



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UNESP – Instituto de Química/Campus Araraquara

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



MARIANA ARAÚJO COSTA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTANTES DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*
QUANTO À CAPACIDADE DE LIXIVIAR MINÉRIOS DE COBRE.**

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Denise Bevilaqua

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2014

MARIANA ARAÚJO COSTA

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTANTES DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*
QUANTO À CAPACIDADE DE LIXIVIAR MINÉRIOS DE COBRE.**

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

Orientadora: Prof. Dra. Denise Bevilaqua

Araraquara/SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

C837o Costa, Mariana Araújo
Obtenção e avaliação de mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* quanto à capacidade de lixiviar minérios de cobre / Mariana Araújo Costa. – Araraquara : [s.n], 2014
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Denise Bevilaqua

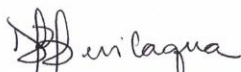
1. Biotecnologia. 2. Calcopirita. 3. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. 4. Mutação. I. Título.

MARIANA ARAÚJO COSTA

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

Araraquara, 17 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. DENISE BEVILAQUA (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. PAULO TEIXEIRA LACAVA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar / São Carlos



Prof^a. Dr^a. ANA TERESA LOMBARDI
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar / São Carlos

DADOS CURRICULARES

MARIANA ARAÚJO COSTA

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 08/05/1987

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Campo Belo/MG

Filiação: Jovani de Araújo Costa e Filomena Margarida Pinto da Costa

Estado Civil: Solteira

Profissão: Biotecnologista

Documento de Identidade: 12.047.552 SSP/MG

Cadastro de Pessoa Física: 089.561.966-05

Endereço: Rua Policeno Maia, 95, Cruzeiro

Campo Belo/MG

37270-000

e-mail: marianabiotec@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG, concluído em Dezembro de 2011.

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Apresentação de trabalhos em congressos científicos

- COSTA, M. A.; SANTOS, A.L.A.; BEVILAQUA, D. Obtenção e avaliação de mutantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* quanto à capacidade de oxidação de ferro e enxofre. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Natal-RN. 2013

- COSTA, M. A. ; BEVILAQUA, D. Mutants obtention of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR by ultraviolet and kinect evaluation. In: 20th International Biohydrometallurgy Symposium, 2013, Antofagasta. Proceedings of 20th International Biohydrometallurgy Symposium. Santiago: Gecamin, 2013.

- COSTA, M. A.; LACAVA, P. T. ; BEVILAQUA, D. . Evaluation of the oxidation kinects of ferrous ion from bacterial consortium through ore enrichment with gold from Alta Floresta - MT- Brazil. In: QUIMICUBA 2012 Simposio Bioquimica y Biologia Molecula, 2012, Havana. QUIMICUBA 2012

- COSTA, M. A. ; LACAVA, P. T. ; BEVILAQUA, D. Avaliação da cinética de oxidação do íon ferroso do consórcio obtido a partir de minério contendo ouro de Alta Floresta-MT. XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia. Santos-SP-Brasil. 2012.

3.2 Resumos publicados em anais de congressos científicos

- COSTA, M. A. ; BEVILAQUA, D. Mutants obtention of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain LR by ultraviolet and kinect evaluation. In: 20th International Biohydrometallurgy Symposium, 2013, Antofagasta. Proceedings of 20th International Biohydrometallurgy Symposium. Santiago: Gecamin, 2013.

- COSTA, M. A.; LACAVA, P. T. ; BEVILAQUA, D. Evaluation of the oxidation kinects of ferrous ion from bacterial consortium through ore enrichment with gold from Alta Floresta - MT- Brazil. In: QUIMICUBA 2012 Simposio Bioquimica y Biologia

Molecula, 2012, Havana. QUIMICUBA 2012 Simposio Bioquímica y Biología Molecula, 2012. p. G-P-176.

- COSTA, M. A. ; LACAVA, P. T. ; BEVILAQUA, D. Avaliação da cinética de oxidação do íon ferroso do consórcio obtido a partir de minério contendo ouro de Alta Floresta-MT. XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia. Santos-SP-Brasil. 2012.

3.3 Participação em eventos

- 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Natal/RN, 2013.
- Agilent Road Show, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP, 2013.
- I Workshop da Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – IQ/UNESP, Araraquara/SP, 2012.
- XXI ALAM – Congresso Latino-americano de Microbiologia, Santos/SP, 2012.
- SIFEA – Simpósio de Fermentação Alcoólica, Santos/SP, 2012.
- III Jornada de Biotecnologia da UNIFAL-MG, Alfenas/MG, 2012.

3.4 Formação Complementar

- “Curso sobre Citometria de Fluxo”, oferecido pela BD-Biosciences em 13 de junho de 2012, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara/SP.
- Participação no “IX Curso Latinoamericano de Biotecnologia, CLAB 2012”, realizado entre 29 de julho e 4 de agosto de 2012, na Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, em Valparaíso, Chile.

*Dedico este trabalho a Deus
por me dar força, paciência e clareza.
Aos meus amados pais, Jovani e Filomena, pelo apoio.
Aos meus irmãos Larissa e Vitor pelo companherismo
e amizade.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, que é minha fonte de inspiração, força, sabedoria, esperança e tantas outras bênçãos que iluminam meu caminho e me ergue perante as dificuldades.

À Prof Dra Denise Bevilaqua pela orientação, por todo ensinamento, dedicação, preocupação e carinho. Destaco a paciência de conter os meus anseios e ansiedades durante a realização desta pesquisa, além de toda confiança depositada a mim.

As minhas amigas e companheiras Ana Laura, Íris, Josiane, Fabiana e Renata que com as nossas conversas me auxiliaram, me deram força para superar muitos obstáculos e que sei que levarei em meu coração.

Aos companheiros que estão presentes e passaram pelo laboratório de Biohidrometalurgia, Maiara, Mariana B., Victor Souza, Maurício, Stella e Wanessa de Melo.

Ao Waldenir Aparecido Menezes, que além do auxílio técnico nas tarefas do laboratório me deu sua grande amizade, momentos de alegrias com conversas, conselhos e risos durante todos estes 2 anos.

Aos meus amigos Evaldo, Heloizy, Michelle Andreatta, Timily, Daniela Almeida Guilherme, Ovídio que apesar de não participarem da minha rotina de trabalho apresentaram contribuições científicas importantes e amparo pessoal para a realização do trabalho. A todos aqueles amigos que mesmo distantes emitem boas vibrações e me fortalecem.

As meninas da seção de pós-graduação, principalmente a Wennia e Célia, pelo apoio e auxílio com os pepinos.

Aos meus pais por estarem ao meu lado, me guiando e ensinando a batalhar pelos meus objetivos, incentivando o uso do estudo como uma ferramenta para engradecer o homem, a ser uma pessoa melhor a cada dia, e superar os obstáculos enfrentados.

À minha querida irmã por me ajudar nas dificuldades, pela sua amizade incondicional, me erguendo com suas palavras e companheirismo e por estar tão presente em minha caminhada. Ao meu irmão Vitor por sua ajuda e amizade.

Ao GFQM-IQ pelas medidas de Difração de Raios X realizadas pelo Ricardo José Giagio.

Ao auxílio fornecido pelas meninas da biblioteca nas correções de minhas referências.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Meus eternos agradecimentos pelo apoio de todos vocês, sem vocês esse trabalho não teria se concretizado.

RESUMO

Com o advento dos bens de consumo industrializados, tornou-se maior a demanda por compostos minerais, sendo o cobre um dos metais mais utilizados para a produção de componentes tecnológicos, o que confronta a atual capacidade das mineradoras, uma vez que as jazidas vem se esgotando progressivamente e portanto apresentam teores cada vez menores. Neste contexto, a Biohidrometalurgia, processo que utiliza micro-organismos que promovem a dissolução de minérios sulfetados para otimização da extração do metal de interesse, apresenta-se como alternativa promissora e mais ambientalmente adequada para a recuperação de metais a partir de minérios de baixo teor. A maior parte do cobre presente na natureza encontra-se na forma de calcopirita, mas esse sulfeto mineral é altamente refratário ao ataque químico e biológico. Atualmente não há processo biohidrometalúrgico comercial em operação para a extração do cobre da calcopirita. A maior limitação para isso não está nos aspectos operacionais do processo, mas nos micro-organismos envolvidos nele. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi obter novas linhagens mutantes utilizando técnicas da genética clássica (radiação ultravioleta) a partir de uma das principais bactérias envolvida neste processo a *Acidithiobacillus ferrooxidans* e disponível em nosso banco de linhagens e avalia-las quanto à alguns dos parâmetros envolvidos no processo. Por meio da aplicação de radiação ultravioleta em diferentes tempos (0, 10, 15, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 e 7200 segundos) na linhagem selvagem de *A. ferrooxidans* foram obtidos dezoito linhagens mutantes para cada fonte energética. Estes mutantes foram avaliados quanto à capacidade de produção de ácido na presença de enxofre elementar e quanto às velocidades iniciais (v_0) na cinética de oxidação dos íons ferrosos. As linhagens mutantes que se destacaram nestes aspectos foram utilizadas em ensaios de frascos agitados na presença de calcopirita. A pressão seletiva realizada pela radiação UV resultou em mutantes que apresentaram respostas diferenciadas perante a cinética de consumo de suas fontes energéticas com comparação a linhagem selvagem LR. Foram selecionadas nove linhagens obtidas a partir do crescimento em íons ferrosos e uma linhagem obtida a partir do crescimento em enxofre elementar. Os mutantes selecionados foram então submetidos ao ensaio em frasco agitado e novamente foram observadas diferentes respostas frente à solubilização da calcopirita. Todas as linhagens mutantes apresentaram maior solubilização de cobre em relação à linhagem selvagem nos primeiros 14 dias de ensaio. Ao final (após 70 dias) a cultura radiada por 1 minuto (M3B) se sobressaiu melhorando em 23% a capacidade de solubilizar o cobre em relação à linhagem selvagem. Essas culturas crescidas em calcopirita após 70 dias, e adaptadas a essa condição de ensaio foram utilizadas como inóculo em novo ensaio de crescimento nas mesmas condições anteriores. Um frasco contendo as linhagens M3B e MS3A também foi utilizado. Em comparação ao ensaio anterior não foi observado diferença significativa na solubilização de cobre entre os dois ensaios, apesar do maior tempo de adaptação das linhagens no segundo ensaio. Após o termino do segundo ensaio de biolixiviação as culturas foram plaqueadas em meio sólido e constatou-se a ausência de alterações morfológicas das colônias em relação à linhagem selvagem LR. Dessa forma, os resultados indicam que houve uma contribuição favorável quanto à capacidade de biolixiviação pelas bactérias quando submetidas à radiação UV, incentivando o uso de ferramentas da genética clássica como instrumento para o estudo e aprimoramento de micro-organismos biolixiviantes.

Palavras-chave: Calcopirita. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Mutação. Raios ultravioleta.

