UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INDUÇÃO DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* E SELEÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES PARA UTILIZAÇÃO NA BIOHIDROMETALURGIA

ROBSON CAETANO ALVES

Dissertação de Mestrado
2010

Instituto de Química

Robson Caetano Alves

INDUÇÃO DE A*cidithiobacillus ferrooxidans* E SELEÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES PARA UTILIZAÇÃO NA BIOHIDROMETALURGIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Garcia Junior
Co-orientadora: Dra. Ana Paula Felício Novello

Araraquara-SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

A474i

Alves, Robson Caetano
Indução de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e seleção de linhagens mutantes para utilização na biohidrometalurgia / Robson Caetano Alves. – Araraquara : [s.n], 2010
65 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Oswaldo Garcia Junior
Coorientador: Ana Paula Felicio Novello

1. Biotecnologia. 2. Biolixiviação. 3. Radiação ultravioleta. 4. Sulfeto mineral. I. Título.

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

DADOS CURRICULARES

ROBSON CAETANO ALVES

1. Dados Pessoais

Nascimento: 15 de janeiro de 1979

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo-SP

Filiação: Dermeval Alves
Elisabete Caetano Alves

Estado civil: Casado

Profissão: Biólogo

Documento de identidade: 28479857-5 SSP/SP

Cadastro de Pessoa Física: 215.499.358-36

Endereço: Av Luiza Helena de Barros 620 Vila Harmonia
CEP: 14802-540, Araraquara - SP

e-mail: alves.robson@globo.com

2. Formação Acadêmica/Titulação

2.1. Graduação

Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, FC - UNESP, Bauru-SP, Brasil

Título: Estudo Citogenético em *Astyanax fasciatus*, Coletados na Bacia do Tietê, Região de Bauru, SP

Orientador: Fabio Porto Foresti

.

3. Participação em eventos

Apresentação de Painel na XII Semana de Biologia, 2005.
"Estudo Citogenético em *Astyanax fasciatus*, Coletados na Bacia Hidrográfica do Tietê, Região de Bauru, SP".

Apresentação Oral na VI Semana Integrada do Meio Ambiente de Bauru (SIMAB),

2005.
Projeto de Educação Ambiental - Caramujo Africano.

Apresentação de Painel no XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2004. “Estudo Citogenético em *Astyanax fasciatus*, coletados na Bacia Hidrográfica do Tietê, Região de Bauru, SP”.

IV Workshop de Genética, UNESP - Botucatu 2004.
.
I Ciclo de Estudos Biológicos-Saúde UNESP - Bauru, 2004.

Dedico este trabalho,

primeiramente e em especial à minha esposa Milena, que sempre me apoiou, incentivou e tornou possível mais essa etapa de minha vida,

e a meus pais, que me deram a base da educação e sempre estarão ao meu lado pro resto da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo aprendizado e pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas durante a realização deste trabalho no Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química.

Ao meu orientador Oswaldo que é umas das pessoas mais inteligentes, competentes e perseverantes que já conheci.

A minha co-orientadora Ana Paula pela paciência e dedicação que demonstrou durante a realização deste trabalho e por ser um exemplo de competência e trabalho.

A todos os amigos do laboratório de biohidrometalurgia (Alexandra, Ana Elisa, Bruna, Daniel, Fabiana, Gustavo, Mauricio, Marcelo, Robson (Cebinho), Tahuany, Vanessa e Waldenir).

A minha familia que sempre esteve presente me apoiando nas decisões.

Ao meu sogro e sogra Jurandir e Edna pela ajuda quando mais precisei.

E a todos que direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.

Albert Einstein

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

William Shakespeare

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro da região ultravioleta. **26**

Figura 2: Efeito da radiação ultravioleta na cadeia de DNA. **29**

Figura 3: Respirômetro de *Warburg*. **40**

Figura 4: Conjunto de reação utilizado no respirômetro de *Warburg*. **41**

Figura 5: Placas com colônias de *A. ferrooxidans* S. A suspensão celular foi diluída adequadamente para: $1x10^{-3}$ (A); $1x10^{-4}$ (B); $1x10^{-5}$ (C) e $1x10^{-6}$ (D). **45**

Figura 6: Porcentagem de oxidação de íons Fe^{2+} por células de *A. ferrooxidans* S expostas à radiação ultravioleta em diferentes tempos. **46**

Figura 7: Curva de sobrevivência de células de *A. ferrooxidans* S em meio sólido após radiação por ultravioleta. **51**

Figura 8: Oxidação dos íons Fe^{2+} por células de *A. ferrooxidans* S e possíveis mutantes *A. ferrooxidans* S300 e S301 **53**

Figura 9: Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem (A) e possíveis mutantes S300 (B) e S301 (C), na presença de íons Fe^{2+} e Cl^{-}. **55**

Figura 10: Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes S300 e S301, na presença de calcopirita. **57**

Figura 11: Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes S300 e S301, na presença de pirita. **59**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da calcopirita. **36**

Tabela 2: Sobrevivência de *A. ferrooxidans* S em meio sólido após exposição à radiação ultravioleta. **48**

Tabela 3: Sobrevivência de *A. ferrooxidans* após exposição à radiação ultravioleta em meio sólido na diluição $1x10^{-4}$. **50**

Sumário

1. INTRODUÇÃO **15**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**

2.1. Hidrometalurgia **18**

2.2. Biohidrometalurgia **18**

2.3. Micro-organismos envolvidos na biohidrometalurgia **20**

2.4. *Acidithiobacillus ferrooxidans* **20**

2.5. Sulfeto de cobre: calcopirita **22**

2.5.1. Íons cloreto **24**

2.6. Sulfeto de ferro: pirita **25**

2.7. Mutação por radiação ultravioleta **26**

2.7.1. Utilização da radiação ultravioleta em processos industriais **31**

3. OBJETIVOS **33**

4. MATERIAIS E MÉTODOS **34**

4.1. Condição de cultivo e obtenção das células **34**

4.2. Preparo da suspensão celular **35**

4.3. Amostras minerais **35**

4.4. Exposição à radiação ultravioleta **36**

4.4.1. Multiplicação bacteriana em meio líquido **36**

4.4.2. Multiplicação bacteriana em meio sólido **37**

4.5. Estudos fisiológicos de *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes **38**

4.5.1. Experimentos de respirometria **39**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **44**

5.1. Exposição à radiação ultravioleta **44**

5.1.1. Análise da multiplicação bacteriana em meio líquido **44**

5.1.2. Análise da multiplicação bacteriana em meio sólido **47**

5.2. Estudos fisiológicos de *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes **52**

5.2.1. Análise da oxidação bacteriana de íons Fe^{2} **52**

5.2.2. Avaliação fisiológica das possíveis linhagens mutantes através de experimentos de respirometria celular **54**

5.2.2.1. Análise da oxidação bacteriana de íons Fe^{2+} na presença de íons Cl^{-} **54**

5.2.2.2. Análise da oxidação bacteriana da calcopirita **56**

5.2.2.3. Análise da oxidação bacteriana da pirita **58**

6. CONCLUSÃO **60**

REFERÊNCIAS **61**

RESUMO

A espécie bacteriana *Acidithiobacillus ferrooxidans* é o principal micro-organismo utilizado na biohidrometalurgia. Este processo permite a recuperação de metais de interesse econômico, que se encontram na natureza na forma de sulfetos minerais. O *A. ferrooxidans* obtém energia da oxidação de íons ferrosos e enxofre incluindo os sulfetos minerais, promovendo assim a solubilização dos metais. A calcopirita ($CuFeS_2$) é um dos sulfetos de cobre mais abundante na natureza, porém, altamente refratário ao ataque químico e bacteriano. Alguns trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de selecionar linhagens bacterianas mutantes de *A. ferrooxidans* a fim de otimizar o processo de oxidação da calcopirita. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi induzir e selecionar linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* por radiação ultravioleta, que possam melhorar o processo de biolixiviação de sulfetos minerais, principalmente no que diz respeito à calcopirita. Os resultados obtidos mostraram que a radiação ultravioleta afetou a multiplicação do *A. ferrooxidans* S tanto em meio líquido quanto em meio sólido. Os 10% de sobrevivência foram obtidos após 300 s de exposição à radiação ultravioleta. Duas colônias de *A. ferrooxidans* S foram re-isoladas de meio sólido e analisadas quanto a alguns estudos fisiológicos. Com os resultados obtidos, observou-se que a radiação ultravioleta não afetou a oxidação bacteriana de íons ferrosos e dos sulfetos minerais calcopirita e pirita. Os possíveis mutantes foram analisados quanto à tolerância aos íons cloreto durante o processo de oxidação de íons ferrosos. Os resultados mostraram que o perfil de tolerância das possíveis linhagens mutantes foi semelhante à linhagem selvagem. Embora, não tenha sido possível obter um mutante com características importantes para otimizar processos na biohidrometalurgia, esse estudo foi realizado como uma alternativa de busca de linhagens de *A. ferrooxidans* melhoradas geneticamente.

Palavras-chave: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Biolixiviação. Sulfeto mineral. Radiação Ultravioleta.

ABSTRACT

The bacterial species *Acidithiobacillus ferrooxidans* is the main microorganism used in Biohidrometallurgy. This process allows the recovery of metals of economic interest, which occur in nature in the form of sulfide minerals. *A. ferrooxidans* obtains energy from oxidation of inorganic sulfur and ferrous ions including sulfide minerals, thereby promoting the solubilization of metals. The chalcopyrite ($CuFeS_2$) is one of the most abundant copper sulfides in nature but highly refractory to bacterial and chemical attack. Some studies have been carried out to select strains of bacterial mutants of *A. ferrooxidans* in order to optimize the process of chalcopyrite oxidation. Therefore, the objective was to induce and select mutant strains of *A. ferrooxidans* by ultraviolet radiation at different times, which can improve the bioleaching process of sulfide minerals, mainly with respect to chalcopyrite. The results showed that the UV affected the multiplication of *A. ferrooxidans* S both in liquid and in solid medium. The 10% survival was obtained after 300 s exposure to ultraviolet radiation. Two colonies of *A. ferrooxidans* S were re-isolated from solid medium and analyzed for some physiological studies. With these results, we found that ultraviolet radiation does not affect the bacterial oxidation of ferrous ions and chalcopyrite and pyrite sulfide minerals. Potential mutants were analyzed for their tolerance of chloride ions during the oxidation of ferrous ions. With these results, we found that ultraviolet radiation does not affect the bacterial oxidation of ferrous ions and chalcopyrite and pyrite sulfide minerals. Potential mutants were analyzed for their tolerance to chloride ions during the oxidation of ferrous ions. The results showed that the tolerability profile of the possible mutant strains was similar to wild type. Although it was not possible to obtain a mutant with important features to optimize biometallurgical processes, this study was conducted as an alternative for searching for strains of *A. ferrooxidans* genetically improved.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Bioleaching. Mineral Sulfide. Ultraviolet Radiation.

1. INTRODUÇÃO

Devido ao avanço tecnológico mundial, houve um significativo aumento na demanda dos bens minerais e, consequentemente, um rápido esgotamento das reservas naturais, além do aumento da poluição ambiental por processos metalúrgicos. Esses problemas acabaram contribuindo para o desenvolvimento de métodos alternativos na metalurgia que pudessem reduzir os efeitos negativos e suprir a demanda de metais de interesse econômico (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

Entre os métodos alternativos destaca-se a hidrometalurgia ou lixiviação, processo que se baseia na solubilização química a partir de sulfetos minerais, na presença de soluções aquosas adequadas (ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, ácido clorídrico ou ácido nítrico) (MARSDEN; HOUSE, 1992; CIMINELLI, 2007). A hidrometalurgia é um ramo da metalurgia extrativa, que se baseia na utilização de meio aquoso na extração de metais, de grande interesse tanto na área científica quanto na tecnológica, pois apresenta uma série de vantagens que podem reduzir os efeitos negativos dos processos metalúrgicos.

A partir da década de 40 definiu-se a correlação entre a lixiviação natural de metais e a participação direta de micro-organismos nesse processo, dando origem, assim, a biohidrometalurgia ou biolixiviação. Segundo Rojas (1998), a biohidrometalurgia é um processo natural de dissolução de sulfetos, resultante da ação de micro-organismos que oxidam sulfetos minerais, disponibilizando os metais presentes em suas formas iônicas solúveis. A extração de metais, pela ação de micro-organismos, a partir de minérios de baixos teores é a principal aplicação da biohidrometalurgia (ROSSI, 1990).

Atualmente, este processo está sendo utilizado na recuperação de cobre em vários países, principalmente no Chile, Peru e EUA. O cobre é um elemento de grande interesse econômico e é encontrado na natureza, principalmente, na forma de calcopirita ($CuFeS_2$). Esse sulfeto de cobre é o mais abundante na natureza e, por sua vez, o mais refratário ao ataque químico e bacteriano, apresentando taxas mínimas de oxidação (HACKL et al., 1995; VILCÁEZ; SUTO e INOUE, 2008). Esse fato pode estar associado à alta energia de formação da rede cristalina do sulfeto bem como à formação de um filme passivo que limita a reação de dissolução com o

meio lixiviante (HACKL et al., 1995; VILCÁEZ et al, 2008). A camada passivadora e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada ainda não foi totalmente esclarecida (STOTT et al., 2000; KLAUBER, 2003; KLAUBER, 2008).

