DSM 5130, e que possuem uma relação com a tolerância ao NaCl, foram selecionados para discussão neste trabalho. A anotação dos genes selecionados, tomando como base o genoma de *T. prosperus* DSM 14174, foi realizada por meio das ferramentas automáticas disponibilizadas no servidor RAST.

4.2.3. Análise filogenética e filogenômica

Para a análise filogenética foram utilizadas as sequências completas do gene de rRNA 16S de 31 bactérias pertencentes à família Ectothiorhodospiraceae, incluindo *T. prosperus* DSM 14174. As sequências foram obtidas no banco de dados do RDP (*Ribosomal Database Project* - <http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole *et al.*, 2014), SILVA (*Comprehensive Ribosomal RNA Databases* - <http://www.arb-silva.de/>) (Quast *et al.*, 2013) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). São elas: *Acidiferrobacter thiooxydans* m-1 (AF387301.1); *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130 (EU653290.1); *Alkalimnicola ehrlichii* MLHE-1 (AF406554); *Alkalimnicola halodurans* 34A1c (AJ404972.1); *Alkalispirillum mobile* DSM 12769 (AF114783.1); *Aquisalimonas asiatica* CG12 (AM404263.1); *Arhodomonas aquaeolei* ATCC 49307 (M26631.1); *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* ATCC 51935 (FN293052.1); *Ectothiorhodospira imhoffii* JA319 (AM902494.1); *Ectothiorhodospira mobilis* DSM 4180 (X93482.1); *Ectothiorhodospira* sp. PHS-1 (AGBG01000071); *Halorhodospira halochloris* DSM 1059 (FR749892.1); *Halorhodospira halophila* SL1 (CP000544); *Natronocella acetinitrilica* ANL1 (EF103127.1); *Spiribacter salinus* M19-40 (CP005963); *Thioalkalivibrio denitrificans* ALJD (AF126545.1); *Thioalkalivibrio nitratreducens* DSM 14787 (CP003989); *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (AF151432.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALJ5 (ARHY01000011); *Thioalkalivibrio* sp. ALRh (ARLV01000013); *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (CP001905); *Thioalkalivibrio sulfidophilus* HL-EbGR7 (CP001339); *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* ARhD1 (AQZO01000005); *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh2 (ARQK01000032); *Thioalkalivibrio versutus* D301 (2632517425); *Thioalkalivibrio versutus* DSM 13738 (FR749906.1); *Thiohalomonas denitrificans* HLD2 (EF117909.1); *Thiohalospira halophila* HL3 (DQ469576.1); *Thiorhodospira sibirica* ATCC700588 (AGFD01000020); além de *Escherichia coli* cepa. K-12 subcepa MG1655 (NR_102804.1) como grupo externo. As sequências do gene de rRNA 16S destas bactérias foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). A árvore filogenética foi gerada no programa MEGA versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) com análise de Máxima Verossimilhança e modelo Tamura três-parâmetros. A confiabilidade da topologia da árvore gerada foi testada por reamostragem com 1000 replicatas.

Uma árvore filogenômica foi construída baseada no genoma de *T. prosperus* DSM 14174 e mais 21 bactérias da família Ectothiorhodospiraceae. Os genomas das bactérias foram analisados no programa AMPHORA2 (Kerepesi *et al.*, 2014) e 31 genes marcadores foram

selecionados. Os genomas utilizados nas análises foram obtidos das plataformas IMG (<http://img.jgi.doe.gov/er>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) (Benson *et al.*, 2012. Markowitz *et al.*, 2012). São eles: *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130 (NZ_JQSG010000001.1); *Aquisalimonas asiatica* CGMCC1.6291 (Gp0014851); *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 (NC_008340.1); *Arhodomonas aquaeolei* DSM_8974 (NZ_KB894800.1); *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* ATCC 51935 (NZ_KK214998.1); *Ectothiorhodospira* sp. PHS1 (NZ_AGBG010000001.1); *Halorhodospira halochloris* cepa A (CP007268.1); *Halorhodospira halophila* SL1 (NC_008789.1); *Spiribacter salinus* M19-40 (NC_021291.1); *Thioalkalivibrio nitrareducens* DSM 14787 (NC_019902.2); *Thioalkalivibrio paradoxus* ARh1 (NZ_CP007029.1); *Thioalkalivibrio* sp. AL5 (NZ_ARKN000000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. ALRh (NZ_ARLV000000000.1); *Thioalkalivibrio* sp. K90mix (NC_013889.1); *Thioalkalivibrio sulfidophilus* HLEbGr7 (NC_011901.1); *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* ARhD1 (NZ_AQZO000000000.1); *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* ARh2 (NZ_ARQK000000000.1); *Thioalkalivibrio versutus* D301 (NZ_CP011367.1); *Thiohalomonas denitrificans* HLD2 (Gp0099425); *Thiohalospira halophila* HL3 (Gp0099397) e *Thiorhodospira sibirica* ATCC 700588 (NZ_AGFD000000000.1). As sequências dos 31 genes marcadores selecionados (*dnaG*, *frr*, *infC*, *nusA*, *pgk*, *pyrG*, *rplA*, *rplB*, *rplC*, *rplD*, *rplE*, *rplF*, *rplK*, *rplL*, *rplM*, *rplN*, *rplP*, *rplS*, *rplT*, *rpmA*, *rpoB*, *rpsB*, *rpsC*, *rpsE*, *rpsI*, *rpsJ*, *rpsK*, *rpsM*, *rpsS*, *smpB*, *tsf*) foram utilizadas para a construção da árvore filogenômica utilizando-se o programa MEGA versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), com análise de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo JJT, levando em consideração valores com distribuição gama (+G) e frequência de aminoácidos (+F). A confiabilidade da topologia da árvore gerada foi testada por reamostragem com 1000 replicatas.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Características do genoma de *T. prosperus* DSM 14174

O genoma de *T. prosperus* DSM 14174 encontra-se como um cromossomo circular com tamanho aproximado de 3.533.291 pb (Figura 4.1). A anotação do genoma da bactéria mostrou um total de 3.670 genes que codificam proteínas, 46 genes de tRNA e três genes que codificam rRNA (1 gene de rRNA 5S, 1 gene de rRNA 23S e 1 gene de rRNA 16S). Um total de 1.712 genes que codificam proteínas (47%) foi classificado em 418 subsistemas e funções conhecidas foram atribuídas para 1.583 destes genes.