ABSTRACT

Recent industrialization has demanded great amounts of mineral compounds copper is one of the most utilized in technological components manufacturing. The large increase in mining activities has resulted in lower grade mineral deposits. As a consequence, the demand for technical and economical solutions became critical. In this context, biohydrometalurgy, a process that uses microorganisms to perform mineral sulphide dissolution for improving metal extraction, has been pointed as a promising and environmentally safer solution for metal recovery from low grade mineral deposits. In its natural conditions most of copper is found as chalcopyrite, but this mineral sulphide is recalcitrant to chemical and biological dissolution. Nowadays, there is no commercial biohydrometalurgic processes for extracting copper from chalcopyrite. The biggest issue for this is not in the operational aspects of the process, but the microorganisms involved in it. The aims of this study were to obtain new mutant strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, the main bacterium involved in this process, (available in our strains collection) using classical genetics tools (ultraviolet radiation) and study some parameters involved. By means of ultraviolet radiation directed to the wild strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in different exposure periods (0, 10, 15, 30, 60, 120, 300, 600, 1800 and 7200 seconds), eighteen mutant strains were obtained for each energy source. These strains were evaluated regarding their capacity of acid production in the presence of elemental sulphur and initial velocities in the kinetics of ferrous ions oxidation. The cell suspensions with higher performances were submitted to shake flasks experiments in the presence of chalcopyrite. The selective pressure of UV radiation over the wild strain resulted in mutant bacteria that presented different behaviors towards kinetics consumption of its energetic sources. Nine strains from ferrous ions growth and one from sulphur growth were selected. These selected cell mutants were then submitted to shake flasks experiment and it was observed differences between wild and mutant strains. After two weeks all mutant presented more solubilization of copper comparing with the wild. By the end of the assay (70th day) the cell culture radiated for 1 minute (M3B) outperformed the wild strain in 23% in copper solubilization. These mutant strains after 70 days in the presence of chalcopyrite and adapted to this experimental condition were used as inoculums in a new experimental set in the same conditions previously employed. Also one flask containing the strains M3B and MS3A was utilized in set of experiment. Comparing to the previous experiment, it was not observed significant improvement regarding copper solubilization, in spite of the cells be adapted to these conditions. By the end of the second biolixiviation experiment, the mutant suspensions were inoculated in Petri dishes it was not observed none morphological changes comparing to the wild strain. In all instances, the results indicated that favorable contribution to the biolixiviation capacity was achieved by submitting *Acidithiobacillus ferrooxidans* to the ultraviolet irradiation protocol, thus encouraging the application of classic genetic tools to study and improve bacterial strains involved in this bioprocess.

Key-words: Chalcopyrite. *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Mutation. Ultraviolet radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais regiões com depósitos minerais no Brasil, com destaque para o cobre.	25
Figura 2 - Consumo mundial de cobre em 2011.	27
Figura 3 - Imagem topográfica por microscopia de forças atômicas de <i>A. ferrooxidans</i> , linhagem LR na superfície da calcopirita (A) e por microscopia eletrônica de varredura em calcopirita (B)	31
Figura 4 – Colônia de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> LR em meio sólido.	32
Figura 5 – Processo de dimerização do DNA na presença da radiação UV.	35
Figura 6 - Difratoograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita (CuFeS_2). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.	37
Figura 7 – Esquema para obtenção de mutantes via radiação UV a partir da linhagem LR de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	42
Figura 8 – Esquema da utilização da Câmara de Neubauer para contagem do número de células.	46
Figura 9 – Resumo explicativo em forma de fluxograma dos materiais e métodos.	49
Figura 10 – Imagem dos repiques realizados após a exposição da <i>A. ferrooxidans</i> LR à radiação UV durante: A) 0 s B) 15 s C) 30 s D) 1 min E) 2 min F) 5 min G) 10 min H) 15 min J) 30 min I) 60 min e L) 120 min.	51
Figura 11 – Exemplar de uma cultura de <i>A. ferrooxidans</i> LR em meio com o enxofre elementar como fonte de energia antes (A) e depois (B) da oxidação do substrato.....	52
Figura 12 – Variação da concentração dos íons ferrosos pelos mutantes em relação ao tempo.....	53
Figura 13 – Variação da produção do íon férrico pelo tempo pelos mutantes crescidos em íons ferrosos.....	54
Figura 14 – Exemplo do cálculo da velocidade inicial a partir da variação da produção de íons férricos pela linhagem LR.....	55
Figura 15 – Variação do potencial redox do ensaio de cinética de crescimento em íons ferrosos em função do tempo pelas mutantes.....	58
Figura 16 – Variação da produção de ácido pela mutante MS3A com relação ao tempo em meio contato enxofre elementar como fonte de energia.....	60

Figura 17 – Variação do potencial de oxi-redução no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	63
Figura 18 – Variação do pH no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	64
Figura 19 - Consumo de íons ferrosos no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	65
Figura 20 – Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	67
Figura 21 - Variação da concentração de cobre em solução no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	69
Figura 22 – Variação da concentração de cobre solubilizado após 11 dias no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR.	70
Figura 23 – Variação do (A) pH, (B) Eh, (C) ferro total e (D) cobre total pelos mutantes crescidos em íons ferrosos, enxofre elementar e a linhagem selvagem LR no ensaio de biolixiviação continuada na presença de calcopirita.	74
Figura 24 – Morfologia das colônias das linhagens (A) LR, (B) M3, (C) MS3A e (D) consórcio que foram obtidas através do plaqueamento após biolixiviação.	77
Figura A1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M1.	87
Figura A2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M1.	88
Figura A3 – Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M1.	89
Figura B1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M2.	90
Figura B2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M2.	91
Figura B3 – Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M2.	92
Figura C1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M3.	93

Figura C2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M3.	94
Figura C3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M3.	95
Figura D1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M4.	96
Figura D2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M4.	97
Figura D3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M4.	98
Figura E1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M5.	99
Figura E2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M5.	100
Figura E3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M5.	101
Figura F1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M6.	102
Figura G1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M7.	103
Figura G2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M7.	104
Figura G3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M7.	105
Figura H1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M8.	106
Figura I1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M9.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição percentual das reservas brasileiras de cobre por estados.....	26
Tabela 2 - Índice de legendas para os mutantes obtidos e seus respectivos significados....	43
Tabela 3 - Taxa de produção de íons férricos pelos mutantes crescidos em íons ferrosos..	56
Tabela 4 – Concentração de ácido e pH final após 28 dias do ensaio de produção de ácido pelos mutantes crescidos em enxofre elementar.....	61
Tabela 5 – Velocidade inicial e porcentagem de extração no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.....	71
Tabela 6 – Taxas de solubilização do cobre em relação ao dia no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.....	72
Tabela 7 – Avaliação da velocidade inicial e porcentagem de extração de cobre no ensaio de biolixiviação continuada na presença da calcopirita.	75
Tabela 8 - Taxa de solubilização do cobre na biolixiviação continuada na presença da calcopirita em relação ao tempo.	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Biohidrometalurgia.....	22
2.2 Fatores que motivam a aplicação da biohidrometalurgia	23
2.3 Cobre.....	24
2.4 Sulfeto mineral: Calcopirita	28
2.5 Bactérias encontradas em ambientes de minas	30
2.5.1 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	30
2.6 Estudos da alteração genética de micro-organismos acidófilos.....	32
2.6.1 Radiação ultravioleta.....	34
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Amostra mineral	37
4.2 Digestão ácida	38
4.3 Linhagem bacteriana.....	38
4.4 Manutenção	38
4.4.1 Meio de cultura T&K.....	39
4.4.2 Meio 9k.....	39
4.5 Adaptação	40
4.6 Suspensão celular.....	40
4.7 Obtenção de mutantes por meio da exposição da linhagem LR à radiação ultravioleta (UV).....	41
4.8 Ensaio de cinética de crescimento em Fe²⁺	44
4.9 Ensaio de cinética de crescimento em enxofre	44
4.10 Ensaio em frascos agitados	44
4.11 Metodologia analítica	45
4.11.1 Determinação da concentração celular em suspensão	45
4.11.2 Medidas de pH e potencial de óxido-redução	46
4.11.3 Determinação de íons ferrosos (Fe ²⁺).....	46
4.11.4 Determinação da concentração de íons H ⁺ no meio	48
4.11.5 Determinação da concentração de ferro total (Fe _{total}) e cobre total (Cu _{total})	48

4.12 Fluxograma do procedimento experimental.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Obtenção de mutantes.....	50
5.2 Ensaio da cinética de crescimento em Fe ²⁺	53
5.3 Ensaio de produção de ácido.....	59
5.4 Ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.....	62
5.5 Ensaio de biolixiviação continuada na presença de calcopirita.....	73
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
APENDICE A.....	87
APENDICE B.....	90
APENDICE C.....	93
APENDICE D.....	96
APENDICE E.....	99
APENDICE F.....	102
APENDICE G.....	103
APENDICE H.....	106
APENDICE I.....	107

1 INTRODUÇÃO

O cobre é um metal de grande importância na ciência, no desenvolvimento de novas tecnologias e na melhoria da qualidade de vida do homem. O Chile é o maior produtor mundial de minério de cobre com 34% do total de produção, sendo o Brasil o décimo quinto. A expectativa é de que o Brasil alcance a condição de autossuficiência de cobre em 2013, suprimindo a demanda interna e diminuindo as importações, segundo o Instituto Brasileiro de Mineração (Instituto..., 2011). Com o crescimento contínuo da produção de cobre, estudos sobre processos de obtenção desse metal são cada vez mais necessários.

O progresso tecnológico e científico da humanidade fez com que o consumo de cobre aumentasse significativamente (ALVARADO et al., 1999), levando as reservas mundiais de minérios com alto teor de cobre a diminuir a uma taxa alarmante. Aproximadamente 70% das reservas mundiais de cobre se encontram na forma de calcopirita. A calcopirita está presente na maior parte das jazidas com baixo teor de cobre, o que impede a aplicação de processos convencionais como, por exemplo, a pirometalurgia. Além disso, a calcopirita por sua natureza refratária dificulta o processo de extração do cobre (CÓRDOBA et al., 2008).

Os processos convencionais como os pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos (utilizando ácidos ou oxidantes agressivos) são os que predominam na escala industrial para produção de metais. Dentre os processos hidrometalúrgicos encontra-se a biohidrometalurgia, que engloba a biorremediação e biolixiviação de depósitos minerais. Os processos de biorremediação estão relacionados à descontaminação ambiental mediante a retenção do metal poluente numa matriz sólida enquanto que a biolixiviação relaciona-se à recuperação de metais de interesse econômico através da passagem dos mesmos para uma solução (GARCIA JUNIOR; URENHA, 2002).

A Biohidrometalurgia é considerada uma das técnicas alternativas mais promissoras e certamente a solução mais revolucionária para diversos problemas operacionais e ambientais. Além de reduzir drasticamente os custos de investimento, ela também oferece a oportunidade de reduzir a poluição ambiental, pois seus processos biológicos são realizados sob condições brandas e geralmente sem adição de produtos químicos tóxicos. Outra vantagem é que seus produtos

biológicos acabam em solução aquosa que é mais favorável à contenção e tratamento de resíduos gasosos como o H_2S (DEVASIA; NATARAJAN, 2004). Assim a Biohidrometalurgia surge como união benéfica entre a metalurgia e a biotecnologia.

Apesar dos estudos publicados recentemente demonstrarem que a lixiviação bacteriana de sulfetos metálicos é um processo viável, o mesmo não é aplicado comercialmente à calcopirita, pois a biolixiviação de desse minério possui uma cinética de oxidação lenta e com baixa extração de cobre, embora seja o mais abundante minério de cobre encontrado na natureza, e, portanto, o de maior interesse comercial (CÓRDOBA et al., 2008). A busca por alternativas viáveis de processos para a solubilização eficiente da calcopirita, além de passar pelos caminhos dos processos biológicos, tem utilizado também aditivos como íons cloreto, íons Ag^+ , além de tensoativos (LIDDICOAT, 2007; LU, 2000). Mesmo com o potencial de aperfeiçoar a dissolução, sabe-se que a presença desses agentes tem o poder inibitório dos organismos responsáveis pela dissolução da calcopirita (LAWSON et al., 1995).

