

# ANÁLISE FISIOLÓGICA DE MUTANTES DE *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* LR OBTIDOS POR RADIÇÃO ULTRAVIOLETA

A. E. C. Augusto, A. P. Felício, O. Garcia Junior  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química  
Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP  
Rua: Prof. Francisco Degni, s/n, Quitandinha – Araraquara, SP, 14.800-900  
e-mail: [anafelic@iq.unesp.br](mailto:anafelic@iq.unesp.br)

## RESUMO

Poucos trabalhos têm sido realizados objetivando um melhoramento do processo de lixiviação da calcopirita, pela manipulação genética da bactéria. Sendo assim, o presente trabalho teve como proposta analisar possíveis mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR selecionados por radiação ultravioleta (aproximadamente 250 nm), em relação à oxidação de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e a oxidação dessa mesma fonte energética na presença de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ , ativador do processo de oxidação da calcopirita). Os resultados obtidos mostraram que possíveis linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* LR oxidaram rapidamente os íons  $\text{Fe}^{2+}$ , em comparação com a linhagem selvagem. Uma das linhagens mutantes (*M-LR 4*) apresentou uma melhor capacidade oxidativa de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em relação a linhagem selvagem e os demais mutantes. Os resultados de oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de íons  $\text{Cl}^-$  mostraram um crescimento bacteriano do mutante *M-LR 4* na presença de  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  desses íons, diferentemente da linhagem selvagem no qual o crescimento celular foi inibido nessa condição. Com os resultados aqui apresentados, surge a possibilidade de testar a linhagem *M-LR 4* em experimentos de biolixiviação da calcopirita, já que essa oxidou rapidamente os íons  $\text{Fe}^{2+}$  e apresentou maior tolerância a  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$ , em relação à linhagem selvagem. Estudos de genética clássica, como a obtenção de linhagens mutantes através da incidência de radiação ultravioleta, poderão contribuir para o desenvolvimento de um sistema genético apropriado. Além do mais, os mutantes obtidos poderão ser uma alternativa para a biolixiviação da calcopirita.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*; radiação ultravioleta; mutantes; biolixiviação; calcopirita.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o desenvolvimento da atividade de mineração tende a esgotar os minerais fáceis de serem processados. Como consequência, tem-se observado minérios com teores cada vez mais baixos de metais de interesse econômico, além do aumento na complexidade das composições dos mesmos. Além disso, a preocupação com a proteção ambiental está crescendo, fazendo com que os custos da atividade de mineração e do processamento desses minérios aumentem.

Dessa forma, a Biohidrometalurgia apresenta a “Biolixiviação” como uma proposta alternativa, pois utiliza micro-organismos capazes de oxidar os sulfetos minerais, liberando, assim, os metais para serem recuperados através de processos químicos. Esses micro-organismos, principalmente bactérias aeróbicas e acidófilas, mobilizam a energia da oxidação de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e/ou compostos reduzidos de enxofre, bem como de sulfetos minerais, em benefício de seu metabolismo. O processo de oxidação dessas fontes energéticas permite a solubilização de metais de interesse comercial, encontrados em minérios de baixo teor e de sulfetos secundários (BRIERLEY, 1978; LUNDGREN; MALOUF, 1983).

Este processo de lixiviação biológica oferece várias vantagens, entre elas: os custos operacionais mais baixos, pois a exigência de energia é muito menor do que nos processos piro e hidrometalúrgico convencionais; a economia dos insumos utilizados (ácidos e agentes oxidantes), pois os micro-organismos produzem tais insumos a partir de substratos presentes no referido minério; baixo investimento de capital e baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações requeridas; reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação; não poluição atmosférica, pois não ocorre emissão de  $\text{SO}_2$ , responsável pela “chuva ácida”, como no processo pirometalúrgico (ACEVEDO; GENTINA, 1993).

Na Biohidrometalurgia, o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) gerado a partir da oxidação do íon  $\text{Fe}^{2+}$  é um poderoso agente oxidante responsável pela dissolução de sulfetos minerais, como aqueles que contêm íons de cobre, pois permite a oxidação de  $\text{Cu}^+$  para a forma mais solúvel  $\text{Cu}^{2+}$ . O metal na forma  $\text{Cu}^{2+}$  pode, então, ser recuperado por técnicas físico-químicas, incluindo extração por solvente. Dessa forma, cerca de 10 a 15% de todo o cobre mundial é recuperado por meio desse processo.

A calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) é o sulfeto de cobre mais abundante na natureza, porém é o mais refratário à dissolução química ou bacteriana. Dessa forma, existe um interesse significativo na busca por alternativas viáveis de processo para a solubilização eficiente da calcopirita, tanto por métodos convencionais como pelo processo biológico.