Atualmente, trabalhos têm sido realizados a fim de otimizar o processo de biolixiviação da calcopirita. O acúmulo desse sulfeto de cobre refratário na natureza requer estudos aprofundados, principalmente no que diz respeito à estrutura cristalina do mineral, a interação bactéria-mineral e, principalmente, a manipulação genética do *A. ferrooxidans* (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

Pesquisas com *A. ferrooxidans*, que apresentem maiores taxas de oxidação de sulfetos minerais ou que são resistentes a níveis mais elevados de acidez ou metais tóxicos, possibilitarão maior eficiência no processo de biolixiviação da calcopirita. Além do mais, é de grande interesse a seleção de linhagens de *A. ferrooxidans*, através de técnicas de biologia molecular ou genética clássica, capazes de otimizar o processo de biolixiviação da calcopirita. Portanto, é de fundamental importância que trabalhos nessa área sejam realizados.

Sendo assim, experimentos de radiação por ultravioleta com essa espécie vêm sendo realizados em busca de alternativas para melhorar o processo de dissolução da calcopirita pela bactéria (GROUDEVA; GROUDEV, 1980; MENG et al., 2007; XU AI-LING, et al., 2010). Linhagens bacterianas melhoradas geneticamente poderão e deverão ser utilizadas em sistemas operacionais contínuos (biorreatores), para o aproveitamento de sulfetos minerais, principalmente a calcopirita.

Além dos experimentos de genética clássica com *A. ferrooxidans*, outros trabalhos vêm sendo realizados a fim de otimizar a biolixiviação da calcopirita como, por exemplo, diminuir o efeito da refratariedade desse sulfeto mineral. A presença de íons cloreto (Cl^-) no meio oxidativo é, recentemente, uma das alternativas utilizadas, devido ao efeito acelerador desses íons no processo de dissolução de sulfetos minerais refratários (LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a, 2000b).

No presente trabalho, um estudo, em nível de genética clássica, foi realizado a fim de induzir o *A. ferrooxidans* por radiação ultravioleta e selecionar possíveis

linhagens mutantes que apresentem maiores taxas de oxidação da calcopirita ou pirita, em comparação com a respectiva linhagem selvagem. Além do mais, o efeito de íons Cl^- durante a oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) pelas possíveis linhagens mutantes em comparação com a respectiva linhagem selvagem, foi analisado por experimentos de respirometria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hidrometalurgia

Com o avanço industrial e tecnológico, houve um significativo aumento da demanda dos bens minerais, o que provocou um rápido esgotamento dessas reservas, além do aumento da poluição ambiental por processos metalúrgicos. Esses problemas contribuíram para o desenvolvimento de métodos alternativos na metalurgia extrativa que pudessem reduzir os efeitos negativos e suprir a demanda de metais de interesse econômico (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

Um dos métodos extrativos alternativos utilizados na metalurgia são os processos hidrometalúrgicos ou processos de lixiviação de metais. A lixiviação consiste na dissolução seletiva de minerais contendo o metal ou metais de interesse através do contato do sólido (minério ou concentrado) com uma fase aquosa contendo ácidos (principalmente o ácido sulfúrico), bases (como hidróxidos de amônio e de sódio) ou agentes complexantes (como o cianeto de sódio), em condições variadas de pressão e temperatura (usualmente de 25 a 250°C) (CIMINELLI, 2007). As aplicações da hidrometalurgia incluem a produção de alumina, ouro, urânio, zinco, níquel, cobre, titânio, terras-raras, entre outros (MARSDEN; HOUSE, 1992; CIMINELLI, 2007).

2.2. Biohidrometalurgia

A partir da década de 40, houve um avanço na metalurgia, pois definiu-se a correlação entre a lixiviação de metais e a participação direta de certas espécies de micro-organismos, dando origem, assim, à biohidrometalurgia.

A biolixiviação é um processo natural de dissolução de sulfetos, resultante da ação de micro-organismos que oxidam sulfetos minerais disponibilizando os metais presentes em suas formas iônicas solúveis (ROJAS, 1998). A extração de metais pela ação de micro-organismos a partir de minérios de baixos teores é a principal aplicação da biohidrometalurgia (ROSSI, 1990).

A potencialidade da biolixiviação é devido a uma série de fatores como: 1) baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional; 2) economia de

insumos utilizados em processos hidrometalúrgicos convencionais (ácidos e agentes oxidantes) devido ao fato do próprio micro-organismo produzir tais insumos a partir de substratos presentes no minério; 3) baixa exigência de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico convencional; 4) reduzida necessidade de mão de obra especializada na operação e 5) menor impacto ambiental principalmente pela não emissão de SO_2 (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

O processo biohidrometalúrgico apresenta-se como uma alternativa promissora, para recuperação de metais de interesse econômico, como cobre, urânio, ouro, entre outros. Países como Canadá e Austrália, que utilizam esse processo, destacam-se como grandes produtores de metais (urânio e ouro), devido ao fato dos mesmos investirem em programas que envolvem a cooperação de diversos setores como a indústria, o governo e instituições de ensino e pesquisa.

O cobre é um metal encontrado na natureza, principalmente na forma de calcopirita, e é utilizado, principalmente, nos setores de construção civil e eletrônico. A recuperação de cobre de minérios de baixos teores (principalmente a partir da calcopirita) tem sido utilizada em grande escala no mundo inteiro, pelo método de biolixiviação em pilhas. Nesse sistema, a solução lixiviadora (ácido sulfúrico, bactérias e íons Fe^{3+}) é utilizada na operação de irrigação percolando o leito mineral até o nível inferior onde o líquido rico em cobre é coletado. A solução de cobre (contendo acima de 0,6 g L^{-1}) (ROSSI, 1990; RAWLINGS, 2005) é removida, o cobre é precipitado, e a água é reutilizada após o ajuste do pH para 2. Grande parte das plantas biohidrometalúrgicas está localizada no Hemisfério Sul, principalmente no norte do Chile, onde está presente a operação “Quebrada Blanca”. Essa planta ilustra a evolução da biolixiviação na indústria mineira, pois a mesma permanece ativa desde 1980 processando cerca de 80.800 t dia^{-1} de concentrado de cobre (BRIERLEY; BRIERLEY, 2001).

Segundo Garcia Junior e Bevilaqua (2008), a ação natural de bactérias em processos biohidrometalúrgicos é conduzida de forma quase rudimentar nos casos de urânio e cobre, pois esses metais se apresentam na forma de sulfetos (calcopirita – $CuFeS_2$, por exemplo) os quais se solubilizam sob ação oxidativa bacteriana, no sulfato solúvel correspondente ($CuSO_4$, por exemplo). Caso o metal de interesse não se apresente na forma mineralógica, deverá existir no minério outro sulfeto (pirita –

FeS_2, por exemplo) para ser oxidado pela bactéria e originar agentes lixiviantes (ácido sulfúrico e íons Fe^{3+}), capazes de promover a solubilização do metal a partir de outras espécies mineralógicas (ex.: óxidos, carbonatos, etc.).

Há dois mecanismos envolvidos no ataque bacteriano dos sulfetos minerais: o ataque direto e o indireto. No mecanismo direto, a bactéria atua diretamente no sulfeto mineral. No mecanismo indireto, a bactéria converte, simplesmente, Fe^{2+} a Fe^{3+} e enxofre elementar em sulfato, enquanto que os íons Fe^{3+} atuam diretamente na oxidação do sulfeto mineral.

Na biohidrometalurgia, várias espécies bacterianas são utilizadas diretamente na solubilização de metais de minério, porém a principal bactéria envolvida neste processo é o *A. ferrooxidans*.

2.3. Micro-organismos envolvidos na biohidrometalurgia

Os diferentes tipos de micro-organismos envolvidos na biohidrometalurgia são isolados de diferentes ambientes ácidos como minas de carvão, lixiviação de sulfetos minerais e água ácida de mina. A principal característica desses micro-organismos é a acidofilia cujo pH ótimo de multiplicação é menor que 3,0. Esses micro-organismos são oxidantes de íons Fe^{2+} (*A. ferrooxidans*, *Acidianus brierleyi* e *Leptospirilum ferrooxidans*, como exemplos), enxofre e suas formas reduzidas (*A. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *A. brierleyi*, como exemplos). Na biohidrometalurgia, a principal bactéria envolvida neste processo é o *A. ferrooxidans*, espécie que oxida íons Fe^{2+}, enxofre e compostos reduzidos de enxofre (sulfetos minerais, por exemplo).

2.4. *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A espécie *Acidithiobacillus ferrooxidans*, anteriormente denominada *Thiobacillus ferrooxidans* (KELLY; WOOD, 2000) é aeróbia e considerada um dos principais micro-organismos envolvidos na biolixiviação de metais a partir de minérios. É uma espécie obrigatoriamente acidofílica, com pH ótimo de multiplicação em torno de 2,0, podendo se multiplicar em uma faixa de 1,5 a 4,5, mas abaixo de

1,0 não é capaz de sobreviver (SMITH; 1988). *A. ferrooxidans* é uma bactéria Gram-negativa que utiliza CO_2 atmosférico como principal fonte de carbono. É uma espécie considerada obrigatoriamente autotrófica e necessita, além de uma fonte energética de natureza inorgânica, de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (TUOVINEN; PANDA; TSUSHUJA, 1979; RAWLINGS, 1981). *A. ferrooxidans* apresenta metabolismo quimiolitotrófico, obtendo energia necessária para sua multiplicação da oxidação de íons Fe^{2+}, enxofre e compostos reduzidos de enxofre (S^{2-}, $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$) incluindo os sulfetos minerais como, por exemplo, a pirita (FeS_2) (JOHNSON; HALLBERG, 2003). Essa bactéria é considerada um micro-organismo mesófilo, sendo 30ºC a temperatura ótima de multiplicação (BERTHELOT; LEDUC; FERRONI, 1993). A generalizada tolerância a altas concentrações de íons metálicos, inclusive metais pesados é uma característica fisiológica marcante de *A. ferrooxidans* (CABRERA; GOMEZ; CANTERO, 2005). Tal característica é condicionada, provavelmente, por um sistema genético altamente especializado e pode ser atribuída à presença constante de metais no próprio *habitat* da bactéria.

A energia necessária para manutenção e crescimento dessa bactéria provém da oxidação de Fe^{2+} e compostos de enxofre, sob condições ácidas, como pode ser observado nas equações abaixo:

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \longrightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O \qquad [1]$$

$$S^0 + O_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_3 \qquad [2]$$

$$H_2SO_3 + (1/2)O_2 \longrightarrow H_2SO_4 \qquad [3]$$

Quando o *A. ferrooxidans* utiliza o íon Fe^{2+} como substrato energético, a oxidação desse íon a Fe^{3+} ocorre no espaço periplasmático da membrana celular em pH ácido (1,5 a 2,0), enquanto que a redução do oxigênio ocorre no citoplasma (pH 6,5) (QUATRINI; JEDLICKI; HOLMES, 2005).

Em relação à oxidação de sulfetos minerais, dois tipos de mecanismos são propostos e motivam grandes discussões, o mecanismo direto e o indireto. Alguns defensores do mecanismo direto afirmam que a bactéria possui um mecanismo

biológico específico para oxidar o mineral e deste modo obter energia diretamente do mineral (reação [4]). Já os que defendem o mecanismo indireto argumentam que o íon Fe^{3+} é o responsável pela dissolução do mineral e que a bactéria obtém energia da regeneração deste íon Fe^{3+} (reações [5] e [6]). O mecanismo indireto ocorre, mas os defensores do mecanismo direto argumentam que esta não é a rota dominante (GARCIA JUNIOR; BEVILAQUA, 2008).

$$MeS + 2O_2 \longrightarrow MeSO_4 \qquad [4]$$

$$MeS + Fe_2(SO_4)_3 \longrightarrow MeSO_4 + 2FeSO_4 + S^0 \qquad [5]$$

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \xrightarrow{\text{bactéria}} 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O \qquad [6]$$

Me = metal

Tem sido demonstrado que A. ferrooxidans é capaz de oxidar diferentes sulfetos minerais como arsenopirita (FeAsS), galena (PbS), esfalerita (ZnS), pirita (FeS_2), calcopirita ($CuFeS_2$), além de outros (BEVILAQUA et al., 2002; GARCIA JUNIOR; BIGHAM; TUOVINEN, 1995a, 1995b; TUOVINEN et al., 1994).

Algumas características da bactéria *A. ferrooxidans* a torna um micro-organismo interessante para estudos de fisiologia, bioquímica e genética, assim como para o desenvolvimento de processos industriais em atividades metalúrgicas como: crescimento em condições ambientais extremas (altas concentrações de metais e acidez), crescimento autotrófico (fixação de CO_2 atmosférico) e capacidade de solubilizar metais de interesse econômico.