Algumas estratégias podem ser adotadas de forma a contribuir com uma possível melhora da eficiência do processo de biolixiviação. Dentre elas, podemos citar técnicas físicas e químicas (radiação ultra-violeta, sulfato dietílico, etc) que induzem mutações nos micro-organismos do processo, permitindo que atinjam taxas mais elevadas de oxidação do substrato sulfetado, maior resistência a metais tóxicos, resistência a níveis elevados de acidez e resistência a concentrações mais elevadas de íons cloreto.

Alterações dos mecanismos do metabolismo microbiano podem ser obtidas através de técnicas de engenharia genética e genética clássica. A manipulação genética é uma ferramenta moderna, mas de difícil aplicação para os organismos acidófilos oxidantes de ferro e enxofre. O único trabalho até o momento que relata a transformação direta de *Acidithiobacillus* foi realizado pela VALE S.A. (2011). Os métodos clássicos, como exposição à radiação ultravioleta e agentes químicos tem se mostrado eficientes, rápidos e baratos. Além disso, alguns autores mostraram que mutantes de bactérias acidófilas, inclusive o *A. ferrooxidans*, selecionados por radiação ultravioleta, micro-ondas, sulfato dietílico (DES), nitrosoguanidina e nitrato de sódio (NaNO_2) influenciaram positivamente os processos de biolixiviação.

Contudo, estes métodos são pouco utilizados para o gênero *Acidithiobacillus* (CHI et al., 2009).

Existem diversas ferramentas relacionadas a engenharia genética para o estudos dos micro-organismos em geral, como por exemplo a eletroporação. Mas essas técnicas possuem baixa eficiência quando aplicadas nos micro-organismos biolixiviantes devido à dificuldade de se obter suspensão celular e o próprio ambiente intracelular ácido dessas bactérias. Assim a genética clássica por meio da mutação, destaca-se como uma saída para realizar estudos com esses organismos, como também para o aprimoramento da eficiência dos mesmos quando presentes em processos industriais. Além disso, os estudos relacionados à microbiologia básica dos organismos biolixiviantes ainda tem um vasto campo a ser estudado, sendo um deles a cinética do consumo de suas fontes energéticas.

O presente trabalho propõe o uso de métodos clássicos de manipulação genética (radiação UV) para a geração de mutantes e diferentes condições experimentais para a obtenção de melhores desempenhos no processo de biolixiviação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biohidrometalurgia

A lixiviação bacteriana é um processo antigo. Existem registros de recuperação de cobre a partir de água de drenagem de minas praticadas no Mediterrâneo desde 1000 a.C. (BRIERLEY, 1982). No entanto, a participação de micro-organismos foi esclarecida no final dos anos 40 com a análise de amostras de água ácida de mina de carvão betuminoso em Virginia (EUA) por Colmer e Hinkle (1947) e o isolamento e descrição da primeira bactéria acidófila e oxidante de ferro e enxofre em 1950, a *Thiobacillus ferrooxidans* (reclassificada como *Acidithiobacillus ferrooxidans* por Kelly e Wood em 2000) (COLMER et al., 1950). A aplicação comercial da biohidrometalurgia a partir de pilhas projetadas para as atividades dos micro-organismos foi iniciada em 1980 para a lixiviação de cobre, na mina Lo Aguirre no Chile, onde foi processado cerca de 16.000 t de minério/dia entre 1980 e 1996 (BRIERLEY, BRIERLEY, 2001).

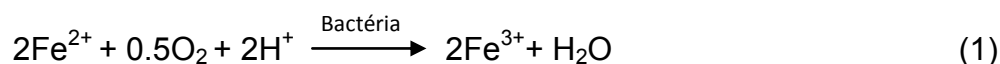
A biohidrometalurgia é um processo natural que utiliza micro-organismos para aumentar a dissolução de minérios, especialmente minério sulfetados, tornando-os mais favoráveis à dissolução em soluções aquosas (DEVECI et al., 2003). É um campo multidisciplinar envolvendo a hidrometalurgia, processamento mineral, química, meio ambiente e microbiologia (AKCIL, 2004). Essa técnica têm sido aplicada em todo o mundo para a recuperação de metais de interesse econômico e também utilizada na indústria na forma de pré-tratamento de minérios refratários (HANSFORD, VARGAS, 2001). É caracterizada por baixos custos operacionais, menor impacto ambiental e simplicidade de manutenção. (BRIERLEY, BRIERLEY, 2001).

A Biohidrometalurgia engloba dois processos microbianos que são úteis na metalurgia extrativa: lixiviação bacteriana, também conhecida como biolixiviação e bio-oxidação (ACEVEDO, 2002). A biolixiviação um processo de lixiviação no qual a extração do metal a partir de minerais sólidos em solução é facilitada pelo metabolismo de certos micro-organismos, tais como as archaea e eubactérias. Por outro lado, a bio-oxidação é um processo de oxidação intermediado por micro-

organismos no qual o metal de interesse permanece na fase sólida (tornando-o enriquecido). Além disso, permite que o metal de valor permaneça na fase sólida e a solução seja descartada.

A biolixiviação é usada hoje em operações comerciais para o processamento de minério de cobre, níquel, cobalto, zinco e urânio. Enquanto que a bio-oxidação é usada para o processamento de ouro e dessulfurização do carvão (BRIERLEY, 2001; ANDREWS, 1984).

Há duas visões dominantes sobre os mecanismos envolvidos na biolixiviação. O primeiro é que o processo global de lixiviação ocorre por oxidação microbiana do íon ferroso para íon férrico, seguido de uma oxidação química do sulfeto mineral pelo íon férrico. O que é conhecido como mecanismo indireto demonstrado nas equações 1 e 2.



A segunda visão propõe a catálise microbiana da dissolução mineral. Nesta abordagem foi proposto que os micro-organismos interagem com o mineral diretamente, aumentando a taxa de oxidação, sendo superior à alcançada por oxidação química. Conhecida como mecanismo direto, conforme equação 3 (SAND, 1999; TRIBUTSCH, 1999).



2.2 Fatores que motivam a aplicação da biohidrometalurgia

Vários fatores motivam o emprego deste processo, entre eles (BRIERLEY, 2010):

- O aumento substancial dos custos de energia, mineração e processamento nos processos atuais. Alguns métodos biohidrometalúrgicos para o processamento e remediação consomem menos energia do que as

tecnologias convencionais e podem potencialmente reduzir os custos para a indústria.

- Possibilita a exploração de jazidas de minério não passíveis de aplicação dos processos convencionais ou difíceis de explorar. Um exemplo é a exploração de depósitos de minérios secundários de sulfetos de cobre, que pode ser muito pequeno ou de localização remota para produção de concentrado de flotação.
- O licenciamento ambiental para as operações de mineração pode ser longo e difícil. A utilização da biohidrometalurgia tanto para o processamento mineral quanto para o tratamento de efluentes pode oferecer algumas vantagens sobre as tecnologias convencionais. Em alguns casos, o bioprocessamento é visto como uma tecnologia “verde”.

Além desses fatores, a biohidrometalurgia possui baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, pois são muito simples as instalações requeridas, além da reduzida necessidade de mão de obra especializada para a operação e ausência de poluição atmosférica, pois não ocorre a emissão de SO_2 (GARCIA JUNIOR, BEVILAQUA, 2008).

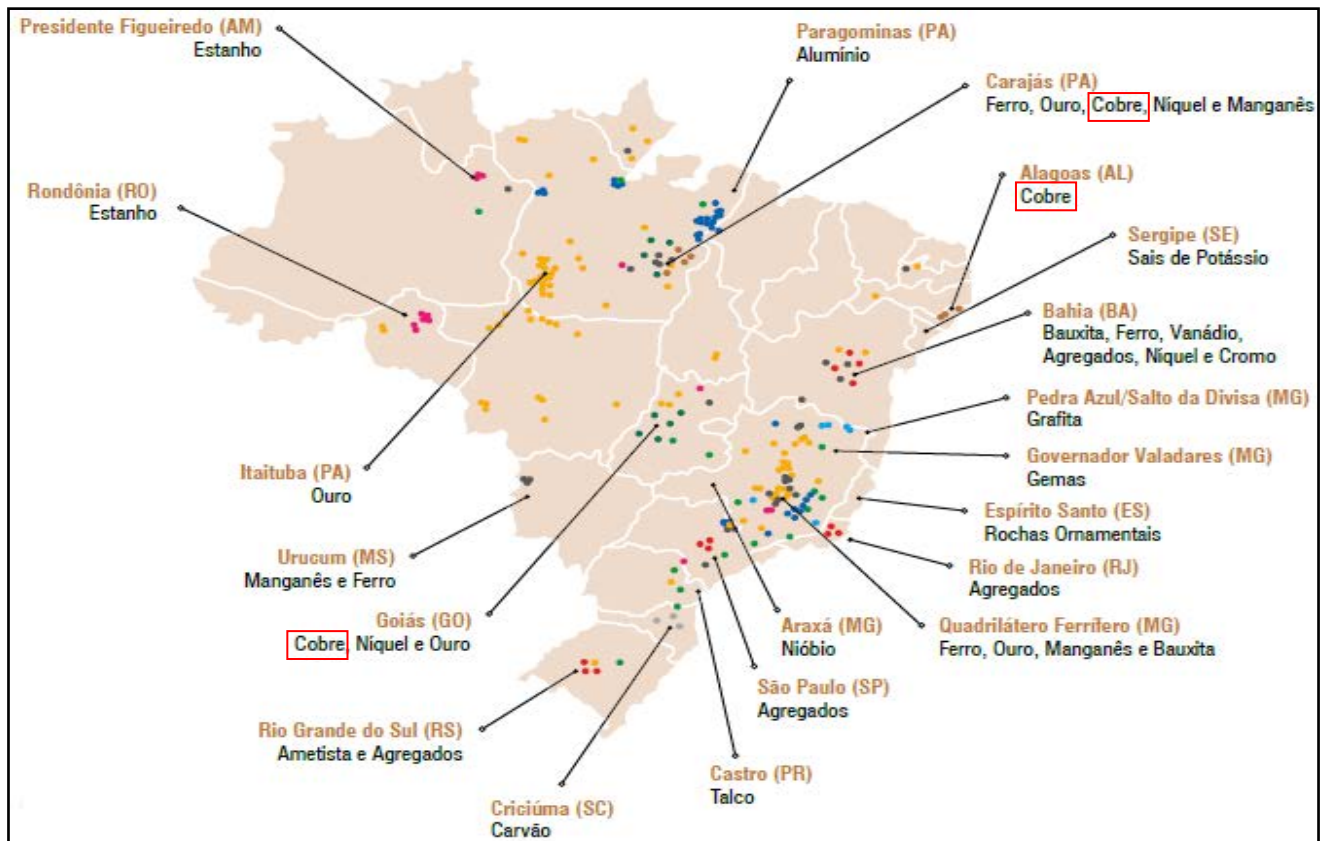
2.3 Cobre

O Brasil é o décimo quinto maior produtor de minério de cobre, com produção em 2011 de 40 mil toneladas. O Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM) espera que sejam atingidas 600 mil toneladas até 2015 com o início das operações de novos projetos. A produção mundial de Cobre é estimada em 16,1 mil toneladas (2011), sendo o Chile o maior produtor mundial, com 33,66% do total, seguido pelo Peru, com 7,58%, China com 7,5%% e EUA com 6,96% (Instituto..., 2012).