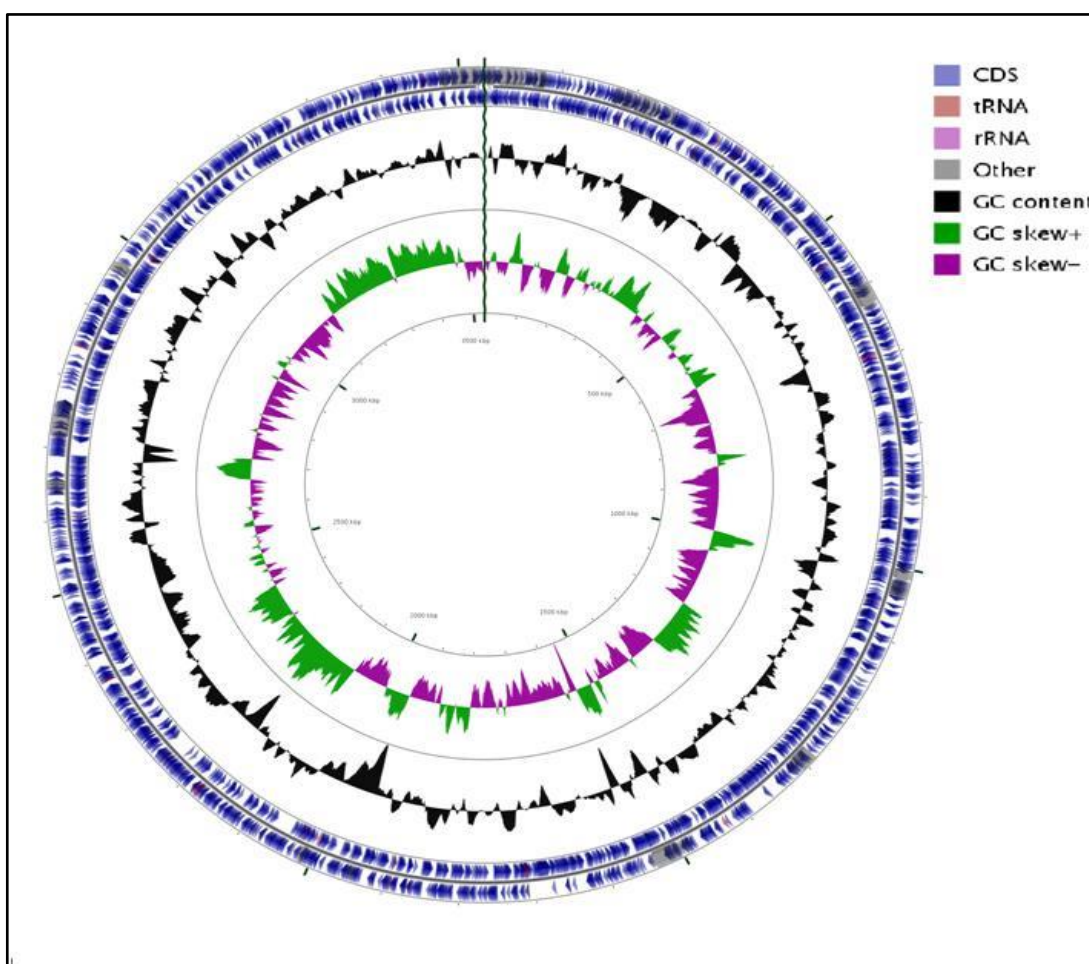


Figura 4.1. Representação gráfica do mapa circular do cromossomo da bactéria *T. prosperus* DSM-14174. Sentido para leitura (da parte externa para a parte interna da figura): *Open Reading Frames (ORFs)* na fita direta de DNA (CDS); *Open Reading Frames (ORFs)* na fita reversa de DNA (CDS); conteúdo GC (*GC content*) e variação no conteúdo GC entre as fitas de DNA (direta – *GC skew+* e reversa – *GC skew-*).

4.3.2. Genes relacionados à tolerância ao sal em *T. prosperus* DSM 14174

A análise do genoma de *T. prosperus* DSM 14174 revelou a presença de vários genes relacionados ao transporte e biossíntese de solutos compatíveis, tais como prolina, colina, glicina betaína e ectoína, moléculas cujo acúmulo intracelular está relacionado com a tolerância ao sal (Saum & Müller, 2007; Oren, 2008, DasSarma & DasSarma, 2015). A presença dos genes *proV*, *proW* e *opuAC* sugerem que a bactéria possui a capacidade de captar glicina betaína, colina e prolina do meio externo e acumular dentro da célula. Estes genes foram encontrados em sequência no genoma e indicam que a bactéria possui todos os requerimentos para captação destes solutos uma vez que o gene *proV* codifica uma proteína transportadora do tipo ABC dependente de ATP (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). O gene *proW* codifica uma proteína interna de membrana que se liga ao substrato, funcionando ainda como um osmossensor do citoplasma (Sleator & Hill, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2006) e o gene *opuAC* codifica uma proteína periplásmica externa que se liga aos solutos compatíveis (Kempf *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 2013). Estes genes, quando ativados, podem ajudar a bactéria a responder as flutuações na osmolaridade do meio. O *operon ectABC*, o qual codifica enzimas responsáveis pela biossíntese do soluto compatível ectoína, também foi encontrado no genoma de *T. prosperus* DSM 14174. A presença deste *operon* pode representar uma vantagem para *T. prosperus* quando ocorrem flutuações na osmolaridade no meio uma vez que a ectoína pode ser sintetizada rapidamente a partir do aminoácido aspartato, por exemplo (Reshetnikov *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2004).

O gene *ompC*, o qual codifica uma proteína de membrana externa com capacidade de transportar solutos compatíveis (Kempf & Bremer, 1998), também foi encontrado no genoma de *T. prosperus* DSM 14174. A sequência de aminoácidos da proteína OmpC de *T. prosperus* é semelhante à de *E. coli*, sendo que nesta bactéria o gene *ompC* é regulado por *enzV/ompR* (Weber *et al.*, 2006; Angeles *et al.*, 2013). Os genes reguladores *enzV* e *ompR* também foram encontrados no genoma de *T. prosperus* DSM 14174. Foi observado um aumento nos níveis de expressão do gene *ompC* na presença de estresse salino e em pH ácido em *E. coli* (Kaeriyama *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). Um aumento nos níveis de expressão do gene *ompC* também foi observado na presença de outros tipos de estresse, tais como: aumento de temperatura e variações na disponibilidade de carbono e oxigênio (Sleator & Hill, 2006). Os vários genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese e transporte de solutos compatíveis, encontrados no genoma de *T. prosperus* DSM 14174, são compatíveis com a capacidade da bactéria de tolerar altas concentrações de sal.