2.5. Sulfeto de cobre: calcopirita

A calcopirita é o sulfeto de cobre mais abundante na natureza e pertence ao grupo mais explorado de minerais de cobre. A fórmula empírica mais adequada da calcopirita seria Cu^+ Fe^{3+} S_2^{2-}, de modo a destacar que o cobre nesse mineral se encontra, principalmente, no estado cuproso, enquanto o ferro esta, predominantemente, no estado férrico (KOCH, 1975).

Embora esteja classificada como um mineral solúvel em meio ácido, a calcopirita é o mais refratário tanto ao ataque químico como bacteriano (HACKL et al., 1995; VILCÁEZ; SUTO; INOUE, 2008). Diversos processos têm sido propostos para o tratamento pré-oxidativo de minérios refratários. Esses processos proporcionam o rompimento das estruturas cristalinas refratárias por oxidação, mediante a adição direta ou pela geração indireta de reagentes químicos oxidantes por ação de bactérias específicas, próprias dos minérios em questão, pela ustulação dos sulfetos com geração de SO_2 e, ainda, pela oxidação sob pressão, em autoclaves (LUZ; LINS, 2004).

O processo de dissolução da calcopirita via biolixiviação tem sido um dos mais estudados, devido à refratariedade e importância econômica desse sulfeto de cobre. Sua dissolução ocorre em uma primeira etapa pelo ataque bacteriano (equação [7]) e em seguida por um ataque químico (equação [8]).

$$2CuFeS_2 + 4O_2 + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Bactéria}} 2CuSO_4 + Fe_2(SO_4)_3 + H_2O \qquad [7]$$

$$CuFeS_2 + 2Fe_2(SO_4)_3 \longrightarrow CuSO_4 + 5FeSO_4 + 2S^0 \qquad [8]$$

Durante o ataque bacteriano (equação [7]) ocorre a formação do sulfato férrico, que oxida a calcopirita, solubilizando cobre e gerando o íon Fe^{2+} e enxofre elementar (equação [8]). O íon Fe^{2+} e S^0 são oxidados pela bactéria gerando Fe^{3+} e H_2SO_4 (equações [9] e [10], respectivamente).

$$2Fe^{2+} + 2H^+ + 1/2O_2 \longrightarrow 2Fe^{3+} + H_2O \qquad [9]$$

$$2S^0 + 3O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4 \qquad [10]$$

Devido à refratariedade da calcopirita, a cinética de oxidação é lenta. Esse fato pode estar associado à alta energia de formação da rede cristalina do sulfeto (~

17.000 kJ mol^{-1}) bem como à formação de um filme passivo que limita a reação de dissolução pelo meio lixiviante (HACKL et al., 1995; VILCÁEZ; SUTO; INOUE, 2008).

A camada que se forma na superfície do mineral e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas; porém, a natureza desta camada ainda não foi totalmente esclarecida (STOTT et al., 2000; KLAUBER, 2003; KLAUBER, 2008). Entretanto, alguns autores afirmam que a formação desse filme pode ser atribuída, principalmente, à formação de polissulfetos, enxofre elementar e ainda de precipitados de ferro (jarositas) (BALLESTER; CÓRDOBA, 2005; HACKL et al., 1995; KLAUBER, 2008; VILCÁEZ; SUTO; INOUE, 2008).

2.5.1. Íons cloreto

Trabalhos têm sido realizados em busca de alternativas para tentar otimizar o processo de dissolução da calcopirita. A utilização de meio oxidante contendo íons Cl^- é uma das alternativas em destaque devido ao efeito acelerador desse íon no processo de dissolução de sulfetos minerais (WINAND, 1991; LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a, 2000b).

Vários estudos têm mostrado que o aumento na dissolução da calcopirita na presença de íons Cl^- está, provavelmente, relacionado à cinética da reação, uma vez que, as taxas de transferências de elétrons em soluções de Cl^- são maiores que em soluções de SO_4^{2-} (LIDDICOAT; DREISINGER, 2007; LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a, 2000b).

Há, na literatura, controvérsia a respeito da ação dos íons Cl^- no mecanismo de lixiviação da calcopirita. Alguns autores acreditam que íons Cl^- modificam a morfologia da camada de enxofre depositada sobre partículas de calcopirita (LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a). A camada que é formada na presença desse íon é mais porosa, diminuindo o efeito de passivação na superfície do mineral (LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a).

Lu; Jeffrey e Lawson (2000a) realizaram um estudo utilizando microscopia eletrônica de varredura (SEM) e observaram que as partículas de calcopirita lixiviadas na ausência de íons Cl^- foram completamente cobertas por um filme de

enxofre amorfo, enquanto que, naquelas lixiviadas em meio contendo íons Cl^-, esse filme mostrou-se mais poroso e cristalino.

Por outro lado, outros pesquisadores relacionaram o efeito acelerador dos íons Cl^- à formação de complexos de Cl^- e Cu^{2+} (WINAND, 1991; PUVVADA; MURTHY, 2000; SKROBIAN; HAVLIK; UKASIK, 2005; CARNEIRO; LEÃO, 2007).

Para Carneiro e Leão (2007), o aumento da velocidade de dissolução da calcopirita na presença de íons Cl^- está relacionado à formação do complexo solúvel $CuCl_2^{1-}$, que está representado, esquematicamente, abaixo:

$$Cu^+ + nCl^- = (CuCl_n)^{1-n} \qquad [11]$$

Além do mais, como íons cuprosos são estáveis em sistemas de Cl^-, o par Cu^{2+}/Cu^+, ao invés de Fe^{3+}/Fe^{2+}, torna-se o principal oxidante da calcopirita (CARNEIRO; LEÃO, 2007).

2.6. Sulfeto de ferro: pirita

Os fatores que afetam a oxidação da pirita (FeS_2) têm sido, amplamente, estudados devido a sua importância na qualidade ambiental e na recuperação mineral. A pirita está, geralmente, associada a carvão e depósitos de minérios metálicos, sendo que sua oxidação gera uma drenagem ácida que se configura como um grande problema de poluição ambiental (EVANGELOU; ZHANG, 1995).

A oxidação da pirita ocorre pela redução do O_2 atmosférico e produção de íons sulfato, Fe^{2+} e H^+ (equação [12]).

$$FeS_2 + 7/2O_2 + H_2O \longrightarrow Fe^{2+} + 2SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad [12]$$

Posteriormente, os íons Fe^{2+} são oxidados a íons Fe^{3+}, os quais, por sua vez, sofrem hidrólise, gerando hidróxido férrico e mais íons H^+ (equações [13] e [14]).

$$Fe^{2+} + 1/4O_2 + H^+ \longrightarrow Fe^{3+} + 1/2H_2O \quad [13]$$

$$Fe^{3+} + 3H_2O \longrightarrow Fe(OH)_3 + 3H^+ \quad [14]$$

A reação de hidrólise do Fe^{3+} ocorre, geralmente, nos estágios iniciais de oxidação da pirita, limitando a atividade do Fe^{3+} livre na solução. No entanto, à medida que há o acúmulo de íons H^+ no meio e o pH atinge valores abaixo de 3,5, a reação de hidrólise é limitada, aumentando, de maneira significativa, a concentração de Fe^{3+} na solução. Nessas condições, o Fe^{3+} passa a atuar como receptor de elétrons na superfície dos cristais de pirita, tornando-se um agente oxidante de solubilização de outros sulfetos (equação [15]).

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 5Fe^{2+} + 2SO_4^{2-} + 16H^+ \quad [15]$$

Portanto, quando o pH do meio é suficientemente ácido, o Fe^{3+} passa a ser o principal oxidante da pirita, sendo reduzido a Fe^{2+}. O O_2 passa a ter um papel indireto na reoxidação do Fe^{2+}, regenerando Fe^{3+} (equação [13]). Segundo Ritche (1994), sob condições de pH abaixo de 3, a oxidação da pirita pelo Fe^{3+} é mais rápida, cerca de dez a cem vezes, em relação à oxidação pelo O_2. Portanto, o processo torna-se autopropagante, constituindo um ciclo contínuo capaz de gerar grandes quantidades de íons H^+ (EVANGELOU; ZHANG, 1995).

2.7. Mutação por radiação ultravioleta

Outra linha de pesquisa que vem sendo explorada, em busca de alternativas para melhorar o processo de dissolução de sulfetos, é a utilização de radiação ultravioleta em micro-organismos a fim de se obter linhagens mutantes capazes de aperfeiçoar o processo, principalmente no que diz respeito à calcopirita.

As mutações naturais nos seres vivos vêm ocorrendo ao longo do tempo através de adaptações devido à presença de um ambiente eletromagnético natural produzido pela luz do sol, pelas emissões planetárias e pelos fenômenos metrológicos da natureza desde o início da vida no planeta.

O sol, importante elemento de nutrição para os seres vivos, é a mais poderosa fonte de produção de raios ultravioletas e, até alguns séculos atrás era a única fonte de exposição humana a este tipo de radiação.

Em 1801, as radiações ultravioletas foram descobertas pelo físico alemão John Wilherm Ritter e, somente em 1901, o norte americano Peter Hewitt produziu-as artificialmente (RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998; DÉOUX; DÉOUX, 2000). As radiações ultravioletas apresentam propriedades bioquímicas que lhes confere capacidade para realizar síntese de vitamina D e clorofila, polimerização de substâncias e ação germicida, alterando, assim, a reprodução de micro-organismos.

A radiação por ultravioleta na faixa de 290-180 nm tem, principalmente, ação germicida (Figura 1), promovendo, assim, uma alteração bioquímica em nível de membrana celular e DNA, podendo causar inativação dos micro-organismos ou até mesmo a morte destes, dependendo do tempo de exposição (AZEVEDO, 1985). As radiações ultravioletas são constituídas por um campo elétrico e magnético e enquadram-se como radiações não ionizantes (LEÃO, 1982).

A mutação induzida por radiação ultravioleta é um método eficaz e freqüentemente utilizado para obtenção de micro-organismos mutantes, pois as bases timina do DNA absorvem, fortemente, a luz ultravioleta formando dímeros de pirimidina (Figura 2). Diversas hipóteses têm sido consideradas para explicar as mutações causadas por luz ultravioleta. Sabe-se que se o dímero de pirimidina não for retirado, ele não pode ser copiado resultando em “vazios” de cerca de 1.000 nucleotídeos na fita complementar do DNA (AZEVEDO, 1985).

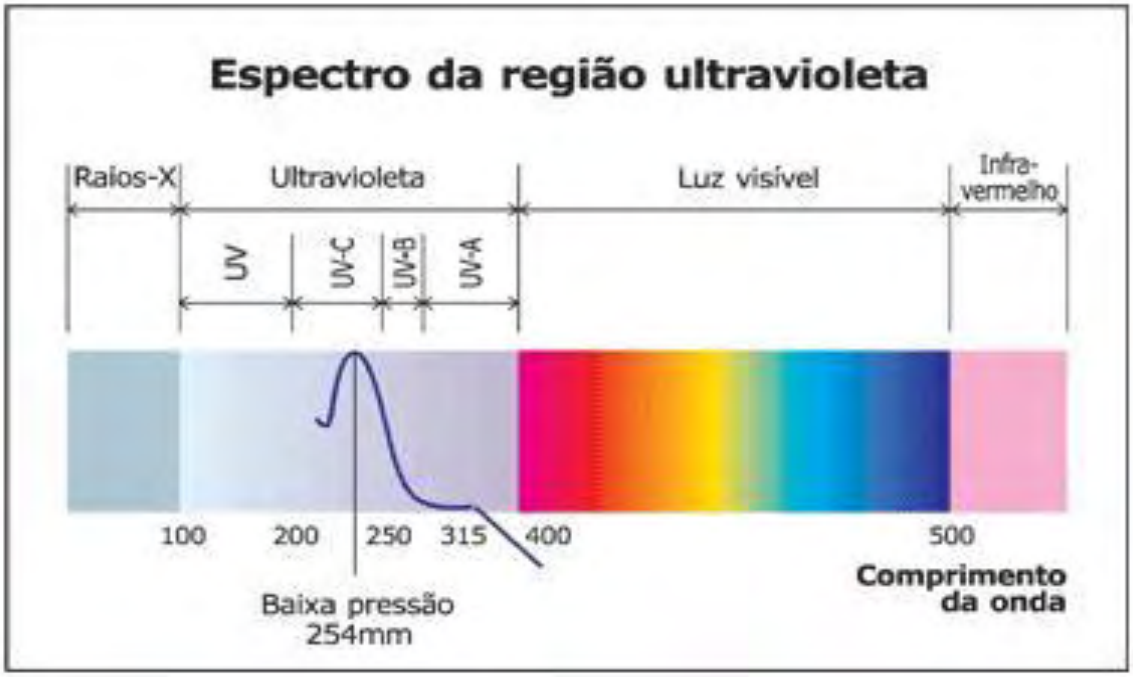

Figura 1: Espectro da região ultravioleta.