No Brasil há três principais regiões com depósitos de minerais de cobre dentre elas Carajás – PA, Alagoas e Goiás (Figura 1). Além desses depósitos existem outras reservas no Brasil (Tabela 1) que representam 17,3 milhões de toneladas de cobre frente a um total de 690 milhões das reservas mundiais. As principais empresas produtoras e seus percentuais de produção no Brasil são: Vale

(46%); Mineração Maracá (Yamana) (39%); Mineração Caraíba (14%); Votorantim Metais Níquel e Prometálica Mineração Centro Oeste (1%).

Figura 1- Principais regiões com depósitos minerais no Brasil, com destaque para o cobre.



Fonte: Instituto..., 2012.

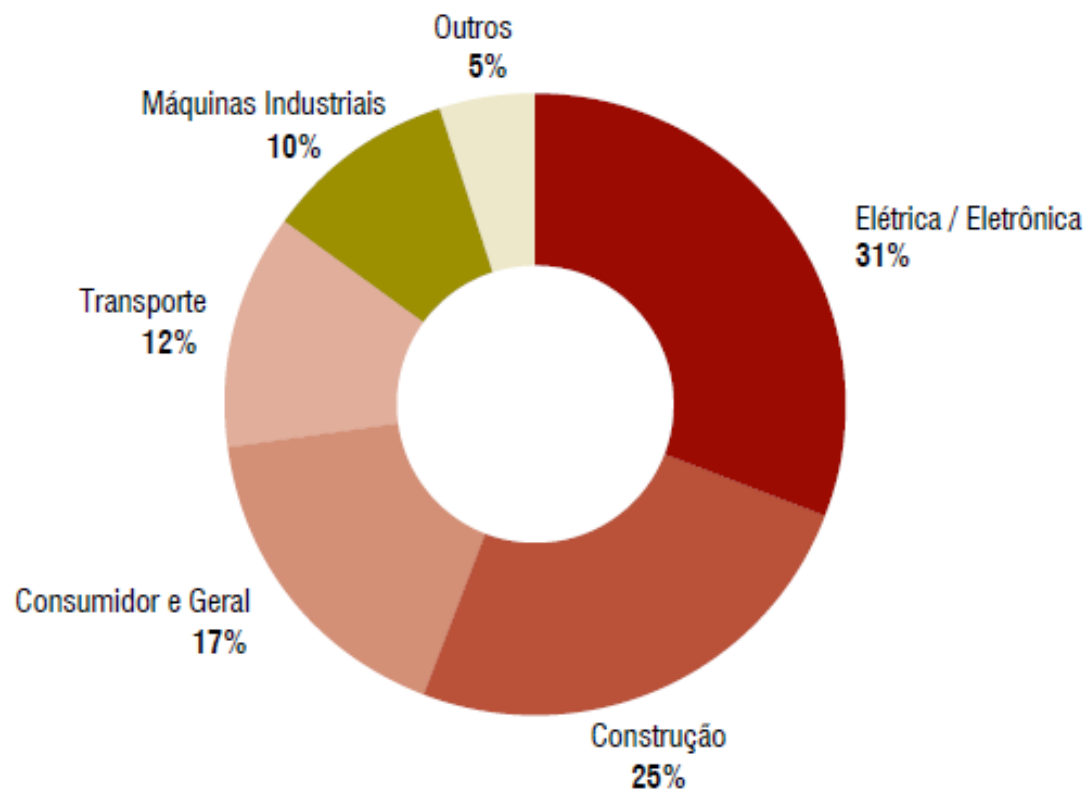
Tabela 1 – Distribuição percentual das reservas brasileiras de cobre por estados.

Estado	Percentual
Alagoas	2,95%
Bahia	3,79%
Goiás	7,92%
Minas Gerais	0,02%
Mato Grosso	0,05%
Pará	84,99%
Rio Grande do Sul	0,19%
São Paulo	0,10%

Fonte: Instituto..., 2012.

No Brasil, a demanda de cobre é sustentada especialmente por programas de construção civil (Programa Minha Casa Minha Vida), indústria automobilística, produtos da linha branca e setor de energia, os quais deverão se manter aquecidos nos próximos anos em decorrência de fortes investimentos previstos pelo Governo Federal (PAC – Programa de Aceleração do Crescimento) e de obras de infraestrutura para realização da Copa do Mundo e das Olimpíadas. Contudo, a indústria metalúrgica continua sendo o maior consumidor do minério de cobre, principalmente como fornecedora da área de construção civil e de cabos e fios. A demanda por cobre para a produção de fios e cabos devem crescer 39% até 2016 no Brasil, podendo atingir 295 mil toneladas do metal por ano ao final do período conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 - Consumo mundial de cobre em 2011.



Fonte: Instituto..., 2012.

2.4 Sulfeto mineral: Calcopirita

A calcopirita (CuFeS_2) é o sulfeto de cobre mais abundante na natureza (DUTRIZAC; MACDONALD, 1978) e por sua vez o mais refratário ao ataque químico e biológico, apresentando taxas mínimas de oxidação em comparação aos outros sulfetos de cobre (BRIERLEY, 1978; THIRD, 2000).

A fórmula química da calcopirita é CuFeS_2 , sendo as ligações essencialmente covalentes, com átomos oscilando entre dois estados iônicos: $\text{Cu}^+\text{Fe}^{3+}\text{S}_2^{2-}$ e $\text{Cu}^{2+}\text{Fe}^{2+}\text{S}_2^{2-}$ (HABASHI, 1978). A refratariedade da calcopirita pode ser atribuída à ocorrência de uma camada passiva de enxofre elementar na superfície do mineral, precipitado de íons Fe^{3+} ou intermediários de polissulfetos de cobre que dificultam a biolixiviação do mineral. Esta camada passiva e as condições nas quais ela é formada têm sido investigadas, porém a natureza desta camada não foi totalmente esclarecida (BEVILAQUA et al., 2004).

Os processos industriais de tratamento da calcopirita são, em sua maioria, por via seca devido aos aspectos econômicos favoráveis. Mas, a utilização de altas temperaturas nestes processos, como na pirometalurgia, ocasiona a liberação de SO_2 para a atmosfera, que é um dos compostos responsáveis pela chuva ácida. Como existe uma extensa preocupação e legislações rigorosas relacionadas aos fatores de contaminação ambiental, tem-se incentivado o desenvolvimento de processos hidrometalúrgicos para o tratamento da calcopirita e outros sulfetos minerais. Atualmente existem opções para este processo, tais como: processo BioCOPTM - realizado em altas temperaturas e capacidade de tratar concentrados com elementos deletérios (BATTY; RORKE, 2006) - e o processo BacTech-Mintek, que utiliza micro-organismos mesófilos em reatores a partir de concentrados (WANG, 2005; DREISINGER, 2006). Entretanto, ambos não resultaram em processos comerciais de sucesso devido a uma desvantagem econômica frente a já bem estabelecida e altamente eficiente tecnologia da pirometalurgia.

O principal obstáculo para a aplicação comercial via processos biohidrometalúrgicos é a sua baixa taxa de dissolução e lenta cinética. Entretanto, fatores como a presença de um catalisador microbiano, baixo potencial redox, granulometria adequada, presença de cloreto, e outros, foram estudados e

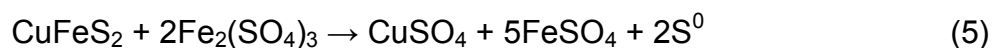
permitiram aumentar a eficiência da lixiviação de sulfetos com baixa concentração de cobre (WATLING, 2006).

Algumas das alternativas usadas para melhorar a eficiência da oxidação da calcopirita são os estudos dos organismos envolvidos em ambientes ácidos, como os de minas, e a aplicação desses organismos resistentes à concentração de sais. Os estudos tem se focado na presença de alguns micro-organismos, principalmente na bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que apresentam grande importância na eficiência do processo em comparação à lixiviação química (BEVILAQUA et al., 2002; WATLING, 2006; QIU et al., 2005).

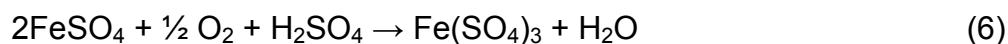
A oxidação biológica da calcopirita ocorre primeiramente pelo ataque bacteriano direto, conforme descrito na equação 4:



De forma sequencial também há um ataque indireto pela bactéria, pois o sulfato férrico formado inicialmente também apresenta atividade oxidativa sobre a própria calcopirita, solubilizando mais cobre (equação 5):



Além do cobre solúvel formado (CuSO_4), pode-se observar a formação de FeSO_4 e de S^0 , os quais são novamente oxidados pela bactéria a sulfato férrico e ácido sulfúrico conforme equações 6 e 7, fechando-se o ciclo (GARCIA JUNIOR, BEVILAQUA, 2008)



2.5 Bactérias encontradas em ambientes de minas

No ambiente de minas são encontrados micro-organismos extremamente acidófilos (com pH abaixo de 3), quimiolitotróficos, que utilizam tanto compostos inorgânicos reduzidos de enxofre quanto ferro (II) como fonte de energia e autotróficos (CLARK, NORRIS, 1996).

Diferentes tipos de micro-organismos são capazes de oxidar sulfetos minerais. Os mais comumente presentes em áreas contendo sulfetos de ferro e enxofre são bactérias mesófilas como as *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus thiooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans*. Estas possuem o papel de gerar o produto químico da lixiviação e criar um ambiente para essas reações (SALO-ZIEMAN et al., 2006). A descrição completa dos organismos presentes nos ambientes de mina pode ser encontrada em Brierley e Brierley (2013).

2.5.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

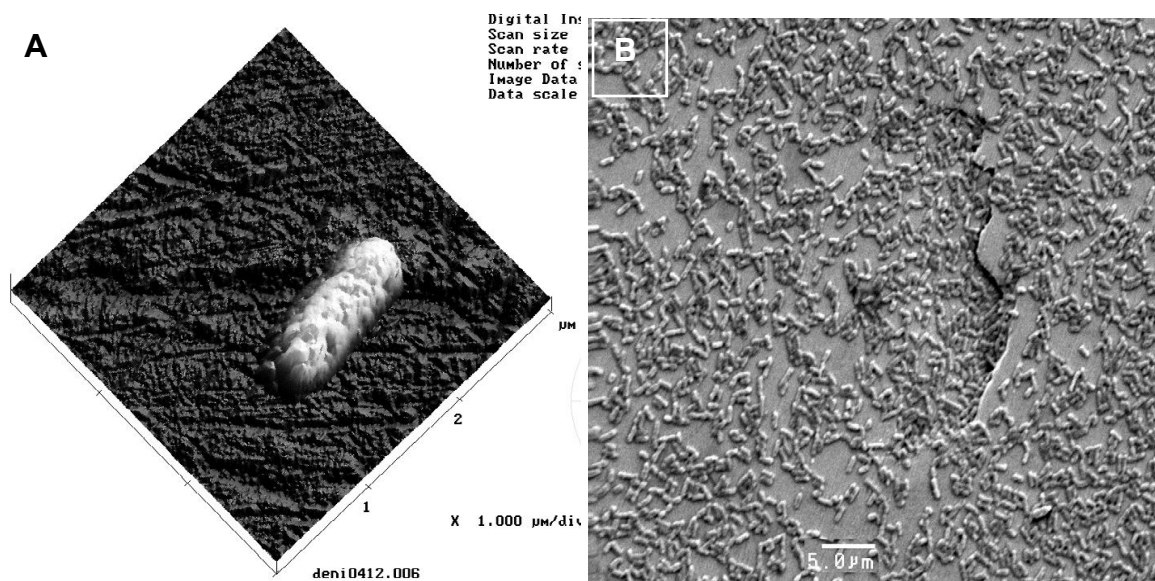
A espécie mais estudada devido a sua intensa utilização no processo de biolixiviação é a *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *A. ferrooxidans* é uma espécie não patogênica, gram-negativa, na forma de bastonete, não esporulante, ocorrendo sozinha ou aos pares e raramente em cadeias pequenas; são móveis e apresentam flagelo polar (GARCIA JUNIOR; URENHA, 2002). Tal espécie possui a capacidade de crescer em condições adversas com elevada acidez e altas concentrações de metais potencialmente tóxicos (CABRERA; GOMEZ; CANTERO, 2005). Sua reprodução é por divisão binária simples. É considerada mesófila, com uma temperatura ótima de crescimento de 30°C (BERTHELOT; LEDUC; FERRONI, 1993). Além disso, é uma acidófila estrita com um pH ótimo em torno de 2,0 (SMITH; LUTH; MIDDLETON; 1988). Para a produção de energia utilizada no seu crescimento a *A. ferrooxidans* pode reduzir o íon férrico anaerobicamente durante a oxidação do enxofre (PRONK, 1992; DAS, 1996).