Diversos estudos vêm sendo realizados visando alcançar uma melhor cinética de oxidação no processo de lixiviação, como a eficiente solubilização da calcopirita, e destaca-se a utilização de meios contendo íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), visto que há uma aceleração nesse processo de oxidação (LU *et al.*, 2000; OLIVEIRA, 2009; MELO, 2010). A ação desses íons pode ser atribuída a dois fatores: à formação de uma camada de enxofre porosa, que favorece a difusão dos reagentes e também à formação de complexos solúveis com íons cobre.

A espécie mais utilizada no processo biotecnológico é o *A. ferrooxidans*. Essa bactéria, anteriormente denominada *Thiobacillus ferrooxidans* (KELLY; WOOD, 2000), é uma espécie não-patogênica, que se apresenta na forma de bastonetes Gram-negativos, aeróbia estrita e acidofílica

(cujo pH ótimo de crescimento está em torno de 2), e é encontrada na natureza em água ácida de minas e em outros ambientes ácidos (JOHNSON; HALLBERG, 2003).

É uma bactéria não esporulante (dimensões médias de 0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro por 1,0 a 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento), ocorrendo sozinha ou em pares, raramente em cadeias pequenas. Os bastonetes são

móveis, apresentam flagelo polar, sendo considerado um micro-organismo mesófilo, sendo 30°C a temperatura ótima de crescimento (HOLT, 1994).

Embora haja um razoável acúmulo de conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica do *A. ferrooxidans*, poucos trabalhos têm sido realizados objetivando um melhoramento do processo de lixiviação da calcopirita, pela manipulação genética da bactéria.

Alguns autores mostraram que mutantes de bactérias acidófilas, inclusive o *A. ferrooxidans*, selecionados por radiação ultravioleta, influenciaram positivamente processos biotecnológicos, como por exemplo, a biolixiviação de sulfetos minerais (GROUDREVA, GROUDEV, 1980; XU *et al.*, 2010).

A recuperação de metais de interesse econômico a partir de minérios de baixos teores, contendo, em particular, a calcopirita, poderá ser realizada em sistemas operacionais rigorosamente controlados, utilizando-se linhagens bacterianas de *A. ferrooxidans* melhoradas geneticamente (GARCIA; URENHA, 2001).

Assim, linhagens bacterianas de *A. ferrooxidans* que apresentem maiores taxas de oxidação da calcopirita ou que sejam resistentes a íons Cl<sup>-</sup> poderão e deverão ser utilizadas como importante alternativa para a biolixiviação desse sulfeto de cobre.

## 2. MATERIAIS E METODOLOGIA

A linhagem de *A. ferrooxidans* utilizada nesse trabalho foi a LR, isolada de efluente de lixiviação de minério de urânio de Lagoa Real-BA. Para a obtenção da suspensão celular usada nos experimentos foi utilizado o meio de cultura T&K [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, com pH corrigido para 1,8] (TUOVINEN, KELLY, 1973). O crescimento das possíveis linhagens mutantes (30°C e 150 rpm em mesa agitadora) foi monitorado pela oxidação de íons Fe<sup>2+</sup>, através da titulação com dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 0,017 mol.L<sup>-1</sup> em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (VOGEL, 1981).

Um volume da suspensão de *A. ferrooxidans* LR foi irradiado (Equipamento *Chromato-vue*, seleção “*short wave*”, aproximadamente 250 nm), nos tempos de 0, 10, 30, 60, 150, 300 e 600 segundos. Após radiação, analisou-se o crescimento bacteriano em meio líquido e meio sólido.

Uma das possíveis linhagens mutantes (*M-LR 4*) foi analisada quanto à oxidação dos íons Fe<sup>2+</sup> na presença de diferentes concentrações de NaCl (Concentrações testadas: 0, 100, 200, 400 e 500 mmol.L<sup>-1</sup>). Periodicamente, alíquotas foram retiradas para monitorar a oxidação de íons Fe<sup>2+</sup>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o experimento de radiação ultravioleta em meio líquido e sólido (resultados não mostrados), as possíveis colônias mutantes foram selecionadas após radiação ultravioleta por 30 segundos, as quais apresentaram um diâmetro maior quando comparadas aos da linhagem selvagem. Essas colônias foram denominadas aleatoriamente (Figura 1), e submetidas a posteriores análises fisiológicas, nas quais foram monitoradas quanto à oxidação de íons ferrosos, na ausência e presença de íons cloreto.