Outros genes que codificam proteínas de membrana envolvidas na tolerância ao sal também foram encontrados no genoma de *T. prosperus* DSM 14174. Um destes genes é o *mscS* o qual codifica uma proteína com propriedades mecanossensitivas, responsável pelo efluxo de água e alguns solutos do citoplasma para o meio externo (Naismith & Booth, 2012). Foi observado que esta proteína desempenhou um papel importante na presença de variações na pressão osmótica externa em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Erwinia* e outras (Booth & Blount, 2012; Naismith & Booth, 2012; Booth *et al.*, 2015; Wood, 2015).

O gene *yggT* que em *E. coli* codifica uma proteína de membrana envolvida na tolerância ao estresse osmótico causado por NaCl ou manitol (Ito *et al.*, 2009) também foi encontrado em *T. prosperus* DSM 14174. Foi observado que tanto em *Halobacillus halophilus* quanto em *E. coli* a proteína codificada por *yggT* induziu a biossíntese do aminoácido glutamato, que é um mensageiro secundário da biossíntese de osmoprotetores (Saum & Miller, 2008; Ito *et al.*, 2009). Outro gene envolvido na tolerância ao sal encontrado em *T. prosperus* DSM 14174 foi o gene *clc*. Este gene codifica uma proteína de membrana envolvida na troca de íons H^+ e Cl^- em bactérias (Iyer *et al.*, 2002). As proteínas da família CLC foram encontradas em várias bactérias incluindo *E. coli* e bactérias dos gêneros *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Salmonella*, sendo que nessas bactérias, a contribuição mais importante da proteína é na tolerância a pH baixos (Iyer *et al.*, 2002; Martinac *et al.*, 2008). Já em *T. prosperus* DSM 14174 é possível que esta proteína (canal de troca iônica) possua relevância na manutenção da homeostase celular, já que a bactéria requer íons cloreto no crescimento (Nicolle *et al.*, 2009). Uma vez que *T. prosperus* cresce em pH baixo (Huber & Stetter, 1989; Davis-Belmar *et al.*, 2008; Nicolle *et al.*, 2009), pode-se sugerir que esta proteína também possa proteger a bactéria contra os efeitos nocivos do excesso de H^+ intracelular (Baker-Austin & Dopson, 2007).

No genoma de *T. prosperus* DSM 14174 e DSM 5130 (renomeada como *A. prosperus* DSM 5130, Cárdenas *et al.* 2015) foram encontrados genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de íons K^+ , tais como os genes *kup* e *kef*, que não são encontrados no genoma de outras bactérias da família Ectothiorhodospiraceae. Em bactérias acidófilas como *T. prosperus* o acúmulo de íons K^+ é importante para a manutenção do potencial da membrana para geração de energia (Baker-Austin & Dopson, 2007; Slonczewski *et al.*, 2009). Foram encontrados também no genoma de *T. prosperus* DSM 14174 os genes *trkA* e *trkH* que codificam a proteína Trk envolvida no transporte e acúmulo de K^+ (Kraegeloh *et al.*, 2005; Corratgé-Faillie *et al.*, 2010). Foi sugerido para algumas bactérias que o acúmulo

intracelular de K⁺ funciona como uma estratégia de adaptação ao sal (Krageloh *et al.*, 2005; Mongodim *et al.*, 2005; Saum & Müller, 2008; Su *et al.*, 2009).

4.3.3. Análise filogenética e filogenômica de *T. prosperus* DSM 14174

A análise filogenética utilizando o gene de rRNA 16S e a análise filogenômica utilizando as sequências das proteínas marcadoras (Figura 4.2 e Figura 4.3) mostraram que *T. prosperus* DSM 14174 pertence a família Ectothiorhodospiraceae assim como *T. prosperus* DSM 5130 que foi recentemente reclassificada e renomeada como *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130 (Cárdenas *et al.*, 2015). Nas duas árvores (Figura 4.2 e Figura 4.3), *T. prosperus* DSM 14174 mostrou alta similaridade com *A. prosperus* DSM 5130 sugerindo que ambas pertencem ao gênero *Acidihalobacter*. Para verificar se as duas bactérias pertencem à mesma espécie foi feita a análise da Identidade Média de Nucleotídeos (*Average Nucleotide Identity* – ANI; Richter & Rosselló-Móra, 2009) e o valor resultante foi 86,18%. Este valor está abaixo do recomendado (95 a 96% de similaridade) para bactérias da mesma espécie (Kim *et al.*, 2014). Os resultados sugerem assim que a bactéria *T. prosperus* DSM 14174 pertence ao gênero *Acidihalobacter*, contudo, ela não pertence a espécie *Acidihalobacter prosperus*.