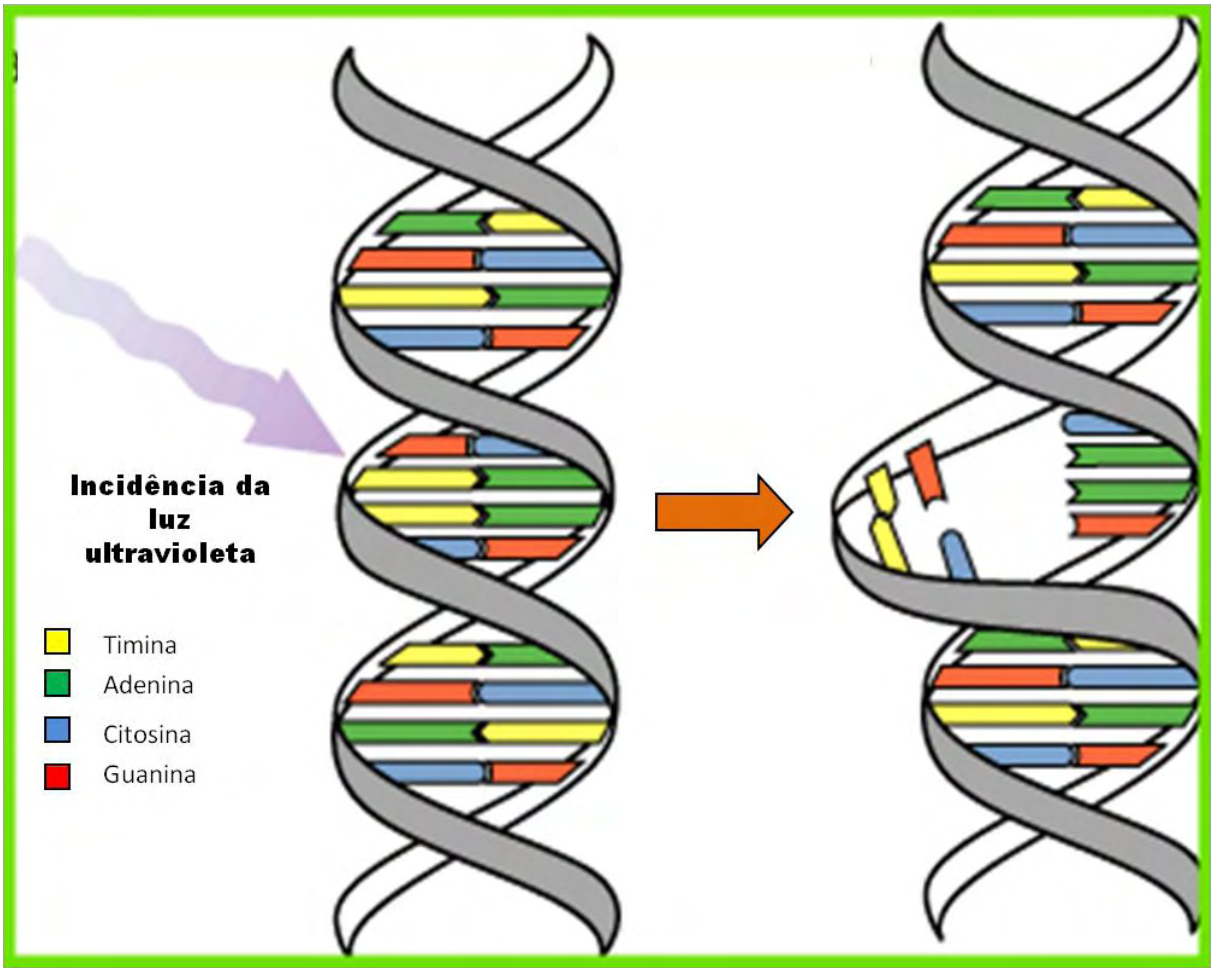

Figura 2: Efeito da radiação ultravioleta na cadeia do DNA.

Quando há formação do dímero de pirimidina, após exposição do DNA à radiação ultravioleta, a replicação fica impedida de continuar a partir do ponto do dímero, o que impede a leitura da informação na sequência de bases da fita molde. Este impedimento ocasiona a ativação de um sistema de reparo denominado: sistema SOS de reparo. Esse sistema faz com que o DNA danificado pela luz ultravioleta emita um sinal regulador causando o silenciamento de várias funções para promover a sobrevivência da bactéria mesmo com dímeros presentes em seu DNA. Em tais condições, a polimerase permite a continuação da replicação através da incorporação de bases erradas na nova fita de DNA. Essas lesões acarretam, portanto, a fixação de mutações do tipo troca de bases na fita recém sintetizada. A mutação por luz ultravioleta ocorreria, portanto, devido a erros de reparo, quando falhas no DNA na fita complementar, que possua o dímero, são preenchidas por outras bases (AZEVEDO, 1985).

Entende-se por reparo a capacidade da maquinaria celular de corrigir os erros causados por mutações. Muitos danos sofridos no DNA podem ser reparados porque a informação genética é preservada em ambas as fitas da dupla hélice, de tal forma que a informação perdida em uma fita pode ser recuperada a partir da fita complementar. Os mecanismos existentes e conhecidos de reparação do DNA danificado são, provavelmente, universais e uma célula pode ter vários sistemas capazes de atuar ao mesmo tempo no DNA danificado.

Um dos mecanismos de reparo mais estudado é o da remoção de dímeros de timina, formados pela exposição do DNA à luz ultravioleta. Este dímero danifica a estrutura da dupla-hélice e, assim, são bloqueadas a replicação e a expressão gênica até que a lesão seja removida. Este tipo de lesão pode ser reparado de diferentes formas. A forma mais direta envolve enzimas que simplesmente revertem à modificação química que originou o dano. Dímeros de pirimidina são os alvos universais da enzima fotoliase, que se liga ao dímero e catalisa uma segunda reação fotoquímica, desfazendo o anel formado pela luz ultravioleta e refazendo as bases pirimídicas individuais. Este processo é chamado de fotorreatiavação e envolve as seguintes etapas: inicialmente, a enzima reconhece e liga-se ao dímero (mesmo na ausência de luz visível); depois, a absorção de luz branca fornece energia para

converter o dímero em monômero de pirimidina; por fim, a enzima dissocia-se do DNA. A reação depende do gene que codifica a fotoliase e ocorre especialmente em procariotos.

Portanto, a luz ultravioleta causa mutações gênicas e também, em doses maiores, mutações cromossômicas, formando dímeros de pirimidina no DNA. Em bactérias, a maioria dos dímeros é de timina.

O DNA de *A. ferrooxidans* contém aproximadamente 47% de bases A (adenina) e T (timina) (KULPA; ROSKEY, MJOL, 1986). Desta forma, é grande a probabilidade de ocorrência de pares de timina adjacentes, os quais possibilitarão mutações no DNA bacteriano na presença de luz ultravioleta e, conseqüentemente, modificações nas características fisiológicas e/ou metabólicas.

2.7.1. Utilização da radiação ultravioleta em processos industriais

Embora poucos trabalhos sobre a utilização da radiação ultravioleta têm sido relatados, alguns demonstraram a importância desse mutagênico físico na otimização de processos industriais, como por exemplo, na solubilização de cobre (GOUDREVA; GROUDEV, 1980; MENG et al., 2007; XU AI-LING, et al., 2010).

A radiação por ultravioleta, além de outros agentes mutagênicos [EMS (etanometilsulfonato), nitrosoguanidina], permitiu a seleção de mutantes da bactéria *A. ferrooxidans* com alta atividade de oxidação do ferro e enxofre (GROUDEVA; GROUDEV, 1980). Segundo os autores, em algumas condições específicas semi-industriais, a lixiviação do cobre de vários sulfetos minerais, entre eles a calcopirita, na presença das linhagens mutantes foi mais rápida e eficiente, comparando-se ao processo na presença da linhagem selvagem.

Meng et al., (2007) utilizaram radiação ultravioleta em um reator de movimento contínuo para melhorar a biolixiviação da calcopirita pela bactéria *Acidianus brierleyi*. Meng et al., (2007) obtiveram uma linhagem melhorada de *A. brierleyi* que apresentou taxa elevada de solubilização de cobre durante a biolixiviação da calcopirita, sendo quatro vezes maior do que a apresentada pela linhagem selvagem. Os autores conseguiram aumentar a taxa de biolixiviação do cobre de 0,017 mg L^{-1} h^{-1} para 0,080 mg L^{-1} h^{-1}.

Xu Ai-Ling et al., (2010) selecionaram linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* GF e *Acidiphilium cryptum* DX1-1 após exposição à radiação ultravioleta em diferentes tempos. Os autores observaram que para as duas espécies, o tempo de 60 s foi suficiente para provocar uma taxa de mutação de 35% para a bactéria *A. ferrooxidans* e de 23% para *A. cryptum* DX1-1. Os mutantes obtidos de *A. ferrooxidans* e *A. cryptum* foram analisados pelos autores quanto à multiplicação celular em meio contendo como fonte energética Fe^{2+} e glicose, respectivamente. As curvas de crescimento dos mutantes obtidos mostraram que após exposição, as células oxidaram a fonte energética em um menor tempo quando comparadas com as respectivas linhagens selvagens. Os autores utilizaram os mutantes das duas espécies em experimentos de biolixiviação de um minério contendo calcopirita. Com a mistura das linhagens mutantes foi possível extrair aproximadamente 3,00 g L^{-1} de cobre do minério após 30 dias, enquanto que 2,60 g L^{-1} de cobre foi extraído pelas linhagens selvagens no mesmo período (XU AI-LING et al., 2010).

Poucos trabalhos na literatura mostram o efeito da radiação ultravioleta na fisiologia e metabolismo de *A. ferrooxidans*, talvez pela dificuldade de isolar linhagens mutantes em meio sólido. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi induzir, por radiação ultravioleta, *A. ferrooxidans* e selecionar linhagens mutantes que sejam capazes de otimizar processos na biohidrometalurgia, principalmente no que diz respeito a oxidação bacteriana da calcopirita. Além do mais, as possíveis mutações ocasionadas pela radiação ultravioleta poderão afetar a fisiologia e/ou metabolismo de *A. ferrooxidans*. Mutações estas que podem conferir à bactéria, por exemplo, tolerância a íons cloreto ou metais pesados, ou então, afetar alguma via metabólica de oxidação de substratos (Fe^{2+} e sulfetos minerais), levando, assim, a uma possível melhora em processos biohidrometalúrgicos.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a indução de *A. ferrooxidans* S por radiação ultravioleta e a seleção de linhagens mutantes que sejam mais eficientes no processamento biohidrometaúrgico de sulfetos minerais em relação à linhagem selvagem.

Sendo que os objetivos específicos foram:

1) Induzir o *A. ferrooxidans* à radiação ultravioleta em diferentes tempos para seleção de linhagens mutantes;

2) Obter a curva de 10% de sobrevivência das bactérias expostas à radiação ultravioleta;

3) Avaliar a oxidação de íons Fe^{2+} pelas possíveis linhagens mutantes obtidas durante a multiplicação bacteriana em meio sólido e líquido;

4) Avaliar a oxidação bacteriana dos sulfetos minerais calcopirita e pirita, através de experimentos de respirometria;

5) Avaliar o efeito de íons cloreto na oxidação de Fe^{2+} por *A. ferrooxidans*, linhagens selvagem e possíveis mutantes, através de experimentos de respirometria.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Condição de cultivo e obtenção das células

Para os experimentos de indução de *A. ferrooxidans* e seleção de linhagens mutantes, além de testes de respirometria, foi utilizada a linhagem S isolada por Garcia Junior (1991) da mina de cobre de Surubim (Caraíba-BA, Brasil) que se encontra na coleção de culturas disponíveis no Laboratório de Biohidrometalurgia do Instituto de Química-UNESP-Araraquara-SP. A linhagem S foi selecionada como sendo uma das mais eficientes na oxidação da calcopirita, por experimentos de respirometria celular, dentre doze linhagens testadas (NOVELLO, 2008).

Para manutenção periódica (repiques bimestrais) de *A. ferrooxidans* S foi utilizado o meio T&K (TUOVINEN; KELLY, 1973) com pequenas modificações. O referido meio é composto por duas soluções (A e B), cujas composições são:

A) Solução de Sais

- $(NH_4)_2SO_4$	0,5 g
- K_2HPO_4	0,5 g
- $MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
- H_2O Destilada	800 mL

B) Solução de Sulfato Ferroso

- $FeSO_4.7H_2O$	33,3 g
- H_2O Destilada	200 mL

Para o preparo do meio de cultura, as soluções A e B foram aciduladas com H_2SO_4 concentrado até pH 1,8. A solução de sais (solução A) foi esterilizada em autoclave, a uma temperatura de 120ºC, durante 20 min. A solução de sulfato ferroso (solução B) foi esterilizada em membrana de acetato de celulose com 0,45 μm de diâmetro de poro. A finalização do preparo do meio de cultura consistiu na mistura das soluções A e B em uma proporção de 4:1, respectivamente.