Essa bactéria é um organismo de natureza quimiolitotrófica, uma vez que utiliza como fonte energética substratos estritamente inorgânicos, como os íons Fe^{2+} , enxofre e formas reduzidas de compostos de enxofre (S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), incluindo

os sulfetos minerais. Além disso, é considerada obrigatoriamente autotrófica e necessita, além de uma fonte energética de natureza inorgânica, de suprimentos de nitrogênio, fósforo e magnésio (TUOVINEN, 1979; RAWLINGS, 1981). A energia obtida pela oxidação dos substratos inorgânicos é utilizada pela espécie para a fixação do CO₂ atmosférico, sua fonte de carbono (LEDUC; FERRONI, 1994).

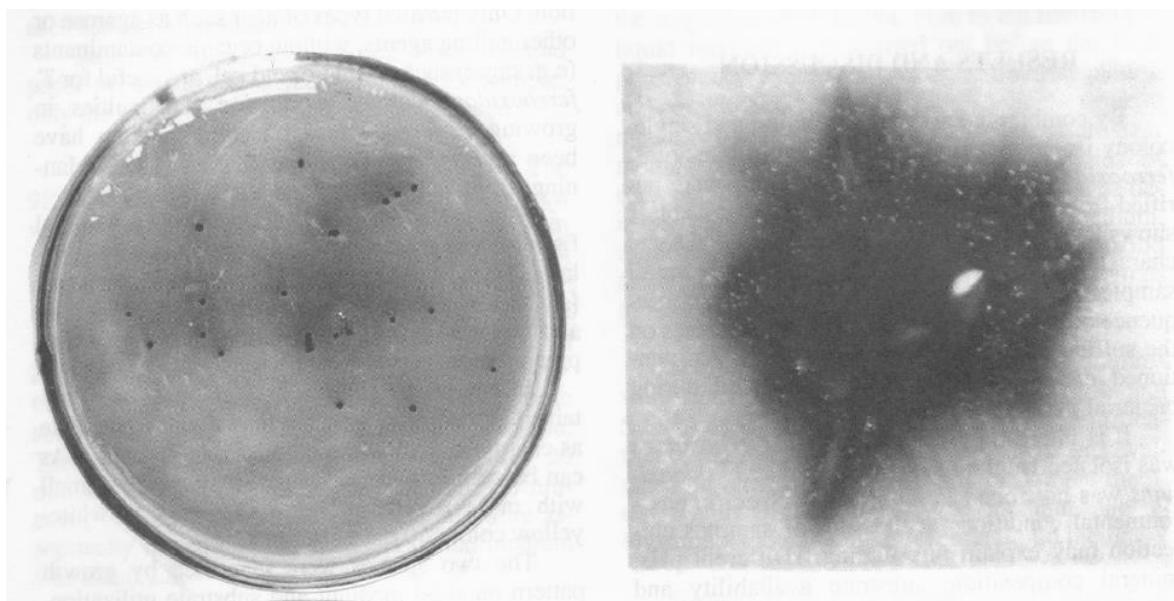
A Figura 3 mostra imagens da *A. ferrooxidans* obtidas por microscopia de força atômica (A) e por microscopia eletrônica de varredura (B). A morfologia de suas colônias quando plaqueadas em meio sólidos estão representadas na Figura 4.

Figura 3 - Imagem topográfica por microscopia de forças atômicas de *A. ferrooxidans*, linhagem LR na superfície da calcopirita (A) e por microscopia eletrônica de varredura em calcopirita (B)



Fonte: Bevilaqua (2003).

Figura 4 – Colônia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR em meio sólido.



Fonte: Garcia Junior. (1991).

2.6 Estudos da alteração genética de micro-organismos acidófilos

Os organismos responsáveis pela biolixiviação do sulfeto mineral podem ter sua capacidade melhorada. Dentre algumas características possíveis de serem modificadas, incluem-se taxas mais elevadas de oxidação do substrato sulfetado, maior resistência a metais tóxicos, resistência a níveis elevados de acidez e maior resistência a concentrações mais elevadas de íons cloreto.

Manipulações genéticas tais como: mutagênese e clonagem, complementação e expressão de proteínas fornecem abordagens para estudar o gene e a função das proteínas em diferentes organismos. Entretanto, muitos destes métodos não se aplicam de maneira eficiente em *Acidithiobacillus sp*, principalmente pelo fato do ambiente externo e o espaço periplasmático das bactérias desse gênero possuírem condições ácidas, enquanto que a maioria dos métodos são geralmente utilizados em pH neutro (HOLMES; BONNEFOY, 2007). Outro problema é a ausência de um método eficiente para importar DNA em células de *A. ferrooxidans*. Alguns autores conseguiram promover a transformação, mas com dificuldades e baixa eficiência (JIN, 1992; LIU, 2007; PENG, 1994). Dentre as técnicas da biologia molecular utilizadas para transformação houve a predominância do uso da

transferência do fragmento de interesse via plasmídeo por conjugação através da *E. coli*, sendo aplicada para a maioria das espécies do gênero *Acidithiobacillus*. Outra forma de transferência usada foi por meio da eletroporação na espécie *A. caldus* (CHEN et al., 2010). Kusano et al. (1992) também fez uso da técnica de eletroporação para a transferência de DNA, mas sua eficiência se limitou para apenas algumas linhagens de *A. ferrooxidans*.

Diante das dificuldades e o atual estágio dos estudos envolvidos para obtenção de mutantes via engenharia genética, tem se buscado a aplicação de técnicas da genética clássica utilizando agentes físicos e químicos para induzir mutação em micro-organismos acidófilos. Todavia, poucos trabalhos de manipulação genética por métodos clássicos foram realizados até o momento (LEXIAN, 2007; KANG, 2009; CHI, 2009; XU, 2010). Dentre esses, é possível citar alguns trabalhos que obtiveram mutantes de bactérias acidófilas, inclusive do *A. ferrooxidans*, por meio de pressão seletiva via radiação ultravioleta e que ao final influenciaram positivamente os processos biotecnológicos, como por exemplo, a biolixiviação de sulfetos minerais.

Os agentes com capacidade de alterar o genoma nos estudos de mutação de bactérias de ambientes ácidos podem ser físicos, como os raios ultravioleta e as micro-ondas, e químicos, como o sulfato dietílico (DES), nitrosoguanidina e nitrato de sódio (NaNO_2).

Segundo XU et al. (2010), a exposição à radiação ultravioleta em *A. ferrooxidans* induziu a formação de mutantes. Os mutantes obtidos oxidaram todo o Fe^{2+} depois de 48 horas enquanto a linhagem selvagem levou 60 horas. Além disso, os experimentos de biolixiviação realizados mostraram que uma mistura de linhagens mutantes de *A. ferrooxidans* e *A. cryptum* pôde extrair $3,01 \text{ g L}^{-1}$ de cobre, enquanto que o cobre anteriormente extraído era de apenas $2,63 \text{ g L}^{-1}$.

A indução com agentes químicos como o DES e NaNO_2 também resultou numa melhora quanto à capacidade do micro-organismo resistir à presença do cobre (32 g L^{-1}) em uma cultura que tinha micro-organismos do gênero *Acidithiobacillus* (KANG et al., 2009). Sabendo que o cobre II é o produto da biolixiviação de um sulfeto mineral, a resistência promovida pela mutação é que possivelmente dará condições para o crescimento das bactérias, resultando na continuação do processo de lixiviação pelas mesmas. Chi et al. (2009), demonstraram que na presença dos mesmos agentes químicos (DES e NaNO_2), a espécie de *A. ferrooxidans* possibilitou

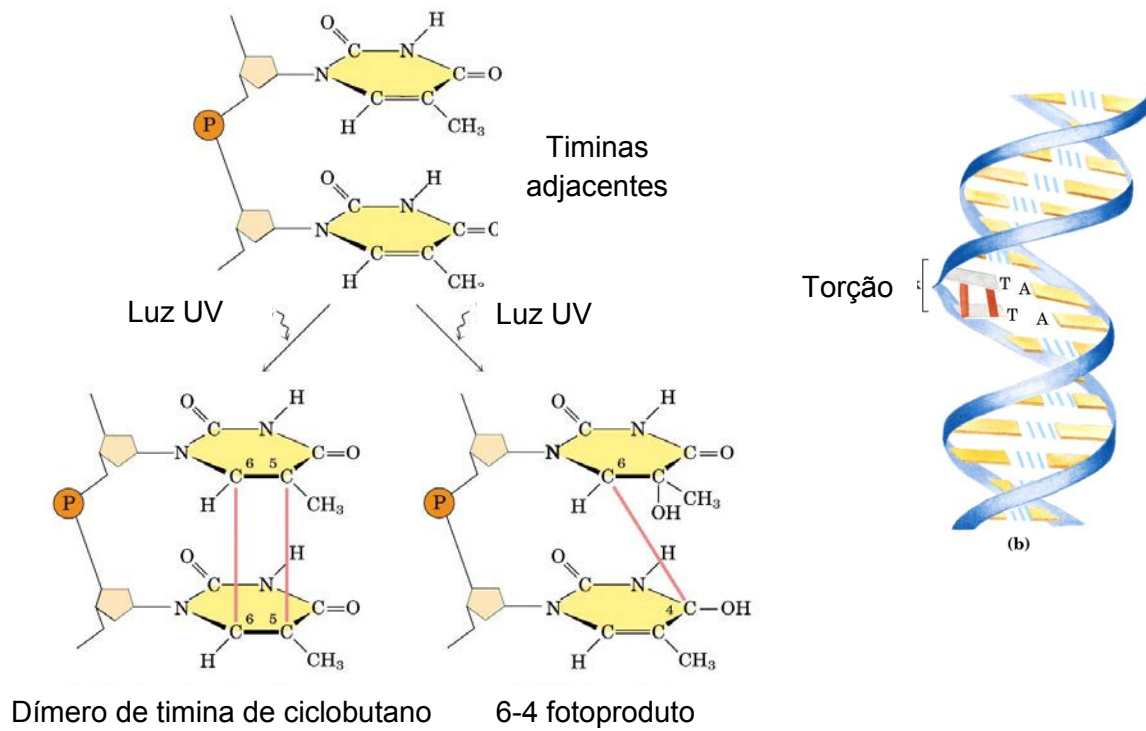
um aumentou de 3,8 vezes na capacidade de oxidar o íon ferroso em relação a espécie selvagem. Além desses agentes, a radiação ultravioleta, também promoveu uma pressão seletiva induzindo possíveis mutantes com características positivas para biolixiviação.