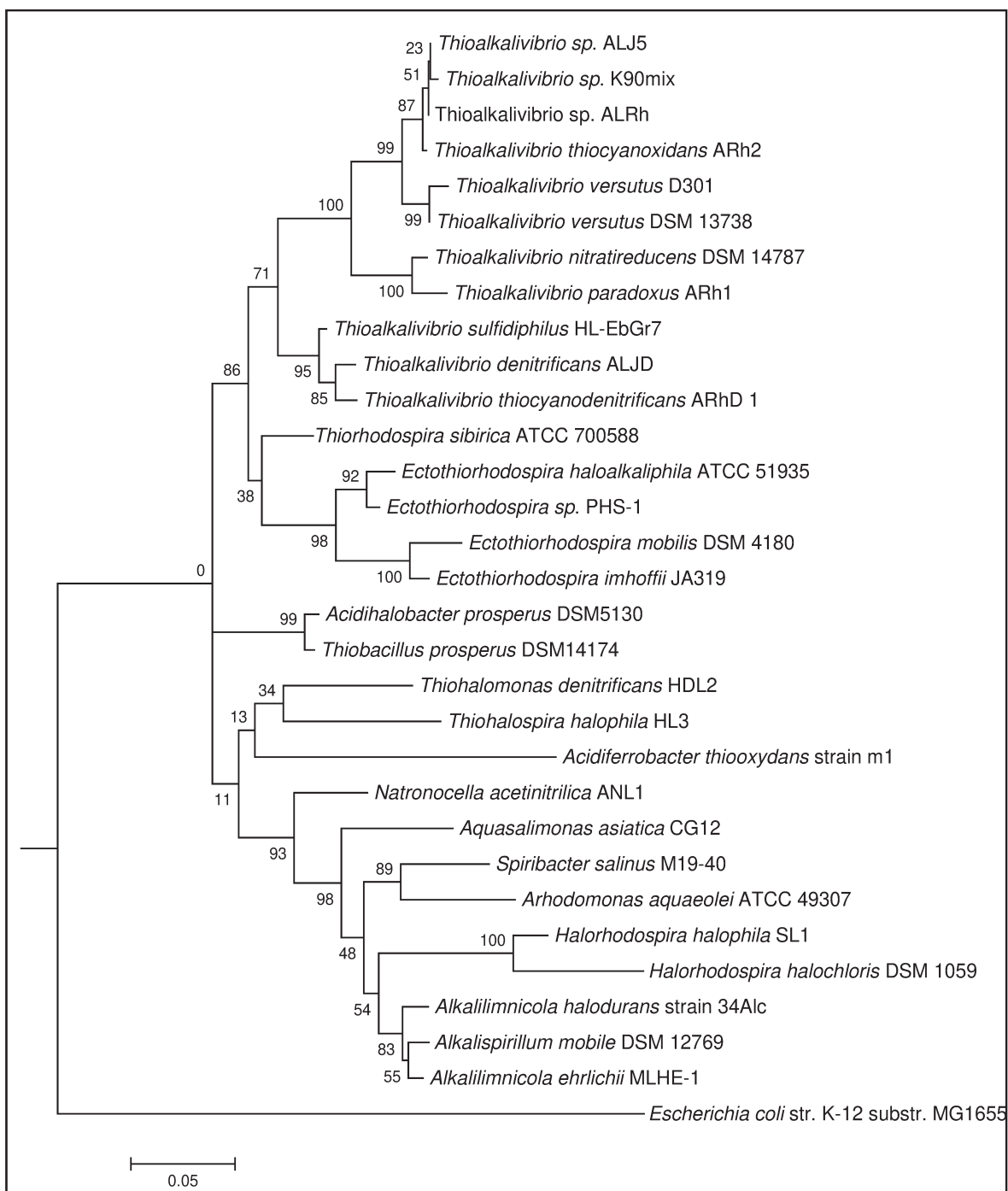


Figura 4.2. Árvore filogenética baseada nas sequências do gene de rRNA 16S de bactérias da família Ectothiorhodospiraceae. As sequências foram obtidas dos bancos de dados SILVA, RDP e NCBI e alinhadas com o algoritmo *ClustalW*. A árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA – versão 5.2, utilizando o método de Máxima Verossimilhança com o modelo Tamura-Nei três-parâmetros. A confiabilidade da árvore filogenética foi testada por reamostragem com 1.000 replicatas.