4.2. Preparo da suspensão celular

Para realização dos experimentos, a cultura de *A. ferrooxidans* S foi obtida através de inóculo [10% (v/v)] da cultura estoque em meio T&K completo e incubada a 30ºC e 150 rpm em mesa agitadora (*New Brunswick Scientific*). As células foram coletadas ao final da fase exponencial de crescimento, quando a porcentagem de oxidação de Fe^{2+} atingiu, aproximadamente, 75%. Para isto, a quantidade de Fe^{2+} no meio de cultura foi determinada por titulação com dicromato de potássio 0,017 mol L^{-1} em meio ácido (H_2SO_4/H_3PO_4) (VOGEL, 1981). A cultura foi centrifugada a 4.000 rpm (2.831 x g) por 1 h a 4°C (centrífuga *Beckmann Avantil*-J10). As células foram lavadas com H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} (centrifugação de 4000 rpm por 10 min a 4°C, em microcentrífuga *Eppendorf* 5415R) e re-suspensas em meio T&K sem íon Fe^{2+}. Essa suspensão foi utilizada nos experimentos de exposição à radiação ultravioleta e para os ensaios de respirometria.

A cultura de *A. ferrooxidans* foi previamente repurificada em meio T&K solidificado com agarose 0,45% (p/v). Um volume de suspensão diluída em Tween-80 a 0,25% (v/v) (pH 1,8) foi inoculado em meio sólido sendo as placas incubadas a 30ºC por aproximadamente 15 dias, ou até o aparecimento das colônias.

Após crescimento celular, uma colônia foi isolada e transferida para meio líquido T&K completo, sendo que repiques são realizados a cada dois meses. Essa etapa de repurificação foi importante para definir as diluições a serem utilizadas nos experimentos de exposição à radiação ultravioleta.

4.3. Amostras minerais

Foi utilizado o sulfeto mineral calcopirita da mina de Sossego-PA fornecido pela Vale (Brasil). Para realização do ensaio, o mineral foi moído para 100% < 75 µm (peneira < 200 mesh). Na Tabela 1 está descrita a composição química da amostra mineral (análise prévia realizada no CNEM-COLAB, Poços de Caldas-MG), a qual apresentou como impurezas principais Ca e Si.

Tabela 1. Composição química da calcopirita.

Elemento	% em massa	Desvio
Fe	27,30	0,10
Cu	23,00	0,20
S Pirítico	22,50	0,10
S Sulfático	0,39	0,03
S Total	22,90	0,10
Si	3,20	0,20
Ca	7,00	0,10

O sulfeto mineral pirita utilizado nos ensaios de respirometria foi doado pelo Centro de Tecnologia Mineral (CETEM).

4.4. Exposição à radiação ultravioleta

A técnica de exposição à radiação ultravioleta foi utilizada para induzir *A. ferrooxidans* S, a fim de selecionar mutantes que sejam capazes de otimizar processos biohidrometalúrgicos. A oxidação de Fe^{2+} na presença de íons Cl^{-}, além da oxidação de sulfetos minerais (calcopirita e pirita) pelas possíveis linhagens mutantes foi analisada por experimentos de respirometria.

4.4.1. Multiplicação bacteriana em meio líquido

Para analisar o efeito da radiação na multiplicação bacteriana em meio líquido, um volume da suspensão celular (item 4.2) foi transferido para uma placa de Petri e irradiado por ultravioleta em diferentes tempos (0, 10, 30, 60, 90, 120, 180 e 300 s). Para os experimentos de radiação utilizou-se o *short-wave* como comprimento de onda (+/- 260nm, *Chromato – Vue – Mfd. By Ultraviolet Products*), a uma distância aproximada de 20 cm da suspensão celular. Após cada tempo de

exposição, um volume da suspensão celular irradiada foi retirado e transferido para Erlenmeyer contendo meio T&K completo. O processo de oxidação de íons Fe^{2+} pelas possíveis linhagens mutantes foi monitorado (item 4.2) e curvas de multiplicação celular foram obtidas. Os experimentos foram realizados em duplicata e na ausência de luz branca.

4.4.2. Multiplicação bacteriana em meio sólido

Para selecionar mutantes de *A. ferrooxidans* S, em meio sólido, um volume de 500 µL de suspensão celular (item 4.2) foi diluído em um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de Tween-80 0,25% (v/v). A suspensão celular após diluição foi transferida para uma placa de Petri (sem meio de cultura) e exposta à radiação ultravioleta nos seguintes tempos (s): 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180 e 300. Para os experimentos de radiação utilizou-se o short-wave como comprimento de onda (+/- 260nm, *Chromato – Vue – Mfd. By Ultraviolet Products*), a uma distância aproximada de 20 cm da suspensão celular. Após exposição, uma alíquota da suspensão irradiada foi inoculada em placa de Petri contendo meio T&K completo com agarose 0,45% (m/v). As placas foram incubadas a 30°C até aparecimento das colônias (aproximadamente 20 dias). Todo o experimento foi realizado na ausência de luz branca, devido ao processo de fotorreativação. Após radiação por ultravioleta em diferentes tempos, uma curva de sobrevivência do *A. ferrooxidans* em meio sólido foi traçada, o que permitiu analisar a porcentagem de sobrevivência das colônias em função do tempo (s) de radiação.

Colônias dos possíveis mutantes obtidos foram retiradas do meio sólido e transferidas para meio T&K completo. Esses possíveis mutantes foram analisados quanto à oxidação de íons Fe^{2+} na presença de íons Cl^{-}, da calcopirita e da pirita, através de experimentos de respirometria.

4.5. Estudos fisiológicos de *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes

Estudos fisiológicos dos possíveis mutantes de *A. ferrooxidans* S foram realizados através de experimentos de respirometria, em comparação com a linhagem selvagem.

4.5.1. Experimentos de respirometria

A respirometria é uma técnica que permite estudar o metabolismo de células vivas, como por exemplo, o processo de oxidação de diferentes substratos energéticos (TUOVINEN; DISPIRITO, 1984). Esse estudo é possível, pois, trata-se de uma técnica que envolve a determinação de volume gasoso ocorrido durante as reações a serem investigadas. Praticamente, todas as reações bioquímicas que determinam trocas gasosas podem ser quantificadas por esta técnica. Como vantagens deste experimento podem ser citadas a obtenção rápida de resultados quantitativos e expressivos, conhecimento da cinética de reação, gasto reduzido com substrato e operação simples. Por outro lado, uma desvantagem é a pouca indicação do mecanismo do processo. Nos experimentos de respirometria, as células utilizadas não estão em divisão celular, ou seja, as células são privadas de nutrientes, sobretudo CO_2.

Nos experimentos de respirometria foi utilizada a suspensão celular (item 4.2), sendo necessária a quantificação das proteínas totais das células. Células provenientes de 1 mL da suspensão celular foram suspensas em 1 mL de NaOH 1 mol L^{-1} e mantidas em banho fervente por 30 min para lise celular. Proteínas totais do lisado foram quantificadas pela metodologia de Hartree (1972). As soluções utilizadas na quantificação de proteínas totais estão descritas abaixo.

Solução A:

$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$	0,5 g
Na_2CO_3	25,0 g
NaOH 1 mol L^{-1}	125,0 mL

Água destilada	250,0 mL

Solução B:

$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$	0,2 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,1 g
NaOH 1 mol L^{-1}	1,0 mL
Água destilada	9,0 mL

Solução C (preparada no momento do uso):

Reagente de Folin-Ciocalteu	10,0 mL
Água destilada	30,0 mL

A metodologia descrita por Hartree, consiste em adicionar 0,9 mL da solução A à solução de proteínas, em diluição apropriada. Após 10 min em banho-maria à 50ºC, a solução foi resfriada à temperatura ambiente. À mistura adicionou-se 0,1 mL da solução B e manteve-se à temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, foram adicionados 3 mL da solução C. Após incubação por 10 min a 50ºC e, resfriamento à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (*FEMTO* 600 S) no comprimento de onda de 650 nm. A curva padrão foi obtida utilizando-se soroalbumina bovina 0,5 g L^{-1}.

Após a quantificação das proteínas totais, um volume máximo de 500 µL de suspensão celular, contendo 500 µg mL^{-1} de proteína total, foi submetido a ensaios respirométricos para avaliar a oxidação da calcopirita e da pirita, além de avaliar o efeito de íons Cl^- durante a oxidação de íons Fe^{2+}.

Os ensaios foram conduzidos em um equipamento de *Warburg* (Figura 3) em frascos de 25 mL, que consistem, basicamente, de um frasco de reação com um reservatório lateral para adição das células (Figura 4).

Figura 3. Respirômetro de *Warburg*.

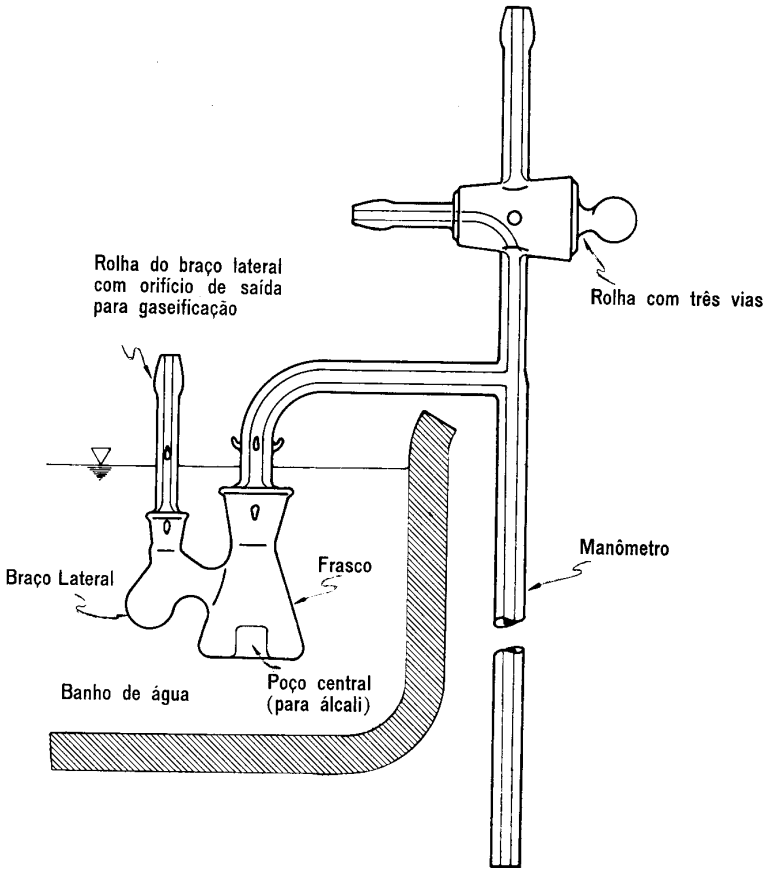

Figura 4. Conjunto de reação utilizado no respirômetro de *Warburg*.

Para avaliar a oxidação bacteriana de sulfetos minerais foram colocados no compartimento principal do frasco, onde ocorrem as reações a serem investigadas, 200 mg de calcopirita ou de pirita e água ácida (pH 1,8) para um volume final de 3 mL (incluindo o volume da suspensão celular). Frasco-controle foi realizado em paralelo, nas mesmas condições dos anteriores, porém sem adição da suspensão celular, completando-se o volume para 3 mL com água ácida.

Para avaliar a oxidação bacteriana de íons Fe^{2+}, na presença de diferentes concentrações de íons Cl^-, foram colocados no compartimento principal do frasco 120 mmol L^{-1} do substrato energético e cloreto de sódio nas concentrações adequadas (0, 100 e 200 mmol L^{-1}). Frasco-controle foi realizado em paralelo, nas mesmas condições dos anteriores, porém sem de íons Cl^-, completando-se o volume para 3 mL com água ácida.

Um volume de 0,1 mL de KOH 20% (m/v), embebido em um papel de filtro, foi colocado no poço central para consumo do CO_2 existente no interior de cada frasco, a fim de impedir a multiplicação celular de *A. ferrooxidans*.

Para execução do ensaio foi acoplado ao frasco de reação um manômetro graduado (Figura 4) contendo um líquido de densidade conhecida. O manômetro é constituído de dois ramos, que se comunicam entre si em suas bases através de um tubo de borracha obturado na extremidade inferior. O ramo esquerdo do manômetro permanece constantemente aberto durante o experimento e o da direita termina no frasco de reação. Durante o experimento de respirometria, haverá uma diminuição da pressão e o menisco do líquido se elevará. Essa diferença indicada em milímetros na escala graduada foi transformada em volume gasoso expresso em microlitros (μL). Para tanto, multiplicou-se a variação da altura em milímetros por uma constante (K), cujo cálculo é:

$$K = \frac{(VT - Vf) \times 273/T + Vf \times a}{Po}$$

Onde: VT = volume do conjunto frasco-manômetro (indicado no próprio conjunto)

Vf = volume final do sistema experimental (~ 3,0 mL)

T = 273 + t (temperatura de trabalho)

a = coeficiente de solubilidade de um gás na água

Po = pressão do fluido manométrico (10,032 mm)

Com os frascos experimentais foi colocado um conjunto (frasco-manômetro) chamado termobarômetro, contendo água destilada no mesmo volume do sistema experimental. Esse conjunto indicou variações de pressão causadas por mudanças da temperatura no ambiente. O volume de oxigênio consumido pela suspensão celular durante os experimentos foi considerado descontando a variação da pressão observada no termobarômetro.