2.6.1 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) conhecida também como luz negra é uma radiação eletromagnética de comprimento de onda mais curto que a luz visível e mais longo que os raios X, sendo invisível ao olho humano. Foi descoberta por John Ritter em 1801 durante uma experiência fotoelétrica. Geralmente, a luz UV é dividida em regiões denominadas de ultravioleta próximo (400-300 nm), afastado (300-200 nm) e no vácuo (200-400 nm). Sendo estes últimos comprimentos de onda prejudiciais para a vida devido a forte absorção pela atmosfera e pela camada de ozônio (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

Esse tipo de radiação também pode ser direcionado para promover alterações permanentes na estrutura do DNA, as quais são denominadas de mutações, e implicam na modificação da informação genética da espécie irradiada. A luz UV pode induzir a condensação de dois grupos etilenos para formar um anel ciclobutano de pirimidinas. Isso acontece mais frequentemente entre resíduos de timina adjacentes na mesma fita do DNA. Um segundo tipo de dímero de pirimidina, chamado de fotoproducto 6-4, é também formado durante a radiação UV (COX; NELSON, 2008). Na ausência do mecanismo de correção na replicação do DNA, grande parte dessas alterações resultaria na deleção de um ou mais pares de bases, ou na substituição de um par de bases na cadeia-filha de DNA. Essa possível modificação poderá ser então propagada nas gerações subsequentes (ALBERTS et. al., 2010). A Figura 5 ilustra uma reação que gerou um anel ciclobutil envolvendo o carbono 5 e 6 adjacentes aos resíduos de pirimidinas como produto da radiação. Outro tipo de reação alternativa é através da ligação entre o carbono 6 e uma pirimidina e carbono 4 vizinho a reação gerando 6-4 fotoproducto (A). A figura abaixo permite também visualizar a formação de uma torção ou curva no DNA pela formação do dímero da pirimidina ciclobutano (B).

Figura 5 – Processo de dimerização do DNA na presença da radiação UV.



Fonte: adaptado de Cox (2008).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi obter linhagens mutantes, obtidas por meio da exposição à radiação ultravioleta da espécie de *A. ferrooxidans*, linhagem LR. As linhagens mutantes obtidas foram testadas quanto à capacidade de oxidar íons ferrosos e também quanto à capacidade de produzirem ácido sulfúrico. Os mutantes que apresentaram melhor desempenho nestas avaliações foram testados em relação à capacidade de oxidação da calcopirita.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a cinética de oxidação de diferentes fontes energéticas (Fe^{2+} e S^0) dos mutantes com a da linhagem selvagem;
- Selecionar mutantes e avaliá-los quanto à capacidade de oxidação da calcopirita em ensaios em frascos agitados.
- Verificar a morfologia das colônias mutantes relação a linhagem selvagem formadas em meio sólido como fonte de energia os íons ferrosos.

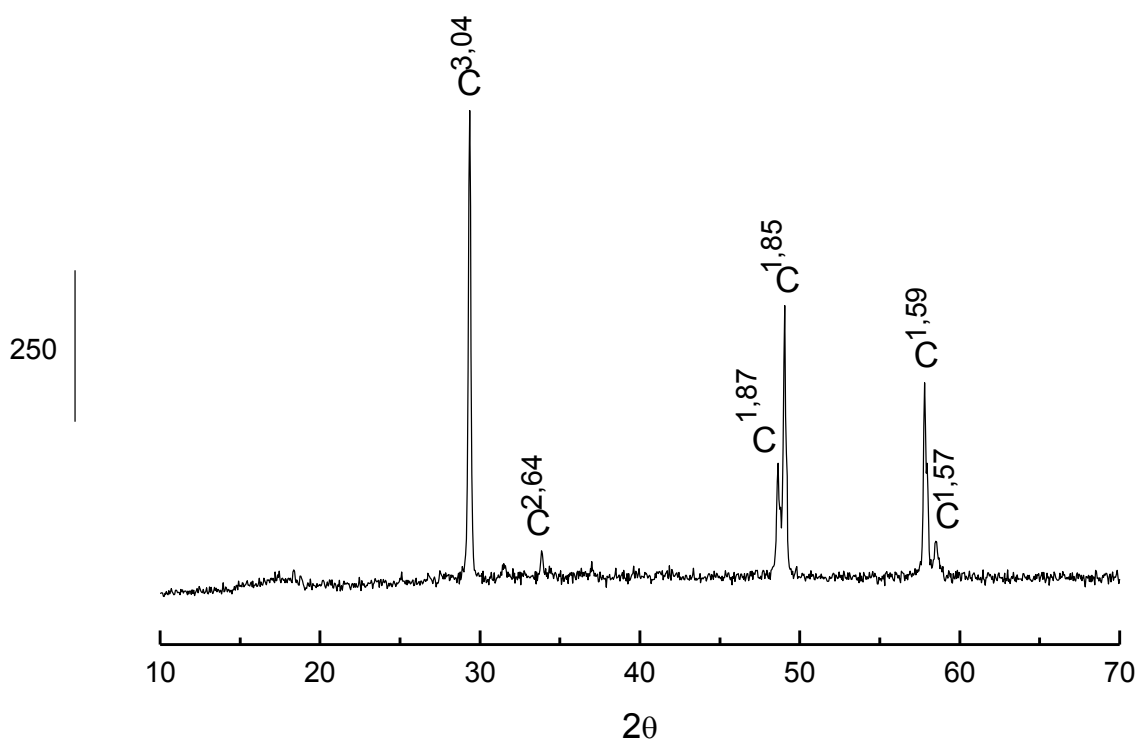
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra mineral

Foi utilizada como amostra mineral, calcopirita (CuFeS_2) proveniente de La Chorrera, do município de Cisneros, em Antioquia, Colômbia, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Marco Antonio Marquez da Universidad de Medellin, Colômbia.

A amostra foi inicialmente cominuída em moinho de bolas (MLW – KM1) até atingir uma granulometria de $100\% < 125 \mu\text{m}$ (120 mesh). As fases cristalinas presentes na amostra foram determinadas por difração de raios X (DRX) e revelaram a presença de um único sulfeto mineral, calcopirita, conforme mostrado na (Figura 6) ficha PDF nº 35-752. Os metais presentes na amostra (Cu e Fe) foram determinados através de espectrometria de absorção atômica (Agilent Technologies – 200 series AA) após a digestão ácida, obtendo-se 30,86% de cobre e 24,04% de ferro.

Figura 6 - Difratograma de raios X da amostra original de calcopirita. Os símbolos indicam C - calcopirita (CuFeS_2). Os números acima da identificação dos picos indica a distância “d” (em Angstroms) característica de cada fase cristalina.



4.2 Digestão ácida (NUCLEBRÁS – modificado)

Para a digestão ácida, a amostra mineral foi seca em estufa a 60°C até atingir massa constante. Posteriormente, adicionou-se a 2,0 g de amostra, 80 mL de água régia (3HCl : 1HNO₃), 12 horas.

A mistura foi então aquecida em chapa aquecedora (Nova Ética, modelo 114), sendo realizada adições sucessivas de 10,0 mL de HCl até a diminuição expressiva de volume, porém sem deixar calcinar. Por fim, foi adicionada à mistura 30 mL de uma solução de HCl 50%, sendo posteriormente filtrada em membrana de acetato de celulose (0,45 µm de porosidade – Millipore).

Esta solução contendo os metais extraídos da matriz de calcopirita foi diluída adequadamente e submetida à análise por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS – Agilent 240 FS) para determinação do teor de cobre e ferro total.

4.3 Linhagem bacteriana

Para a realização dos ensaios foi utilizada a linhagem bacteriana *A. ferrooxidans* LR, isolada do licor de lixiviação estática de minério de urânio proveniente da mina de Lagoa Real - Bahia (GARCIA JUNIOR, 1991). A linhagem foi escolhida devido aos diversos estudos bioquímicos e genéticos já realizados com a mesma em nosso laboratório de Biohidrometalurgia do instituto de química, UNESP/Araraquara, além de ser a espécie mais aplicada nos processos de biolixiviação.

4.4 Manutenção

Para a manutenção periódica da linhagem bacteriana, bem como para a obtenção da suspensão celular usada nos procedimentos de irradiação e nos ensaios de cinética de crescimento, foram utilizados os seguintes meios:

4.4.1 Meio de cultura T&K

Este meio continha sais minerais (Solução A) e sulfato ferroso (Solução B) como fonte de energia. O pH 1,8 foi corrigido com H_2SO_4 concentrado (TUOVINEN; KELLY, 1973).

Solução A:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
pH (H_2SO_4 concentrado).....	1,8
água destilada	q.s.p. 800 mL

Solução B:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	33,3 g
pH (H_2SO_4 concentrado).....	1,8
água destilada	q.s.p. 200 mL

A solução A foi esterilizada em autoclave (120°C , 20 min, 1 atm), e a solução B por filtração em membrana ($0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro – Millipore – HAWP 04700). No momento do uso as soluções A e B foram misturadas na proporção de 4:1.

4.4.2 Meio 9k

Este meio possui como fonte energética enxofre (S^0), além de sais minerais e pH 2,8 corrigido com H_2SO_4 concentrado (SILVERMAN; LUNDGREN, 1959).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0g
MgSO_4	0,5g
K_2HPO_4	0,5g
KCl.....	0,1g
pH (H_2SO_4 concentrado).....	2,8

água destilada.....q.s.p. 1000mL
 S^0 10g/L

A solução e o enxofre foram preparados separadamente, sendo a solução esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e o enxofre foram misturados para compor o meio.

4.5 Adaptação

A bactéria *A. ferrooxidans* obtém energia através da oxidação de Fe^{2+} e/ou compostos reduzidos de enxofre. Os compostos de enxofre mais comumente utilizados como fonte energética para o crescimento bacteriano são o H_2S , S^0 e $S_2O_3^{2-}$. Porém, após um longo período utilizando íons Fe^{2+} como fonte energética, o micro-organismo necessita de uma readaptação ao meio contendo enxofre elementar (9K), de maneira que possa utilizá-lo como fonte de energia. Por esse motivo, a *A. ferrooxidans*, linhagem LR, que é mantida em meio contendo ferro, foi adaptada para o consumo exclusivo de enxofre elementar através de 4 repiques sucessivos em meio 9K. O pH foi monitorado periodicamente (intervalos de 5 dias) e medidas de pH em torno de 1,5 indicavam crescimento bacteriano nesse meio.

O cultivo em enxofre foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 10% (v/v) de inóculo da linhagem LR, sendo o valor de pH inicial de 2,8. O crescimento foi conduzido em mesa agitadora a 150 rpm e temperatura de 30°C, sendo o volume final da solução de 100 mL. A evaporação de cada frasco foi estimada pela perda de peso e compensada pela adição de água destilada esterilizada. Este processo levou em torno de 3 meses.

4.6 Suspensão celular

Foram obtidas suspensões celulares provenientes de meios com diferentes fontes de energia, íons ferrosos (meio T&K) e enxofre (meio 9K).