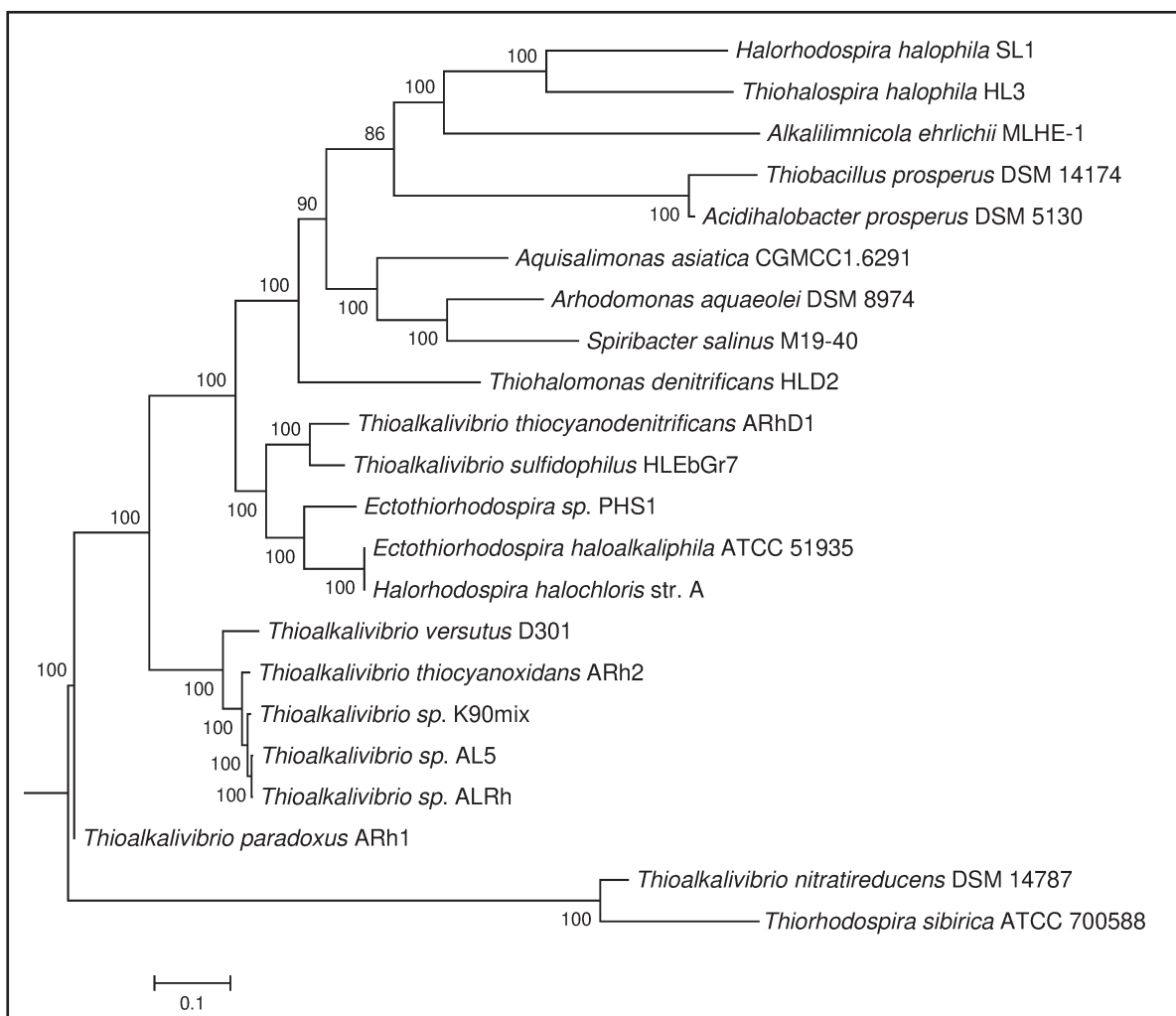


Figura 4.3. Árvore filogenômica baseada nas sequências dos 31 genes marcadores de bactérias da família Ectothiorhodospiraceae, obtidos através do software AMPHORA 2. A árvore filogenômica foi gerada com o programa MEGA – versão 5.2, utilizando o método de Máxima Verossimilhança com o Modelo JTT, levando em conta as frequências de valores gama discretos e de aminoácidos (+G+F). A confiabilidade da árvore filogenômica foi testada por reamostragem com 1.000 replicatas.

4.4. CONCLUSÕES

O sequenciamento do genoma de *Thiobacillus prosperus* DSM 14174 forneceu novas informações sobre vias metabólicas e mecanismos responsáveis pela osmorregulação e sobrevivência de bactérias acidófilas que crescem em ambientes com alta salinidade. As análises filogenômica e de filogenia mostraram que *T. prosperus* DSM 14174 deve ser reclassificada no gênero *Acidihalobacter*, dentro da família Ectothiorhodospiraceae. Esta bactéria não pertence à mesma espécie de *A. prosperus* DSM 5130.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angeles, A.; Chang, T.; Coombe, L. & Rogers, T. (2013). Regulation of osmotic stress by OmpC but not OmpF increases kanamycin resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 17:73-77.

Aziz, R. K.; Bartels, D.; Best, A. A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Osterman, A. L.; Overbeek, R. A.; McNeil, L. K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A. & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9:75, doi: 10.1186/1471-2164-9-75.

Baker-Austin, C. & Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 15(4):165-171.

Banciu, H. L. & Muntyan, M. S. (2015). Adaptive strategies in the double-extremophilic prokaryotes inhabiting soda lakes. *Current Opinion in Microbiology*, 25:73-79.

Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A. A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A. S.; Lesin, V. M.; Nikolenko, S. I.; Pham, S.; Prjibelski, A. D.; Pyshkin, A. V.; Sirotkin, A. V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M. A. & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5):455–477.

Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Clark, K.; Lipman, D. J.; Ostell, J. & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 40(Database Issue):D48-D53.

Booth, I. R. & Blount, P. (2012). The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves. *Journal of Bacteriology*, 194(18):4802-4809.

Booth, I. R.; Miller, S.; Müller, A. & Lehtovirta-Morley, L. (2015). The evolution of bacterial mechanosensitive channels. *Cell Calcium*, 57(3):140-150.

Bowers, K. J.; Mesbah, N. M. & Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: Does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5:9, doi: 10.1186/1746-1448-5-9.

Calderón, M. I.; Vargas, C.; Rojo, F.; Iglesias-Guerra, F.; Csonka, L. N.; Ventosa, A. & Nietto, J. J. (2004). Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology*, 150(Pt 9):3051-3063.

Cárdenas, J. P.; Ortiz, R.; Norris, P. R.; Watkin, E. & Holmes, D. S. (2015). Reclassification of “*Thiobacillus prosperus*” Huber and Stetter 1989 as *Acidihalobacter prosperus* gen. nov., sp. Nov., a member of the family *Ectothiorhodospiraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10):3641-3644.

Cole, J. R.; Wang, Q.; Fish, J. A.; Chai, B.; McGarrel, D. M.; Sun, Y.; Brown, C. T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C. R. & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue):D633-D642.

Contreras-Moreira, B. & Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24):7696-7701.

Corratgé-Faillie, C.; Jabnoute, M.; Zimmermann, S.; Véry, A. A.; Fizames, C. & Sentenac, H. (2010). Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(15):2511-2532.

DasSarma, S. & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25:120-126.

Davis-Belmar, C. S.; Nicolle, J. L. C. & Norris, P. R. (2008). Ferrous iron oxidation and leaching of copper ore with halotolerant bacteria in ore columns. *Hydrometallurgy*, 94(1-4):144-147.

Delcher, A. L.; Harmon, D.; Kasif, S.; White, O. & Salzberg, S. L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Research*, 27(23):4636–4641.

Galinski, E. A. (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experimentia*, 49(6):487-496.

Grant, J. R. & Stothard, P. (2008). The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue):W181-W184.

Hoffman, T.; Wensing, A.; Brosius, M.; Steil, L.; Völker, U. & Bremer, E. (2013). Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *Journal of Bacteriology*, 195(3):510-522.

Huber, H. & Stetter, K. O. (1989). *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Archives of Microbiology*, 151(6):479-485.

Ito, T.; Uozumi, N.; Nakamura, T.; Takayama, S.; Matsuda, N.; Aiba, H.; Hemmi, H. & Yoshimura, T. (2009). The implication of YggT of *Escherichia coli* in osmotic regulation. *Biosciences Biotechnology Research*, 73(12):2698-2704.

Iyer, R.; Iverson, T. M.; Accardi, A. & Miller, C. (2002). A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature*, 419(6908):715-718.

Kaeriyama, M.; Machida, K.; Kitakaze, A.; Wang, H.; Lao, Q.; Fukamachi, T.; Saito, H. & Kobayashi, H. (2006). OmpC and OmpF are required for growth under hyperosmotic stress above pH 8 in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(3):195-201.

Kempf, B.; Gade, J. & Bremer, E. (1997). Lipoprotein from the osmoregulated ABC transport system OpuA of *Bacillus subtilis*: purification of the glycine betaine binding protein and characterization of a functional lipidless mutant. *Journal of Bacteriology*, 179(20):6213-6220.

Kempf, B. & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5):319-330.

Kerepesi, C.; Bánky, D. & Grolmusz, V. (2014). AmphoraNet: The webserver implementation of the AMPHORA2 metagenomic workflow suite. *Gene*, 533(2):538-540.

Kim, M.; Oh, H. S.; Park, S. C. & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2):346-351. * Erratum in: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(5):1825.