Os conjuntos (frasco-manômetro) foram mantidos em banho-maria a 30°C e 150 batidas min^{-1}. Os experimentos de respirometria foram realizados em triplicata, sendo que o consumo de oxigênio (μL) foi expresso como uma média dos valores das réplicas em cada intervalo de tempo (min).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anteriormente à exposição ao ultravioleta, *A. ferrooxidans* S foi repurificado em meio sólido utilizando-se a suspensão celular (item 4.2.) diluída adequadamente para $1x10^{-3}$, $1x10^{-4}$, $1x10^{-5}$ e $1x10^{-6}$ (Figura 5). Esses resultados preliminares foram fundamentais para definir as diluições a serem utilizadas nos experimentos de radiação por ultravioleta. Na diluição de $1x10^{-3}$ ocorreu um crescimento colonial massivo, dificultando, assim, a visualização das colônias (Figura 5A). Na diluição de $1x10^{-6}$ foi observado um número reduzido de colônias, e pelo fato de que, provavelmente, a incidência de radiação ultravioleta afetará a multiplicação bacteriana, diminuindo ainda mais o número de colônias, essa diluição não foi utilizada nos experimentos de radiação (Figura 5D). Portanto, observou-se que as melhores diluições para os experimentos de mutação induzida foram de $1x10^{-4}$ e $1x10^{-5}$, nas quais as colônias apresentaram-se bem isoladas e facilmente contáveis (Figuras 5B e 5C).

5.1. Exposição à radiação ultravioleta

5.1.1. Análise da multiplicação bacteriana em meio líquido

Experimentos de exposição de *A. ferrooxidans* S à radiação ultravioleta foram realizados, a fim de se obter uma resposta rápida da ação desse mutagênico físico na oxidação bacteriana dos íons Fe^{2+}, em meio líquido.

A Figura 6 mostra a multiplicação das possíveis linhagens mutantes, em meio T&K completo, após radiação por ultravioleta em diferentes tempos (0, 10, 30, 60, 90, 120, 180 e 300 s), em comparação com a linhagem S selvagem. Diferenças na multiplicação celular foram analisadas pela variação da taxa de oxidação de íons Fe^{2+}.

Na Figura 6, a fase lag de multiplicação de *A. ferrooxidans* S selvagem não foi mostrada, porém o final dessa fase de adaptação das células ao substrato energético ocorreu em, aproximadamente, 7 h, como observado em outros experimentos prévios. Por outro lado, o final da fase lag de multiplicação das

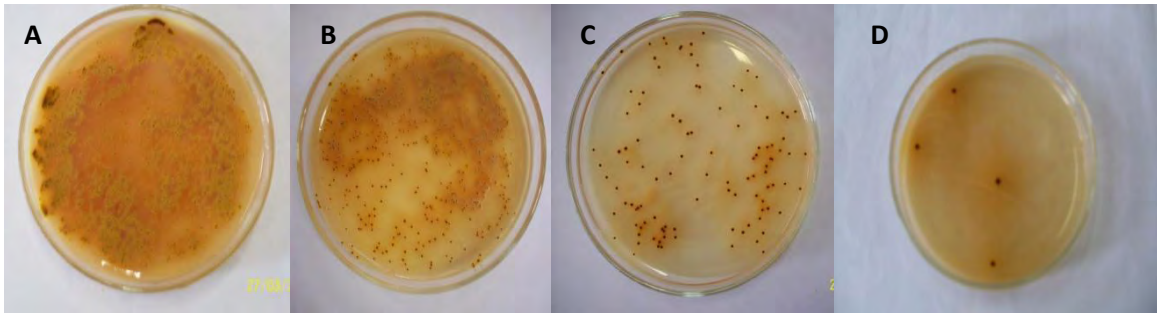

Figura 5. Placas com colônias de *A. ferrooxidans* S. A suspensão celular foi diluída adequadamente para: $1x10^{-3}$ (A); $1x10^{-4}$ (B); $1x10^{-5}$ (C) e $1x10^{-6}$ (D).

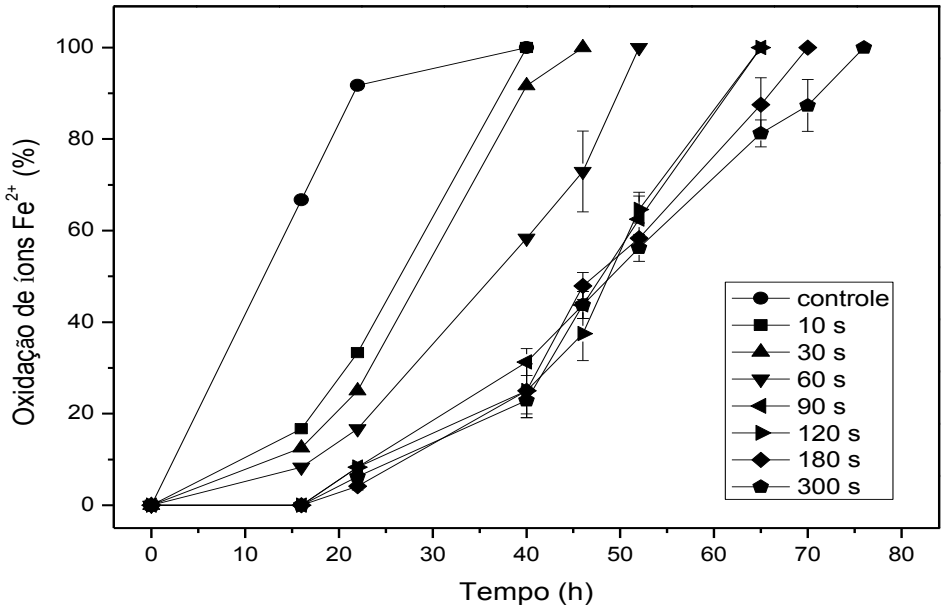

Figura 6: Porcentagem de oxidação de íons Fe^{2+} por células de *A. ferrooxidans* S expostas à radiação ultravioleta em diferentes tempos.

possíveis linhagens mutantes ocorreu em aproximadamente 15 h após exposição ao ultravioleta (Figura 6). Provavelmente, o prolongamento da fase lag para as possíveis linhagens mutantes seja decorrente de uma morte celular durante o experimento de exposição.

Em virtude dessa provável morte celular, a fase log de multiplicação dos possíveis mutantes também ficou comprometida, ou seja, a oxidação total de íons Fe^{2+} ocorreu em tempos diferentes e maiores ao tempo observado para a linhagem selvagem. O final da fase log para o controle (*A. ferrooxidans* S selvagem) ocorreu aproximadamente após 24 h da exposição (Figura 6). Por outro lado, o final da fase log dos possíveis mutantes foi influenciado pelo tempo de exposição, atingindo, por exemplo, 75 h para as células irradiadas por 300 s (Figura 6).

O processo de oxidação do substrato energético Fe^{2+}, provavelmente, não foi afetado pelo mutagênico físico, já que após a radiação os possíveis mutantes oxidaram completamente esse íon.

A influência da radiação ultravioleta na oxidação de íons Fe^{2+}, também foi observada para a linhagem LR de *A. ferrooxidans* (AUGUSTO, 2008). Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biohidrometalurgia do Instituto de Química-UNESP-Araraquara-SP, pela aluna de Graduação em Química Ana Elisa Comanini Augusto. Os resultados obtidos mostraram que o mutagênico físico afetou a multiplicação bacteriana, sendo que após 300 s de exposição, toda a fonte energética foi oxidada pelos possíveis mutantes em 65 h, aproximadamente, 30 h a mais que a oxidação pela linhagem selvagem.

5.1.2. Análise da multiplicação bacteriana em meio sólido

As células de *A. ferrooxidans* S nas diluições $1x10^{-4}$ e $1x10^{-5}$ foram irradiadas por ultravioleta em diferentes tempos (0, 10, 30, 60, 90, 120, 180 e 300 s) e plaqueadas em meio sólido. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Sobrevivência de *A. ferrooxidans* S em meio sólido após exposição à radiação ultravioleta.

Tempo de exposição	Número de colônias		Média do nº de colônias	% de sobrevivência
	Réplica 1	Réplica 2		
Supensão celular diluída para $1x10^{-4}$				
Controle	115	110	112,5	100,00
10 s	3	22	12,5	11,11
30 s	1	0	0,5	0,44
60 s	1	2	1,5	1,33
90 s	1	0	0,5	0,44
120 s	1	0	0,5	0,44
180 s	5	0	2,5	2,22
300 s	0	0	0	0
Supensão celular diluída para$1x10^{-5}$				
Controle	10	0	5	100,00
10 s	1	0	0,5	10,00
30 s	1	0	0,5	10,00
60 s	2	1	1,5	30,00
90 s	5	4	4,5	90,00
120 s	2	2	2	40,00
180 s	3	0	1,5	30,00
300 s	1	1	1	20,00

Embora os resultados obtidos não terem apresentados boa reprodutibilidade experimental, pode-se notar que a radiação por ultravioleta afetou a multiplicação bacteriana em meio sólido (Tabela 2).

Devido à discrepância dos resultados e por não haver reprodutibilidade experimental, não foi possível obter uma curva de sobrevivência dos possíveis mutantes após radiação por ultravioleta. Portanto, outros experimentos foram realizados com o objetivo de obter a reprodutibilidade no número de colônias e a curva de sobrevivência dos possíveis mutantes após a radiação. Os experimentos foram realizados com a suspensão celular (item 4.2.) diluídas para $1x10^{-4}$, pois se observou um número reduzido de colônias após diluição das células para $1x10^{-5}$, provavelmente devido à morte celular provocada pela radiação ultravioleta (Tabela 2).

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com a suspensão celular diluída para $1x10^{-4}$ estão mostrados na Tabela 3. Uma diminuição no número de colônias foi observada em relação ao tempo de exposição à radiação ultravioleta (Tabela 3). Após 30 s de radiação, a porcentagem de sobrevivência dos possíveis mutantes foi de aproximadamente 50%, sendo que essa porcentagem diminuiu com o aumento do tempo de exposição. Após 300 s de exposição foram obtidos 10% de sobrevivência dos possíveis mutantes em meio sólido, em comparação ao controle (Tabela 3).

Com os resultados obtidos foi possível obter uma curva de sobrevivência dos possíveis mutantes de *A. ferrooxidans* S após radiação por ultravioleta (Figura 7). Inicialmente, duas colônias de possíveis mutantes de *A. ferrooxidans* S, denominadas S300 e S301, foram re-isoladas após 300 s de exposição por radiação ultravioleta. Esses possíveis mutantes foram analisados quanto à oxidação de íons Fe^{2+} em meio líquido. Além do mais, foram analisados quanto à oxidação bacteriana da calcopirita, pirita e influência de íons Cl^- na oxidação de íons Fe^{2+}, por experimentos de respirometria em comparação com a linhagem S selvagem.

Tabela 3. Sobrevivência de *A. ferrooxidans* após exposição à radiação ultravioleta em meio sólido na diluição $1x10^{-4}$.

Tempo de exposição (s)	Número de colônias			Média do nº de colônias	% de sobrevivência
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
Supensão celular diluída para $1x10^{-4}$					
0 (cont)	1898	1666	1428	1664	100,00
10	1135	1299	1013	1149	69,05
30	914	820	754	829	49,81
60	650	675	625	650	30,06
90	560	438	415	471	28,30
120	390	375	391	385	23,13
180	331	302	04	212	12,74
300	192	168	148	169	10,15

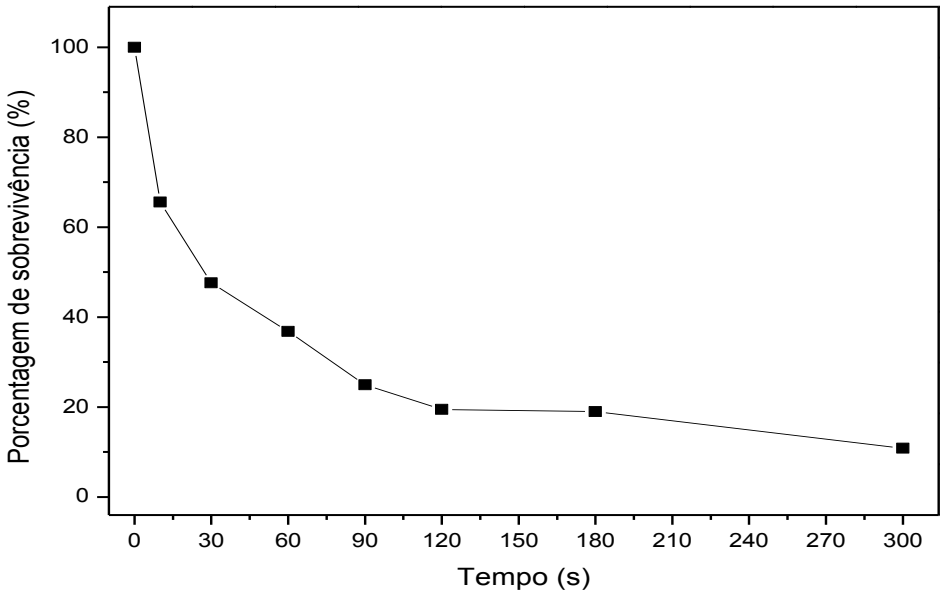

Figura 7. Curva de sobrevivência de células de *A. ferrooxidans* S em meio sólido após radiação por ultravioleta. A suspensão celular utilizada foi diluída para $1x10^{-4}$.