A suspensão celular de *A. ferrooxidans* LR foi obtida por centrifugação de 1 litro do meio a 2831xg (Beckman, modelo AvantiTM j-25, rotor JA 10), durante 1 hora. O sobrenadante foi descartado e as células obtidas foram lavadas com água ácida

(pH 1,8) novamente centrifugada a 2,5xg (eppendorf, modelo 5202R) durante 15 minutos. Esta ação foi repetida até a obtenção de um pellet livre de jarosita para as células crescidas em Fe^{2+} , e sem enxofre para as células crescidas em meio 9K. O pellet foi ressuspenso em 50 mL da solução A do meio T&K, e sua concentração celular foi analisada de acordo com a metodologia de Barron e Lueking (1990) através de turbidimetria.

4.7 Obtenção de mutantes por meio da exposição da linhagem LR à radiação ultravioleta (UV)

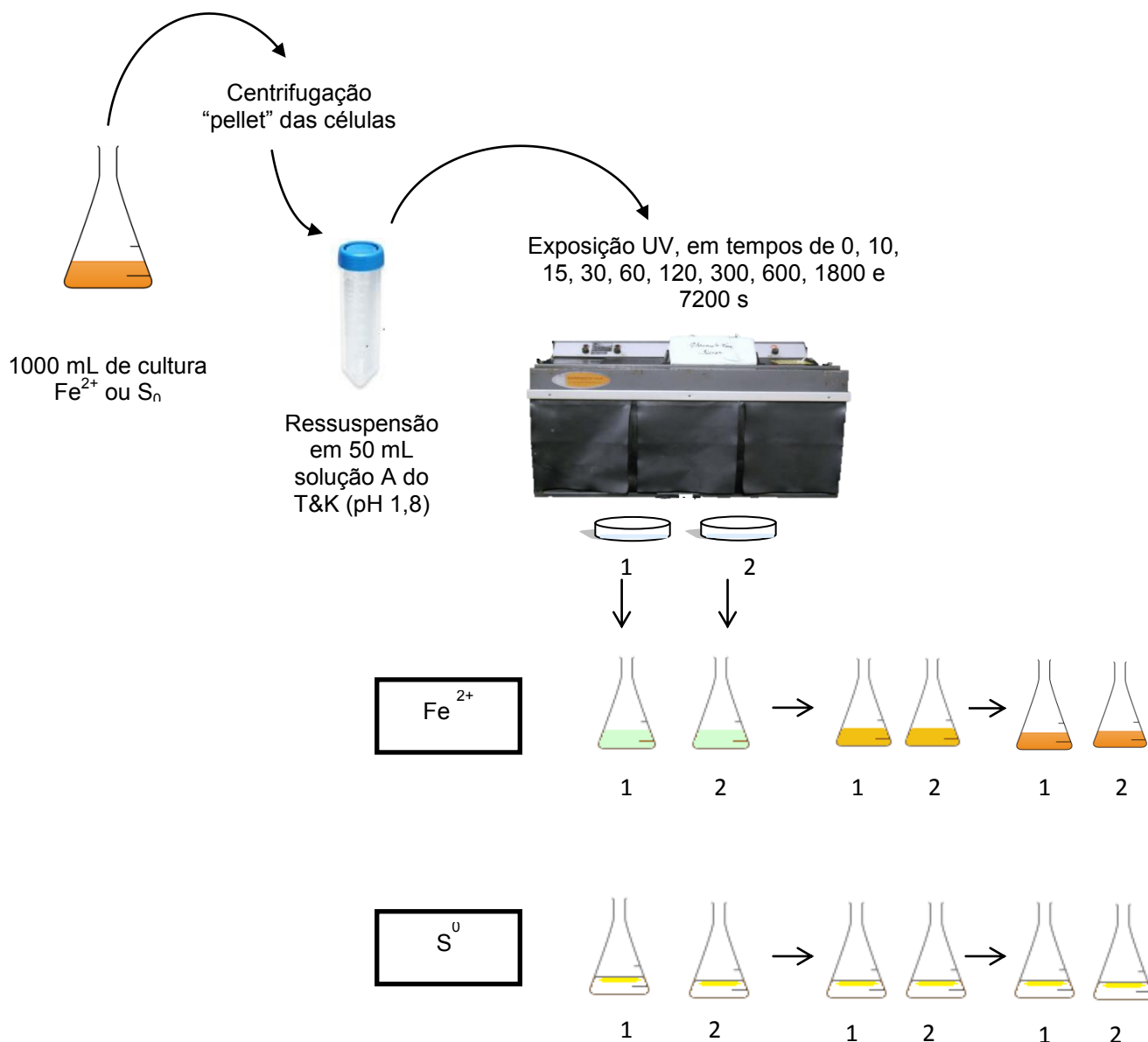
Ambas as suspensões celulares, obtidas como crescimento da *A. ferrooxidans* em meio T&K e 9K, foram expostas à radiação ultravioleta durante 0, 15, 30, 60, 120, 300, 600 e 1200 segundos (KANG, 2009; DONG, 2011), utilizando o Equipamento *Chromato-vue* (seleção “short wave”, 250 nm). O procedimento para a obtenção dos mutantes está representado no fluxograma da Figura 7.

Após a irradiação nestes diferentes tempos, 5 mL da suspensão de *A. ferrooxidans* LR irradiada foi transferida para um frasco Erlenmeyer contendo meio T&K fresco no caso da suspensão celular oxidante de ferro, e 9K para a suspensão oxidante de S^0 . O crescimento foi conduzido em mesa agitadora (Modelo C25K, Newbrunswick) a 150 rpm e temperatura de 30°C.

Quanto maior o tempo de exposição da suspensão celular à radiação ultravioleta, maior é a possibilidade de ocorrência de morte celular. Isto foi confirmado pela cinética lenta de consumo de substrato dos inóculos realizados após a radiação. O tempo médio de oxidação de íons ferrosos para a linhagem de *A. ferrooxidans* LR original é de 48 horas. Para a oxidação do enxofre o tempo é em torno de 10 dias e o pH final de aproximadamente 1,5. O esquema para obtenção de mutantes está apresentado na Figura 7.

Após o crescimento das culturas, foram realizados ensaios de cinética de crescimento em ambos os substratos a fim de identificar diferenças entre os mutantes.

Figura 7 – Esquema para obtenção de mutantes via radiação UV a partir da linhagem LR de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.



Fonte: elaborado pelo autor.

A fim de facilitar a identificação dos micro-organismos, os mutantes foram nomeados conforme mostra a Tabela 2. A letra M se refere ao mutante. Os números se referem aos tempos de radiação, por exemplo, 1 para o tempo de 15 segundos, 2 para 30 segundos e assim por diante. As letras A e B se referem respectivamente a primeira e a segunda placa de petri de onde foram retirados os inóculos. Para os mutantes originados a partir do cultivo em enxofre elementar a legenda é complementada com a letra S logo após a letra M.

Tabela 2 - Índice de legendas para os mutantes obtidos e seus respectivos significados.

Legenda	Significado
M 1 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 15 segundos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 1 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 15 segundos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 2 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 30 segundos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 2 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 30 segundos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 3 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 1 minuto, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 3 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 1 minuto, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 4 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 2 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 4 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 2 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 5 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 5 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 5 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 5 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 6 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 10 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 6 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 10 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 7 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 30 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 7 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 30 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 8 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 60 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 8 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 60 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
M 9 A	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 120 minutos, alíquota retirada da primeira placa de petri.
M 9 B	<i>A. ferrooxidans</i> LR radiada por 120 minutos, alíquota retirada da segunda placa de petri.
LR A	<i>A. ferrooxidans</i> LR
LR B	<i>A. ferrooxidans</i> LR

4.8 Ensaio de cinética de crescimento em Fe^{2+}

Para a avaliação da cinética de crescimento das mutantes da espécie de *A. ferrooxidans* em Fe^{2+} , 150 mL de meio T&K completo foi inoculado com 5% (v/v) das respectivas culturas puras. Foram retiradas alíquotas periodicamente para dosagem de íons Fe^{2+} por espectrofotometria na região do visível com 1,10-fenantrolina. O monitoramento foi realizado para a determinação da velocidade de oxidação dos íons ferrosos presentes no meio, do pH e do potencial redox.

4.9 Ensaio de cinética de crescimento em enxofre

A linhagem *A. ferrooxidans* - LR faz parte do banco de linhagens do laboratório de Biohidrometalurgia – UNESP/Araraquara-SP é mantida e armazenadas em meio contendo Fe^{2+} como fonte de energia e para que pudesse ser avaliada quanto à capacidade de oxidar enxofre, repiques sucessivos em meio contendo enxofre como fonte de energia foram realizados previamente ao início desta avaliação.

4.10 Ensaios em frascos agitados

Os mutantes obtidos por radiação UV foram avaliados quanto à cinética de oxidação de íons ferrosos e enxofre. Aqueles que apresentaram maior V_0 (velocidade inicial) que a linhagem original, foram selecionados para o ensaio de biolixiviação (9 mutantes). Em relação aos mutantes provenientes do cultivo em enxofre foi utilizado o critério de menor pH final em relação à linhagem original e foi selecionado um destes mutantes para o ensaio de biolixiviação.

Neste ensaio de biolixiviação foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo a solução A do meio T&K, 5% (v/v) de inóculo e 2,5% (m/v) de calcopirita, resultando num volume final de 150 mL, sendo mantido sob agitação de 180 rpm a 30 °C. A evaporação do meio líquido de cada frasco foi estimada pela perda de massa e compensada pela adição de água destilada esterilizada. Este controle foi feito a cada sete dias e as condições experimentais testadas foram as seguintes:

1. Meio inoculado (5% v/v) com *A. ferrooxidans* – LR;
2. Meio inoculado (5% v/v) com os mutantes selecionados;
3. Controle abiótico – meio não inoculado.

Os ensaios de biolixiviação foram acompanhados por amostragens periódicas da suspensão homogênea dos frascos. A separação das fases sólida e líquida foi realizada por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 minutos, sob refrigeração a 4°C (Centrifuge 5702R – Eppendorf).

Foram realizadas periodicamente medidas de pH, potencial de óxido-redução (Eh) e determinação de Fe^{2+} . Uma alíquota das amostras foi armazenada em ácido nítrico 2% (1:1) para determinação de Cu total e Fe_{total} por espectrometria de absorção atômica (Agilent Technologies 200- Series AA). Este ensaio foi realizado em duplicata.

Quando necessário foram realizadas correções ácidas (H_2SO_4 1:1 esterilizado) até a estabilização do pH em um valor próximo a 2,0. No final do experimento os resíduos sólidos, foram submetidos à análise de difração de raios-x (DRX).

Após a biolixiviação em frascos agitados, os mutantes que apresentaram maior eficiência foram plaqueadas com o intuito de verificar possíveis diferenças morfológicas. Assim um volume da suspensão de *A. ferrooxidans* LR e as melhores mutantes após o processo de biolixiviação foram inoculados em meio T&K completo solidificado com agarose 0,45%. As placas foram incubadas em estufa a 30°C até aparecimento das colônias.

4.11 Metodologia analítica

4.11.1 Determinação da concentração celular em suspensão (Madigan, 2010).

Em uma câmara de Neubauer (Figura 8) foram realizadas as quantificações microbianas para padronização do inóculo (10^8 cels/mL) para os ensaios de cinética e biolixiviação. A câmara tem duas zonas de contagem com 25 quadros de dimensões definidas: área de $0,0025 \text{ mm}^2$ e profundidade de 0,100 mm.