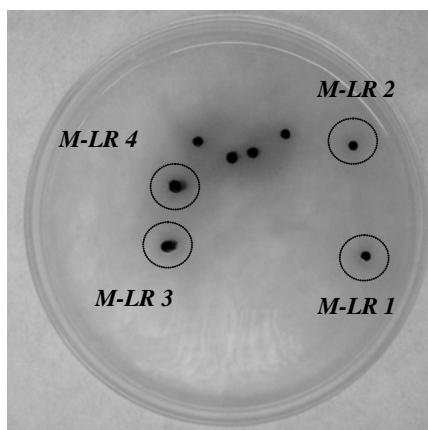


Figura 1. Possíveis colônias mutantes de *A. ferrooxidans* LR, selecionadas após 30 s de radiação ultravioleta, as quais foram submetidas a análises fisiológicas.

A análise da oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  mostrou que todas as possíveis linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* LR oxidaram essa fonte energética mais rapidamente em relação à linhagem selvagem (Figura 2). Possivelmente, a mutação no sistema genético bacteriano provocou alterações permanentes no que diz respeito à cadeia respiratória, o que envolve a oxidação da fonte energética, visto que esses resultados foram observados em experimentos independentes entre si.

A possível linhagem mutante M-LR 4 teve uma melhor capacidade de oxidar íons  $\text{Fe}^{2+}$  em relação as demais possíveis linhagens mutantes. A M-LR 4 oxidou totalmente os íons  $\text{Fe}^{2+}$  em, aproximadamente, 30 horas, enquanto que a linhagem selvagem, nas mesmas condições experimentais, oxidou essa fonte energética em cerca de 48 horas (Figura 2). Assim, essa linhagem foi analisada quanto à oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  na presença de diferentes concentrações de íons  $\text{Cl}^-$ .

Observou-se que as células bacterianas de M-LR 4, crescidas em íons  $\text{Fe}^{2+}$ , apresentaram aumento na fase *lag* de crescimento, na presença de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$  e mais acentuadamente na presença de  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  desse íon, em relação à linhagem selvagem (Figura 3). Esses íons mostraram um efeito inibitório no crescimento bacteriano em comparação à linhagem selvagem. Para as duas outras condições testadas ( $400$  e  $500 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$ ), a atividade bacteriana foi totalmente inibida (Figura 3).

Sabe-se que agentes aceleradores em processos de biolixiviação podem causar inibição da atividade bacteriana. Dessa forma, com os ensaios de oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  (fonte energética solúvel facilmente oxidada) na presença de diferentes concentrações de íons  $\text{Cl}^-$ , foi possível verificar a influência desses íons no crescimento da *A. ferrooxidans* M-LR 4.

Oliveira (2009) realizou um experimento similar mas apenas para a linhagem selvagem. Os resultados mostraram que não houve crescimento da *A. ferrooxidans* LR na presença de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e de  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$  (OLIVEIRA, 2009). Em comparação a Oliveira (2009), os resultados aqui apresentados, possivelmente, podem indicar uma mutação benéfica na linhagem M-LR 4, ou seja, uma possibilidade da espécie mutada apresentar maior resistência a  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$ , em relação a linhagem selvagem.

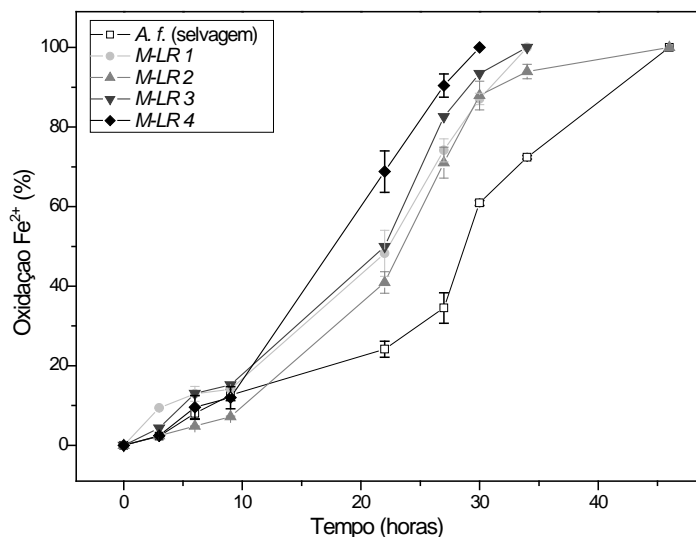


Figura 2. Porcentagem de oxidação de íons  $Fe^{2+}$  por células de *A. ferrooxidans* LR selvagem e possíveis mutantes. O experimento foi realizado em triplicata em experimentos independentes entre si.