Kraegeloh, A.; Amendt, B. & Kunte, H. J. (2005). Potassium transport in a halophilic member of the Bacteria domain: identification and characterization of the K⁺ uptake systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *Journal of Bacteriology*, 187(3):1036-1043.

Marçais, G. & Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27(6):764–770.

Markowitz, V. M.; Chen, I. A.; Palaniappan, K.; Chu, K.; Szeto, E.; Grechkin, Y.; Ratner, A.; Jacob, B.; Huang, J.; Williams, P.; Huntemann, M.; Anderson, I.; Mavromatis, K.; Ivanova, N. N. & Krypides, N. C. (2012). IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research*, 40(Database Issue):D115-D122.

Martinac, B.; Saimi, Y. & Kung, C. (2008). Ion channels in microbes. *Physiology Reviews*, 88(4):1449-1490.

Mongodin, E.F.; Nelson, K.E.; Daugherty, S.; Deboy, R.T.; Wister, J.; Khouri, H.; Weidman, J.; Walsh, D.A.; Papke, R.T.; Sanchez Perez, G.; Sharma, A.K.; Nesbø, C.L.; MacLeod, D.; Baptiste, E.; Doolittle, W.F.; Charlebois, R.L.; Legault, B. & Rodriguez-Valera, F. (2005). The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 102(50):18147-18152.

Mukhopadhyay, A.; He, Z.; Alm, E. J.; Arkin, A. P.; Baidoo, E. E.; Borglin, S. C.; Chen, W.; Hazen, T. C.; He, Q.; Holman, H. Y.; Huang, K.; Huang, R.; Joyner, D. C.; Katz, N.; Keller, M.; Oeller, P.; Redding, A.; Sun, J.; Wall, J.; Wei, J.; Yang, Z.; Yen, H. C.; Zhou, J. &

- Keasling, J. D. (2006). Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: an integrated genomics approach. *Journal of Bacteriology*, 188(11):4068-4078.
- Naismith, J. H. & Booth, I. R. (2012). Bacterial mechanosensitive channels—MscS: evolution's solution to creating sensitivity in function. *Annual Review of Biophysics*, 41:157-177.
- Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic *Thiobacillus prosperus*. *Microbiology*, 155(4):1302-1309.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:2, doi: 10.1186/1746-1448-4-2.
- Ossadron, F. J.; Cárdenas, J. P.; Corbett, M.; Quatrini, R.; Holmes, D. S. & Watkin, E. (2014). Draft genome sequence of the iron-oxidizing, acidophilic, and halotolerant *Thiobacillus prosperus* type strain DSM 5130. *Genome Announcements*, 2(5):e01042-14, doi: 10.1128/genomeA.01042-14.
- Patel, R. K. & Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One*, 7(2):e30619, doi: 10.1371/journal.pone.0030619.
- Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J. & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue):D590-D596.
- Reshetnikov, A. S.; Khmelenina, V. N. & Trotsenko, Y. A. (2006). Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph *Methylobaculum alcaliphilum* 20Z. *Archives of Microbiology*, 184(5):286-297.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 106(45): 19126–19131

- Saum, S. H. & Müller, V. (2008). Regulation of osmoadaptation in the moderate halophile *Halobacillus halophilus*: chloride, glutamate and switching osmolyte strategies. *Saline Systems*, 4:4, doi: 10.1186/1746-1448-4-4.
- Sleator, R. D. & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1):49-71.
- Slonczewski, J. L.; Fujisawa, M.; Dopson, M. & Krulwich, T. A. (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*, 55:1-79, 317.
- Simmons, S. & Norris, P. (2002). Acidophiles of saline water at thermal vents of Vulcano, Italy. *Extremophiles*, 6(3):201-207.
- Sorokin, D. Y.; Berben, T.; Melton, E. D.; Overmars, L.; Vavourakis, C. D. & Muyzer, G. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, 18(5):791-809.
- Su, J.; Gong, H.; Lai, J.; Main, A. & Lu, S. (2009). The potassium transporter Trk and external potassium modulate *Salmonella enterica* protein secretion and virulence. *Infection and Immunity*, 77(2):667-675.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):2731-2739.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22):4673-4680.
- Tsai, I. J.; Otto, T. D. & Berriman, M. (2010). Improving draft assemblies by iterative mapping and assembly of short reads to eliminate gaps. *Genome Biology*, 11(4):R41, doi: 10.1186/gb-2010-11-4-r41.

Weber, A.; Kögl, S. A. & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(20):7165-7175.

Wood, J. M. (2015). Bacterial responses to osmotic challenges. *The Journal of General Physiology*, 145(5):381-388.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados mostraram que os efeitos do NaCl nas células de *A. ferrooxidans* puderam ser identificados por diferentes técnicas e afetaram diversos processos celulares. As análises de espectroscopia RAMAN revelaram que a membrana das células de *A. ferrooxidans* apresentou alterações na sua composição, seja por curtos ou longos períodos de exposição ao NaCl. Essas alterações foram corroboradas pela expressão diferencial de genes e proteínas, conforme observado nos experimentos de proteoma e transcriptoma. Os dados sugerem que as alterações na composição da membrana das células de *A. ferrooxidans* resultaram na diminuição da permeabilidade e no aumento da rigidez, formando uma barreira contra a entrada de íons cloreto no citoplasma. Além disso, foi observada a expressão de proteínas diretamente envolvidas no efluxo dos íons cloreto da célula.

Os efeitos negativos do NaCl nas células resultaram na diminuição da expressão de genes e proteínas relacionados à produção de energia, ao crescimento e à divisão celular. Em contrapartida, as células apresentaram um aumento na expressão de genes e proteínas envolvidos na resposta ao estresse. Isto mostra que o NaCl pode ter afetado o metabolismo de *A. ferrooxidans* de maneira geral, obrigando a célula a direcionar a produção de energia para a manutenção da homeostase celular e sobrevivência.