Uma curva de sobrevivência de células de *A. ferrooxidans* linhagem LR após radiação por ultravioleta mostrou que esse agente mutagênico afetou a multiplicação celular em 50% após 30 s de exposição (MUKAI, 1990). Porcentagem essa de sobrevivência obtida também nos experimentos aqui apresentados.

Portanto, a radiação por ultravioleta é um poderoso agente mutagênico, pois causou morte celular de células de *A. ferrooxidans*, como observado nos experimentos aqui apresentados e por relatos de Mukai (1990).

5.2. Estudos fisiológicos de *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes

Alguns estudos fisiológicos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito da radiação por ultravioleta no metabolismo dos possíveis mutantes obtidos (S300 e S301). A oxidação de íons Fe^{2+} pelos possíveis mutantes foi analisada, bem como a oxidação dos sulfetos minerais calcopirita e pirita, em comparação com a linhagem selvagem.

5.2.1. Análise da oxidação bacteriana de íons Fe^{2+}

Os possíveis mutantes (S300 e S301) re-isolados de meio sólido foram analisados quanto à oxidação bacteriana de íons Fe^{2+}, em comparação com a linhagem S selvagem. A multiplicação bacteriana em meio T&K completo foi monitorada, sendo obtida uma curva de oxidação de íons Fe^{2+} pelas possíveis linhagens mutantes (Figura 8).

A Figura 8 mostra que todas as fases de multiplicação dos possíveis mutantes foram idênticas às apresentada pela linhagem S selvagem. A oxidação total dos íons Fe^{2+}, medida de multiplicação de *A. ferrooxidans*, ocorreu no mesmo tempo para as linhagens selvagem e possíveis mutantes (Figura 8). Sendo assim, pelos resultados obtidos, observou-se que o processo de oxidação de íons Fe^{2+} pelas possíveis

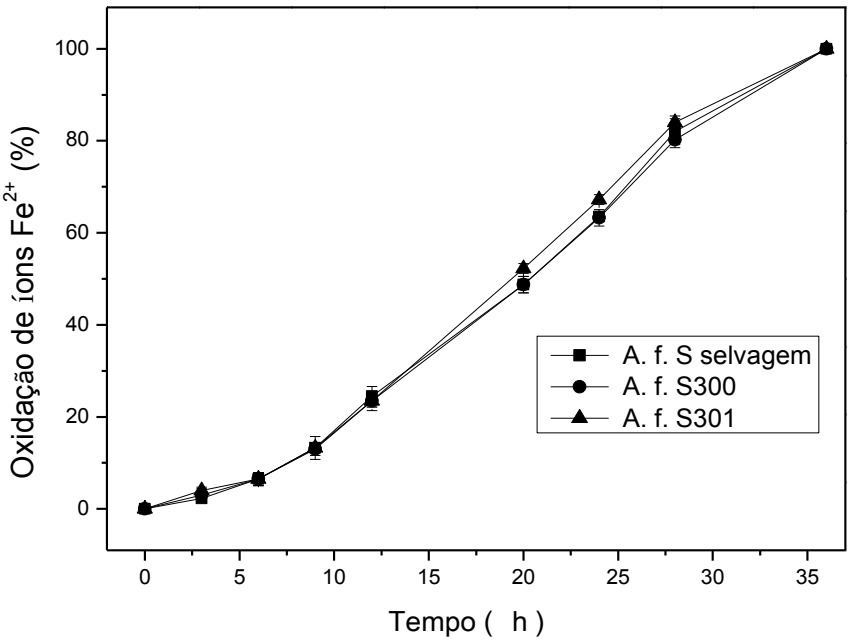

Figura 8. Oxidação dos íons Fe^{2+} por células de *A. ferrooxidans* S e possíveis mutantes *A. ferrooxidans* S300 e S301. A oxidação dessa fonte energética foi monitorada durante a multiplicação celular em meio líquido.

linhagens mutantes não foi influenciado pela exposição à radiação ultravioleta.

5.2.2. Avaliação fisiológica das possíveis linhagens mutantes através de experimentos de respirometria celular

Alguns processos fisiológicos das possíveis linhagens mutantes foram analisados por experimentos de respirometria celular, pois trata-se de uma técnica de obtenção rápida de resultados quantitativos, além da possibilidade de analisar a cinética de reações, como por exemplo, a oxidação de íons Fe^{2+} ou de sulfetos minerais.

5.2.2.1. Análise da oxidação bacteriana de íons Fe^{2+} na presença de íons Cl^-

Embora diferenças na oxidação de íons Fe^{2+} das possíveis linhagens mutantes em comparação com a linhagem selvagem não foram observadas (Figura 8), a oxidação bacteriana dessa fonte energética foi analisada na presença de íons Cl^-, através de experimentos de respirometria celular.

Estudos mostraram o efeito acelerador dos íons Cl^- no processo de dissolução de sulfetos minerais (WINAND, 1991; LU; JEFFREY; LAWSON, 2000a, 2000b). O objetivo dos experimentos aqui realizados foi analisar a capacidade oxidativa de íons Fe^{2+} pelos possíveis mutantes na presença de íons Cl^-. Uma linhagem mutante resistente a esses íons poderia ser utilizada na otimização de processos na biohidrometalurgia, especialmente na oxidação bacteriana da calcopirita.

A Figura 9 mostra a oxidação dos íons Fe^{2+} por *A. ferrooxidans* S linhagem selvagem (Figura 9A) e possíveis mutantes (Figura 9B e 9C) na presença de diferentes concentrações de íons Cl^-. Embora, em algumas réplicas experimentais, o desvio padrão tenha sido alto, pode se observar que a concentração de 100 mmol L^{-1} de íons Cl^- não influenciou na oxidação de íons Fe^{2+} pelas linhagens testadas, quando comparado com a respectiva condição controle (Figura 9).

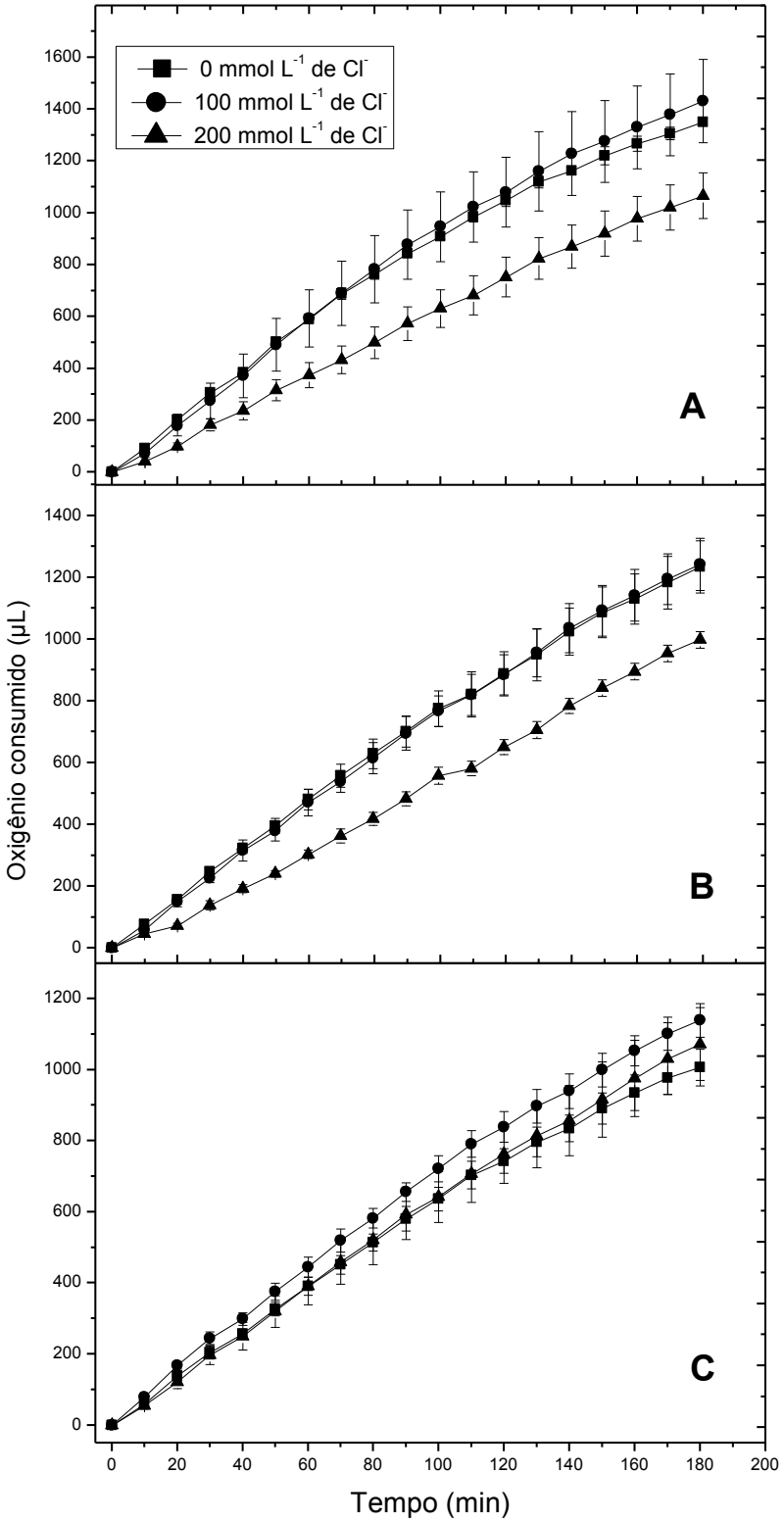

Figura 9. Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem (A) e possíveis mutantes S300 (B) e S301 (C), na presença de íons Fe^{2+} e Cl^{-}. O consumo de oxigênio (µL) foi medido, em triplicata, depois que as células foram adicionadas à fonte energética (íons Fe^{2+}). O controle foi realizado na ausência de íons Cl^{-}.

Por outro lado, a concentração de 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- influenciou na oxidação de íons Fe^{2+} pelas linhagens S selvagem (Figura 9A) e possível mutante S300 (Figura 9B), pois o consumo de oxigênio nessa condição foi menor do que o observado nos respectivos controle.

Para o possível mutante S301, a oxidação de íons Fe^{2+} não foi influenciada pela concentração de 200 mmol L^{-1} de íons Cl^-, pois o consumo de oxigênio foi semelhante ao observado no respectivo controle (Figura 9C). Outros experimentos poderão ser realizados a fim de analisar o efeito de concentrações de íons Cl^- maiores que 200 mmol L^{-1}, na oxidação de íons Fe^{2+} pela possível linhagem mutante.

Sendo assim, com os resultados obtidos pode se concluir que a oxidação de íons Fe^{2+} na ausência e presença de íons Cl^- foi semelhante para todas as linhagens testadas, em comparação aos respectivos controles. A radiação por ultravioleta provavelmente, não afetou nenhuma via metabólica de *A. ferrooxidans* que pudesse conferir tolerância bacteriana a íons Cl^-.

A baixa tolerância de *A. ferrooxidans* a 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- foi também observada em ensaios de biolixiviação da calcopirita (MELO, 2010). A autora observou em tais ensaios que a concentração de 100 mmol L^{-1} de íons Cl^- afetou parcialmente a atividade bacteriana oxidativa dos íons Fe^{2+} e que a concentração de 200 mmol L^{-1} de íons Cl^- foi totalmente inibitória para a bactéria, impedindo assim, a atividade oxidativa da mesma.

5.2.2.2. Análise da oxidação bacteriana da calcopirita

A Figura 10 mostra o consumo de oxigênio das possíveis linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* (S300 e S301) em comparação com a linhagem S selvagem na presença do sulfeto mineral calcopirita. O consumo de oxigênio foi resultado principalmente do metabolismo bacteriano, já que na ausência de células de *A. ferrooxidans* o consumo devido à oxidação química foi mínimo (Figura 10).

O consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* selvagem e possíveis mutantes na presença desse sulfeto de cobre foi igual nos primeiros 10 min de experimento

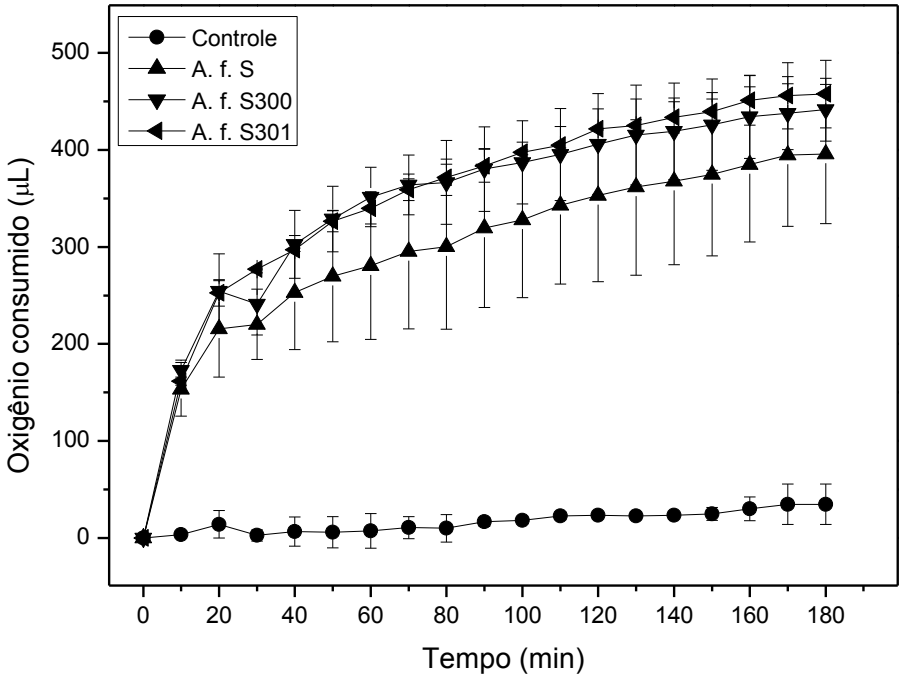

Figura 10. Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes S300 e S301, na presença de calcopirita. O consumo de oxigênio (μL) foi medido, em triplicata, depois que as células foram adicionadas ao mineral. O controle foi realizado na ausência de suspensão celular.

(Figura 10). Não foi possível analisar a oxidação da calcopirita pelas linhagens testadas após 10 min de experimento, devido ao alto desvio padrão observado nas curvas obtidas. Portanto, não foi possível afirmar que houve diferenças na oxidação da calcopirita pelas linhagens selvagem e possíveis mutantes (Figura 10). Outros experimentos de respirometria celular foram realizados, porém o mesmo resultado foi obtido.

5.2.2.3. Análise da oxidação bacteriana da pirita

A oxidação da pirita pelas possíveis linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* (S300 e S301) foi analisada por experimentos de respirometria, em comparação com linhagem S selvagem (Figura 11). O consumo de oxigênio foi resultado da oxidação bacteriana da pirita, já que na ausência de células o consumo devido à oxidação química foi praticamente zero (Figura 11).

A Figura 11 mostra que o consumo de oxigênio na presença de pirita foi praticamente igual para todas as linhagens testadas. Com esse resultado pode se observar que, provavelmente, a radiação ultravioleta não afetou a via metabólica de oxidação da pirita na bactéria *A. ferrooxidans* S.

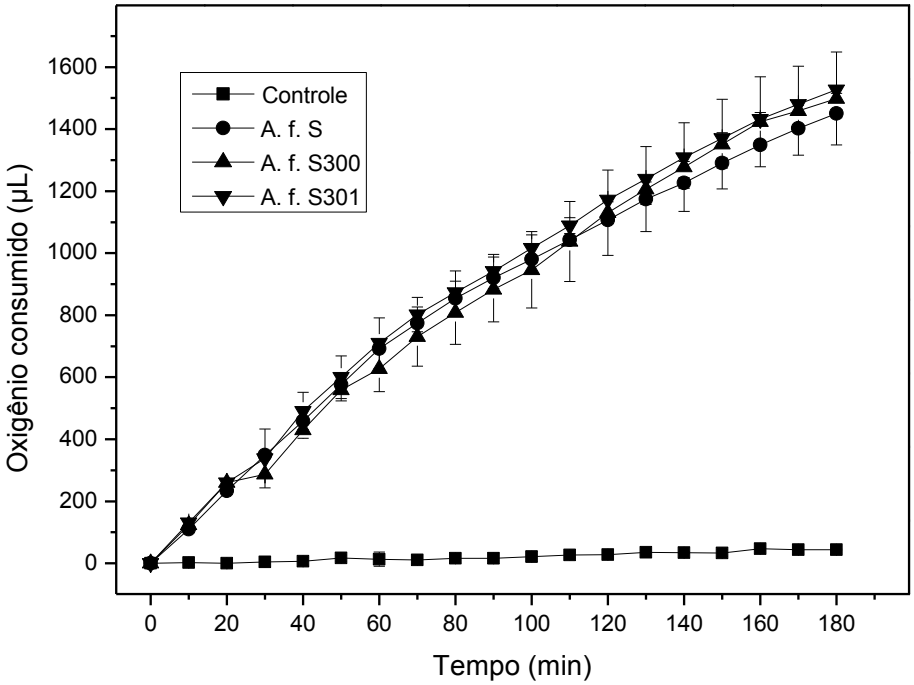

Figura 11. Consumo de oxigênio por *A. ferrooxidans* S linhagens selvagem e possíveis mutantes S300 e S301, na presença de pirita. O consumo de oxigênio (µL) foi medido, em triplicata, depois que as células foram adicionadas ao mineral. O controle foi realizado na ausência de suspensão celular.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A radiação ultravioleta afetou a multiplicação bacteriana de *A. ferrooxidans* linhagem S, tanto em meio líquido quanto em meio sólido;
- ✓ Possivelmente o prolongamento das fases de multiplicação de *A. ferrooxidans* S, em meio líquido, seja decorrente de morte celular durante o experimento de exposição;
- ✓ Após 300 s de exposição foram obtidos 10% de sobrevivência dos possíveis mutantes em meio sólido, em comparação ao controle;
- ✓ A possível mutação que ocorreu na via de oxidação de íons Fe^{2+} em *A. ferrooxidans* S, provavelmente foi reparada, pois as linhagens selvagem e possíveis mutantes (S300 e S301) oxidaram totalmente essa fonte energética no mesmo tempo;
- ✓ Os íons Cl^- na concentração de 100 mmol L^{-1} não afetaram a oxidação de íons Fe^{2+} por todas as linhagens testadas, quando comparado a respectiva condição controle;
- ✓ Os íons Cl^- na concentração de 200 mmol L^{-1} afetaram de forma parcial a atividade bacteriana reduzindo em até 30% o total de oxigênio consumido pela bactéria;
- ✓ Através dos experimentos de respirometria não foi possível observar aumento no consumo de oxigênio na presença dos sulfetos minerais calcopirita e pirita pelas possíveis linhagens mutantes em relação à linhagem S selvagem;
- ✓ Provavelmente, a radiação ultravioleta não provocou uma mutação permanente, pois os estudos fisiológicos analisados não mostraram diferenças entre *A. ferrooxidans* linhagens S selvagem e possíveis mutantes.

REFERÊNCIAS

AUGUSTO, A. E. C. **Obtenção de linhagens mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* por radiação ultravioleta**. 2010. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

AZEVEDO, J. L. Mutação e agentes mutagênicos. In AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Genética de micro-organismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba: FEALQ, 1985. cap. 2, p. 11-16.

BALLESTER, A.; CÓRDOBA, E. Hidrometalurgia de la calcopirita: innovations in the hydrometallurgical processing of sulphides. In: HYDROCOPPER, 4th, 2005, Santiago. **Proceedings**… Santiago: [s.n.], 2005.

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

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

BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 59, p. 233-239, 2001.

CABRERA, G.; GOMEZ, J. M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulfate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2683-2687, 2005.

CARNEIRO, M. F. C.; LEÃO, V. A. The role of sodium chloride on surface properties of chalcopyrite leached with ferric sulphate. **Hydrometallurgy**, v. 87, p. 73-82, 2007.

CIMINELLI, V. S. T. Hidrometalurgia. In: FERNANDES, R. C. **Tendências tecnológicas Brasil 2005** – geociências e tecnologia mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. cap. 4, p. 157-174.

DÉOUX, S.; DÉOUX, P. **Ecologia é a saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 2000.

EVANGELOU, V. P.; ZHANG, Y. L. A review: pyrite oxidation mechanisms and acid drainage prevention. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 141-199, 1995.

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

GARCIA JUNIOR, O.; BEVILAQUA, D. **Microbiologia ambiental**: micro-organismos, minerais e metais. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa, 2008, p. 49-81.

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

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

GROUDEVA, V. I.; GROUDEV, S. N. Strain improvement of *Thiobacillus ferrooxidans* for the purpose of leaching of copper sulphide mineral. In: MEETING OF MINERS AND METALLURGISTS, TECHNICAL FACULTY, 12., 1980, Bor. **Proceedings…** Bor: 1980. v. 2, p. 354-364.

HACKL, R. P.; DREISINGER, D. B.; PETERS, E.; KING, J. A. Passivation of chalcopyrite during oxidative leaching in surfate media. **Hydrometallurgy**, v. 39, p. 25-48, 1995.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

JOHNSON, D. B.; HALLBERG, K. B. The microbiology of acid 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.

KLAUBER, C. Fracture reconstruction of a chalcopyrite $CuFeS_2$ surface. **Surface and Interface Analysis**, v. 35, p. 415-428, 2003.

KLAUBER, C. A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopyrite with regards to hindered disolution. **International Journal of Mineral Processing**, v. 86, p. 1-17, 2008.

KOCH, D. F. A. Electrochemistry of sulfide minerals. In: BOCKRIS, J. O. M. **Modern aspects of electrochemistry**. New York: Plenum Press, 1975. cap. 4, p. 211-237.

KULPA, C. F.; ROSKEY, M.; MJOL, I. Construction of genomic libraries and induction of iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 92, p. 330-341, 1986.

LEÃO, M. A. C. **Princípios da biofísica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

LIDDICOAT, J.; DREISINGER, D. Chloride leaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 89, p. 323-331, 2007.

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, 2000a.

LU, Z. Y.; JEFFREY, M. I.; LAWSON, F. An electrochemical study of the effect of chloride ions on the dissolution of chalcopyrite in acidic solutions. **Hydrometallurgy**, v. 56, p. 145-155, 2000b.

LUZ, A. B. da; LINS, F. A. F. Introdução ao tratamento de minério. In: LUZ, A. B. da; SAMPAIO, J. A.; ALMEIDA, S. L. M. de (Eds.). **Tratamento de minérios**. 4. ed. Rio de Janeiro: CETEM-MCT, 2004. cap. 1, p. 3-14.

MARSDEN, J.; HOUSE, L. **The chemistry of gold extraction**. Chichester: Ellis Horwood, 1992.

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.

MENG, C.; SHI, X.; LIN, H.; CHEN, J.; GUO, Y. UV induced mutations in *Acidianus brierleyi* growing in a continuous stirred tank reactor generated a strain with improved bioleaching capabilities. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1136-1140, 2007.

MUKAI, J. K. **Efeito do Tween-80 no crescimento de *Thiobacillus ferrooxidans* em meio sólido**. 1990. 22 f. Monografia – (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1990.

NOVELLO, A. P. F. **Análise proteômica diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita**. 2008. 189 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

QUATRINI, R.; JEDLICKI, E.; HOLMES, D. S. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans.* **Journal Industries Microbiology Biotechnology**, v. 32, p. 606-614, 2005.

PUVVADA, G. V. K.; MURTHY, D. S. R. Selective precious metals leaching from a chalcopyrite concentrate using chloride/hypochlorite media. **Hydrometallurgy**, v. 58, p. 185-191, 2000.

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

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

RITCHIE, A. I. M. The waste-rock environment. In: JAMBOR, J.L.; BLOWES, D.W. (Eds.): **Short course handbook on environmental geochemistry of sulfide mine waste**. Nepean: Mineralogical Association of Canada, v. 22, p. 133-161, 1994.

RODRIGUES, E. M.; GUIMARÃES, C. S. **Manual de recursos fisioterapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

ROJAS, J. J. G. Biotecnologia en la disolucion y recuperacion de metales. In: CONGRESSO PERUANO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOENGENHARIA, 135., 1998, Trujillo. **Resumen**... Trujillo, 1998. p. 216-222.

ROSSI, G. **Biohydrometallurgy**. New York: McGraw-Hill, 1990.

SKROBIAN, M.; HAVLIK, T.; UKASIK, M. The effect of NaCl concentration and particle size on chalcopyrite leaching in cupric chloride solution. **Hydrometallurgy**, v. 77, p. 109-114, 2005.

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

STOTT, M. B.; WATLING. H. R.; FRANSMANN, P. D.; SUTTON, D. The role of iron – hidroxy precipitates in passivation of chalcopyrite during bioleaching. **Minerals Engineering**, v.13, p. 119-132, 2000.

TUOVINEN, O.H.; DISPIRITO, A. A. Biological transformation and accumulation of uranium with emphasis on *Thiobacillus ferrooxidans*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AMERICAN SOCIETY MICROBIAL, 3rd**,** 1984, East Lansing. **Proceedings**… East Lansing: Michigan State University, 1984. p. 608-614.

TUOVINEN, O. H.; KELLY, D. P. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable number and comparison $^{14}CO_2$ fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archives of Microbiology**, n. 88, p. 285-298, 1973.

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

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

VILCÁEZ, J.; SUTO, K.; INOUE, C. Bioleaching of chalcopyrite with thermophiles: temperature-pH-ORP dependance. **International Journal of Mineral Processing**, v. 88 p. 37-44, 2008.

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

WINAND, R. Chloride hydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 27, p. 285-316, 1991.

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.