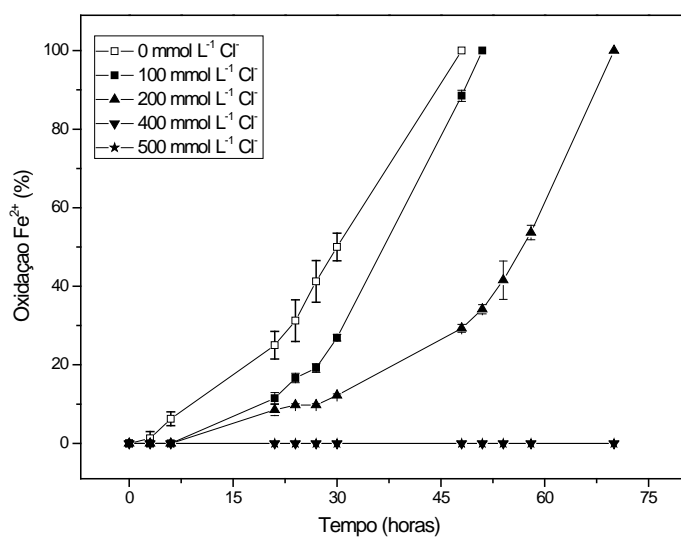


Figura 3. Porcentagem de oxidação de íons  $Fe^{2+}$  pelo possível mutante de *A. ferrooxidans* M-LR 4 na presença de diferentes concentrações de íons  $Cl^-$ . O experimento foi realizado em triplicata em experimentos independentes entre si.

A baixa tolerância de *A. ferrooxidans* a  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $Cl^-$  foi também observada em experimentos de biolixiviação da calcopirita (MELO, 2010). A autora observou em tais ensaios que a concentração de  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $Cl^-$  afetou, parcialmente, a biolixiviação da calcopirita e que na concentração de  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  desses íons a atividade oxidativa foi totalmente inibida.

#### 4. CONCLUSÕES

Pelas análises fisiológicas, notou-se que as possíveis linhagens mutantes selecionadas oxidaram, rapidamente, os íons  $\text{Fe}^{2+}$ , em comparação com a linhagem selvagem de *A. ferrooxidans*. A possível linhagem mutante *M-LR 4* teve uma melhor capacidade oxidativa de íons  $\text{Fe}^{2+}$  em relação as demais linhagens, sendo que esta oxidou totalmente esses íons em 30 horas, enquanto que a linhagem selvagem, por exemplo, oxidou essa fonte energética em aproximadamente 48 horas.

Os resultados de oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  pela possível linhagem mutante *M-LR 4* na presença de íons  $\text{Cl}^-$  mostraram que ocorreu crescimento bacteriano na presença de  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  desses íons, diferentemente da linhagem selvagem, de acordo com Oliveira (2009).

Com os resultados aqui apresentados, surge a possibilidade de testar a linhagem *M-LR 4* em experimentos de biolixiviação da calcopirita, já que essa linhagem apresentou maior tolerância a  $200 \text{ mmol.L}^{-1}$  de íons  $\text{Cl}^-$ , em relação à linhagem selvagem. Sendo assim, a presença de íons  $\text{Cl}^-$  e de uma linhagem mutante capaz de oxidar rapidamente íons  $\text{Fe}^{2+}$  pode ser uma importante estratégia a ser considerada na biolixiviação da calcopirita, sulfeto mineral refratário a oxidação química e bacteriana.

#### REFERÊNCIAS

ACEVEDO, F.; GENTINA, J.C. Bioleaching of minerals - a valid alternative for developing countries. *Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 115-123, 1993.

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

GARCIA Jr., O. ; URENHA, L. C. . Lixiviação bacteriana de minérios. In: Urgel de Almeida Lima; Eugênio Aquarone; W. Borzani; W. Schmidel. (Org.). *Biocnologia Industrial-Processos Fermentativos Industriais*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Editora, 2001, v. 3, p. 485-512.

GROUDEVA, V.; GROUDEV, S. In: Proc 12<sup>th</sup> October Meeting of Miner and Metallurgist, Bor (Yugoslavia), II, 1980, 354.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1994. p. 436.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, v. 154, p. 466-473, 2003.

KELLY, D. P.; WOOD, A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p. 511-516, 2000.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. *Hydrometallurgy*, v. 56, p. 189-202, 2000.

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

MELO, W. C. M. A. Biossolubilização da calcopirita na presença dos íons cloreto e ácidos orgânicos. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

OLIVEIRA, B. R. Estudos da oxidação da calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

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

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

XU, A-L.; XIA, J-L.; ZHANG, S.; YANG, Y-U; NIE, Z-Y.; QIU, G-Z. Bioleaching of chalcopyrite by UV-induced mutagenized *Acidiphilium cryptum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Transactions of Nonferrous Metal Society of China, v. 20, p. 315-321, 2010.