O sequenciamento do genoma da linhagem DSM 14174 da bactéria tolerante ao sal, *Thiobacillus prosperus*, mostrou que esta bactéria possui vários genes que permitem o seu crescimento em altas concentrações de sal. Foram encontrados genes que codificam proteínas relacionadas à biossíntese e transporte de solutos compatíveis e íons, proteínas com funções mecanossensitivas e sinalizadoras de estresse osmótico. Os estudos filogenéticos e filogenômicos mostraram que a bactéria *Thiobacillus prosperus* DSM 14174 pertence ao mesmo gênero da recém reclassificada *Acidihalobacter prosperus* DSM 5130 não pertencendo, porém, à mesma espécie. O estudo de propriedades halotolerantes em bactérias acidófilas pode auxiliar no aumento da eficiência da biolixiviação em ambientes com alta salinidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B.; Leach, S. & Ingledew, W. J. (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology*, 133:1171-1179.
- Appia-Ayme, C.; Quatrini, R.; Denis, Y.; Denizot, F.; Silver, S.; Roberto, F.; Veloso, Valdés, J.; Cárdenas, J. P.; Esparza, M.; Orellana, O.; Jedlicki, E.; Bonnefoy, V. & Holmes, D. S. (2006). Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 83(1-4):273-280.
- Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1):1-20.
- Bevilaqua, D.; Lathi, H.; Suegama, P. H.; Garcia Jr, O.; Bendetti, A. V.; Puhakka, J. A. & Touvinen, O. H. (2013). Effect of Na-chloride on the bioleaching of a chalcopyrite concentrate in shake flasks and stirred tank bioreactors. *Hydrometallurgy*, 138:1-13.
- Bougouffa, S.; Rodovanovic, A.; Essak, M. & Bajic, V. B. (2014). DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation (Oxford)*, 1-13, doi:10.1093/database/bau100.
- Brock, T. D. (1975). Effect of water potential on growth and iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology*, 29(4):495-501.
- Cabrera, G.; Gómez, J. M. & Cantero, D. (2005). Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3):301-306.
- Cárdenas, J. P.; Ortiz, R.; Norris, P. R.; Watkin, E. & Holmes, D. S. (2015). Reclassification of '*Thiobacillus prosperus*' Huber and Stetter 1989 as *Acidihalobacter prosperus* gen. nov.,

sp. nov., a member of the family *Ectothiorhodospiraceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10):3641-3644.

Courtenay, E. S.; Capp, M. W.; Anderson, C. F. & Record Jr, M. T. (2000). Vapor pressure osmometry studies of osmolyte-protein interactions: implications for the action of osmoprotectants in vivo and for the interpretation of “osmotic stress” experiments in vitro. *Biochemistry*, 39(15):4455-4471.

DasSarma, P.; Cocker, J. A.; Huse, V. & DasSarma, S. (2010). Halophiles, industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1-43, doi:10.1002/9780470054581.eib439.

Davis-Belmar, C. S.; Nicolle, J. L. C. & Norris, P. R. (2008). Ferrous iron oxidation and leaching of copper ore with halotolerant bacteria in ore columns. *Hydrometallurgy*, 94(1-4):144-147.

De, G. C.; Oliver, D. J. & Pesic, B. M. (1997). Effect of heavy metals on the ferrous ion oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 44(1-2):53-63.

Dopson, M. & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(10):2620-2631.

Empadinhas, N. & da Costa, M. S. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11(3):151-161.

Gahan, C. S.; Sundkvist, J. E.; Dopson, M. & Sandström, A. (2010). Effect of chloride on ferrous iron oxidation by a *Leptospirillum ferriphilum*-dominated chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3):422-431.

Gargarello, R. M.; Di Gregorio, D.; Huck, H.; Fernandez Niello, J. & Curutchet, G. (2010). Reduction of uranium(VI) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 104(3-4):529-532.

Heinhorst, S.; Baker, S. H.; Johnson, D. R.; Davies, P. S.; Cannon, G. C. & Shively, J. M. (2002). Two copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Current Microbiology*, 45(2):115-117.

Holuigue, L.; Herrera, L.; Phillips, O. M.; Young, M. & Allende, J. E. (1987). CO₂ fixation by mineral-leaching bacteria: characteristics of the ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9(6):497–505.

Huber, H. & Stetter, K. O. (1989). *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal-mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field. *Archives of Microbiology*, 151(6):479-485.

Hutchins, S. R.; Davidson, M. S.; Brierley, J. A. & Brierley, C. L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, 40:331-336.

Johnson, D. B. (2014). Biomining - biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30:24-31.

Kelly, D. P.; Wood, A. P. & Stackebrandt, E. (2005). Genus II. *Thiobacillus*. Beijerinck, p.764-769. In G. M. Garrity (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2° ed., v.2, parte C. Springer, New York, N.Y.

Ko, M. S.; Park, H. S.; Kim, K. W. & Lee, J. U. (2013). The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in arsenic bioleaching from soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 35(6):727-733.

Krämer, R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: response to osmotic stress. *The Chemical Record*, 10(4):217-229.

Lawson, E. N.; Nicholas, C. J. & Pellat, H. (1995). The toxic effects of chloride ions on *Thiobacillus ferrooxidans*. In: *Biohydrometallurgy Processing*, Universidad de Chile, p.165-174.

Leduc, L. G. & Ferroni, G. D. (1994). The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2):103-119.

Leduc, L. G.; Ferroni, G. D. & Trevors, J. T. (1997). Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4):453-455.

Liang, C.; Xia, J.; Nie, Z. & Yu, S. B. (2014). Effect of initial pH on chalcopyrite oxidation dissolution in the presence of extreme thermophile *Acidianus manzaensis*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 24(6):1890-1897.

Lombardi, A. T. & Garcia Jr, O. (1999). An evaluation into the potential of biological processing for the removal of metals from sewage sludges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(4):275-288.

McLaggan, D.; Keyhan, M. & Matin, A. (1990). Chloride transport pathways and their bioenergetic implications in the obligate acidophile *Bacillus coagulans*. *Journal of Bacteriology*, 172(3):1485-1490.

Meyer, B.; Imhoff, J. F. & Kuever, J. (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environmental Microbiology*, 9(12):2957-2977.

Mishra, D.; Kim, D. J.; Ahn, J. G. & Rhee, Y. H. (2005). Bioleaching: a microbial process of metal leaching: a review. *Metals and Materials International*, 11(3):249-256.

Morbach, S. & Krämer, R. (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochemistry*, 3(5):384-397.

Natarajan, K. A. (2008). Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18(6):1352-1360.

Navarro, C. A.; von Bernath, D. & Jerez, C. A. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biological Research*, 46(4):363-371.

Nicolle, J. L. C.; Simmons, S.; Bathe, S. & Norris, P. R. (2009). Ferrous iron oxidation and rusticyanin in halotolerant, acidophilic ‘*Thiobacillus prosperus*’. *Microbiology*, 155(Pt4):1302-1309.

Norris, P. R. & Simmons, S. In: Tsezos, M.; Hatzikioseyan, A. & Remoundaki, E., (Eds.) (2004). Proceedings of the 15th International Biohydrometallurgy Symposium, Athens, Greece, National Technical University of Athens, pp.1347–1351.

Ohmura, N.; Sasaki, K.; Matsumoto, N. & Saiki, H. (2002). Anaerobic respiration using Fe^{3+} , S^0 , and H_2 in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 184(8):2081-2087.

Olson, G. J.; Brierley, J. A. & Brierley, C. L. (2003). Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the mineral industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3):249-257.

Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4:2, doi:10.1186/1746-1448-4-2.

Osorio, H.; Mangold, S.; Denis, Y.; Ñancucheo, I.; Esparza, M.; Johnson, D. B.; Bonnefoy, V.; Dopson, M. & Holmes, D. S. (2013). Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology*, 79(7):2172-2181.

Ossadron, F. J.; Cárdenas, J. P.; Corbett, M.; Quatrini, R.; Holmes, D. S. & Watkin, E. (2014). Draft genome sequence of the iron-oxidizing, acidophilic, and halotolerant “*Thiobacillus prosperus*” type strain DSM 5130. *Genome Announcements*, 2(5):e01042-14, doi:10.1128/genomeA.01042-14.

Pan, J.; Wang, J.; Zhou, Z.; Yan, Y.; Zhang, W.; Lu, W.; Ping, S.; Dai, Q.; Yuan, M.; Feng, B.; Hou, X.; Zhang, Y.; Ma, R.; Lui, T.; Feng, L.; Wang, L.; Chen, M. & Lin, M. (2009). IrrE, a global regulator of extreme radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*, enhances salt tolerance in *Escherichia coli* and *Brassica napus*. *PLoS One*, 4(2): e4422, doi:10.1371/journal.pone.0004422.

Paul, D. (2013). Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 53(2):101–110.

Quatrini, R.; Appia-Ayme, C.; Denis, Y.; Jedlicki, E.; Holmes, D. S. & Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, 10:394, doi:10.1186/1471-2164-10-394.

Rawlings, D. E. & Kusano, T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology Reviews*, 58(1):39-55.

Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology*, 56:65-91.

Rawlings, D. E. (2005). Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 4:13, doi:10.1186/1475-2859-4-13.

Rawlings, D. E. & Johnson, D. B. (2007). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153(Pt2):315-324.

Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1:5, doi:10.1186/1746-1448-1-5.

Roesser, M. & Müller, V. (2001). Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environmental Microbiology*, 3(12):743-754.

- Sakamoto, A. & Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51(342):81-88.
- Shiers, D. W.; Blight, K. R. & Ralph, D. E. (2005). Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 80(1-2):75–82.
- Schippers, A.; Heidrich, S.; Vasters, J.; Drobe, M.; Sand, W. & Willscher, S. (2014). Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. *Geobiotechnology I: in Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer, Berlin Heidelberg, 141:1–47.
- Simmons, S. & Norris, P. (2002). Acidophiles of saline water at thermal vents of Vulcano, Italy. *Extremophiles*, 6(3):201-207.
- Sleator, R. D.; Gahan, C. G. & Hill, C. (2001). Identification and disruption of the *proA* locus in *Lysteria monocytogenes*: role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6):2571-2577.
- Valdés, J.; Veloso, F.; Jedlicki, E. & Holmes, D. S. (2003). Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics*, 4(1):51, doi: 10.1186/1471-2164-4-51.
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R 2nd.; Eisen, J. A. & Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9:597, doi: 10.1186/1471-2164-9-597.
- Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini R. & Holmes, D. S. (2008b). Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and their ecophysiology. *Hydrometallurgy*, 94(1-4):180-184.
- Wang, Y.; Su, L.; Zhang, L.; Zheng, W.; Wu, J.; Wan, L.; Qiu, G.; Chen, X. & Zhou, H. (2012). Bioleaching of chalcopyrite by defined mixed moderately thermophilic consortium including a marine acidophilic halotolerant bacterium. *Bioresource Technology*, 121:348-354.

Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2):81-108.

Watling, H. R. (2015). Review of biohydrometallurgical metals extraction from polymetallic mineral resources. *Minerals*, 5(1):1-60.

Weber, H.; Polen, T.; Heuveling, J.; Wendisch, V. F. & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma-S dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, 187(5):1591-1603.

Xiong, H. X.; Liao, Y. H.; Zhou, L. X.; Xu, Y. Q. & Wang, S. M. (2008). Biosynthesis of nanocrystal akaganéite from FeCl₂ solution oxidized by *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. *Environmental Science and Technology*, 42(11):4165-69.

Xiong, H. & Guo, R. (2011). Effects of chloride acclimation on iron oxyhydroxides and cell morphology during cultivation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Environmental Science and Technology*, 45(1):235-240.

Zahran, H. H. (1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils*, 25(3):221-223.

Zammit, C. M.; Mutch, L. A.; Watling, H. R. & Watkin, E. L. J. (2009). The characterization of salt tolerance in biomining microorganisms and the search for novel salt tolerant strains. *Advanced Materials Research*, 71-73:283-286.

Zammit, C. M.; Mangold, S.; rao Jonna, V.; Mutch, L. A.; Watling, H. R.; Dopson, M. & Watking, E. L. J. (2012). Bioleaching in brackish waters - effect of chloride ions on the acidophile population and proteomes of model species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1):319-329.



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Análise das bases moleculares da tolerância ao íon cloreto em bactérias acidófilas utilizadas em biolixiviação*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Thiago Miranda da Silva
Nome do(a) aluno(a): Thiago Miranda da Silva

Assinatura: Laura m. m. Ottoboni
Nome do(a) orientador(a): Laura Maria Mariscal Ottoboni

Data: 20/05/2016.

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Análise das bases moleculares da tolerância ao íon cloreto em bactérias acidófilas utilizadas em biolixiviação"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20/05/2016.

Assinatura : Thiago Miranda da Silva

Nome do(a) autor(a): **Thiago Miranda da Silva**

RG n.º MG-14.191.297

Assinatura : Laura m. m. Ottoboni

Nome do(a) orientador(a): **Laura Maria Mariscal Ottoboni**

RG n.º 68554965