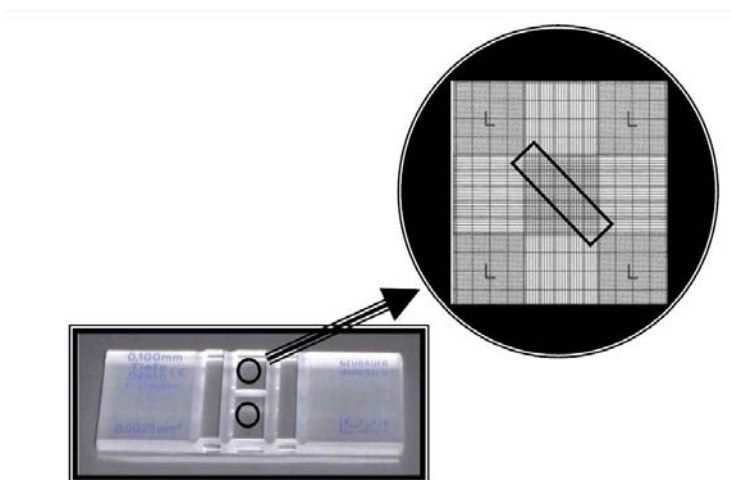
Considerando as dimensões da câmara, a concentração celular em milhões de células por mililitro é dada segundo a equação [8]:

$$\frac{\text{Número total de bactérias contadas} \times 4 \times 10^6}{\text{Número de quadrados pequenos contados}} \quad (8)$$

A contagem de uma diagonal foi adotada como metodologia (Figura 8).

Foi utilizado um microscópio óptico *Olympus* BH-2 que possui 5 objetivas de aumentos: x4, x10, x20, x40 e x100, sendo que para melhor contagem foi utilizado a objetiva de 100.

Figura 8 – Esquema da utilização da Câmara de Neubauer para contagem do número de células.



Fonte: Madigan, 2010.

4.11.2 Medidas de pH e potencial de óxido-redução

O pH e o potencial de óxido-redução (Eh) das amostras coletadas foram medidos no sobrenadante utilizando-se um eletrodo combinado de vidro e um eletrodo de Pt (com referência de $\text{Ag}^0/\text{AgCl}|\text{KCl}_{\text{sat}}$), respectivamente.

4.11.3 Determinação de íons ferrosos (Fe^{2+})

A determinação dos íons Fe^{2+} foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método da 1,10-fenantrolina, que consiste na formação do complexo Fe (II)-fenantrolina, de coloração vermelha. Foram utilizadas as seguintes soluções:

A) Solução de monohidrato de 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)*: fenantrolina (0,2g); Água destilada (qsp 100 mL);

* A solução de fenantrolina foi estocada em recipientes protegidos da luz, para evitar sua oxidação.

B) Solução de ácido acético 2M: CH_3COOH (11,46 mL); água destilada (qsp 100 mL);

C) Solução de acetato de sódio anidro 2M: CH_3COONa anidro (8,2 g); água destilada (qsp 50 mL);

D) Solução padrão de íons Fe^{2+} : $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,07 g); H_2SO_4 concentrado (2,5 mL); água destilada (qsp 1000 mL);

Para a obtenção da curva padrão analítica, foram preparadas soluções com concentrações crescentes de Fe^{2+} (0,00; 0,50; 1,25; 2,50; 4,50; 6,25 mg L^{-1}). A estas soluções foi adicionado 5 mL de tampão acetato e 5,0 mL da solução de fenantrolina. Completou-se o volume de todas as soluções para 50 mL com água destilada. Para a construção da curva analítica foi traçado um gráfico de absorbância em função da concentração de íons Fe^{2+} .

Nos ensaios de cinética de crescimento e nos ensaios em frascos agitados foi utilizada uma alíquota de 20 μL de amostra com adição de 10,0 mL de solução de fenantrolina e 10,0 mL da solução de tampão acetato e o volume foi completado a 100 mL com água destilada. A leitura das absorbâncias foi realizada em um espectrofotômetro 600S Femto, utilizando um comprimento de onda de 510 nm.

4.11.4 Determinação da concentração de íons H^+ no meio (produção de ácido)

A determinação da concentração de íons H^+ foi realizada por meio de titulometria de neutralização. Uma alíquota (1 mL) de amostra foi diluída a aproximadamente 50 mL com água destilada. A seguir foram adicionadas 2 gotas de indicador fenolftaleína e então a amostra foi titulada com solução padrão de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até a primeira coloração rósea permanente (VOGEL, 1981).

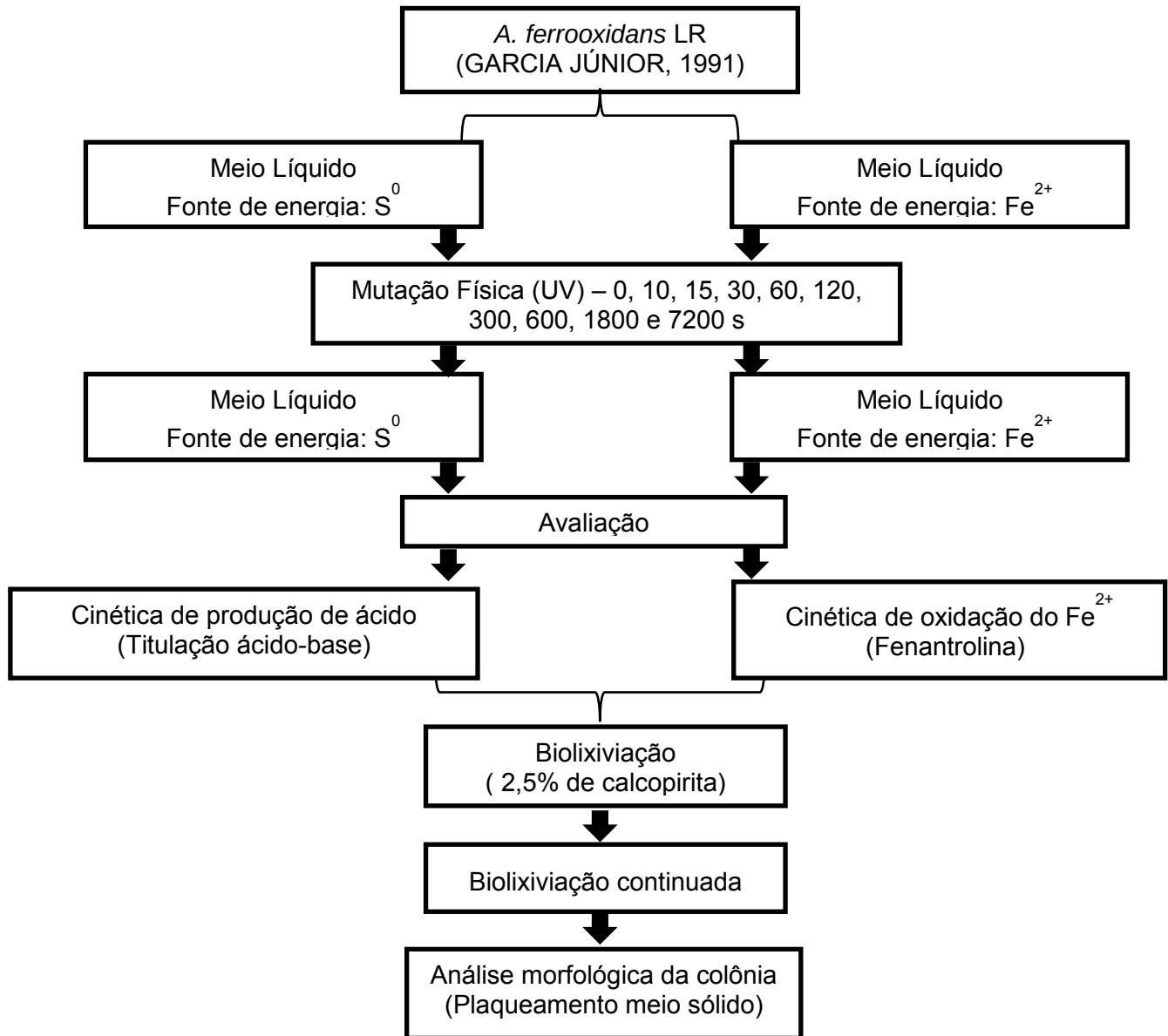
4.11.5 Determinação da concentração de ferro total (Fe_{total}) e cobre total (Cu_{total})

A concentração de ferro e cobre totais foram analisadas por espectrometria de absorção atômica, utilizando um espectrômetro Agilent. A faixa de concentração do padrão de ferro utilizado foi entre 0,06 e 15 ppm e de cobre foi entre 0,06 e 15 ppm. O comprimento de onda utilizado para as leituras de ferro foi de 324,7 nm e de 248,3 nm para as leituras do cobre.

4.12 Fluxograma do procedimento experimental

Os procedimentos de obtenção e avaliação dos mutantes estão esquematizados na Figura 9.

Figura 9 –Fluxograma dos procedimentos de obtenção e avaliação dos mutantes.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de mutantes

Após a exposição da *A. ferrooxidans* LR à radiação ultravioleta durante diferentes períodos de tempo foi observado que quanto maior o tempo de exposição à radiação UV, menor foi a taxa de consumo de íons ferrosos, conforme demonstrado na Figura 10. A diferença visual na taxa de oxidação (Figura 10) permitiu estabelecer uma relação do aumento do tempo de irradiação com a taxa de mortalidade das células.

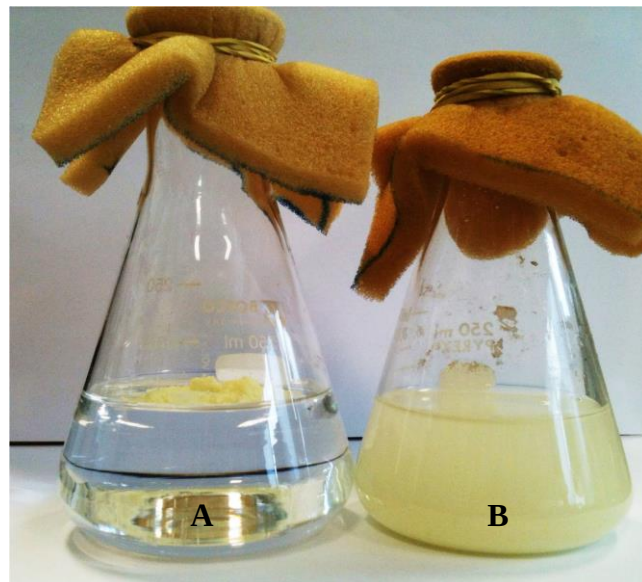
Para que as culturas nomeadas com as letras E até L na Figura 10 alcançassem o mesmo tempo de crescimento em relação a selvagem foram necessários repiques sucessivos para que as células sobreviventes pudessem se multiplicar e alcançar uma velocidade de crescimento semelhante ao do consumo completo de íons ferrosos pela selvagem, o qual levou aproximadamente 48-72 horas com a elevação do potencial de óxido-redução (Eh) a valores próximos a 570 mV (versus Ag|AgCl). O processo de enriquecimento durou aproximadamente 4 semanas.

Figura 10 – Imagem dos repiques realizados após a exposição da *A. ferrooxidans* LR à radiação UV durante: A) 0 s B) 15 s C) 30 s D) 1 min E) 2 min F) 5 min G) 10 min H) 15 min J) 30 min I) 60 min e L) 120 min.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 – Exemplar de uma cultura de *A. ferrooxidans* LR em meio com o enxofre elementar como fonte de energia antes (A) e depois (B) da oxidação do substrato.

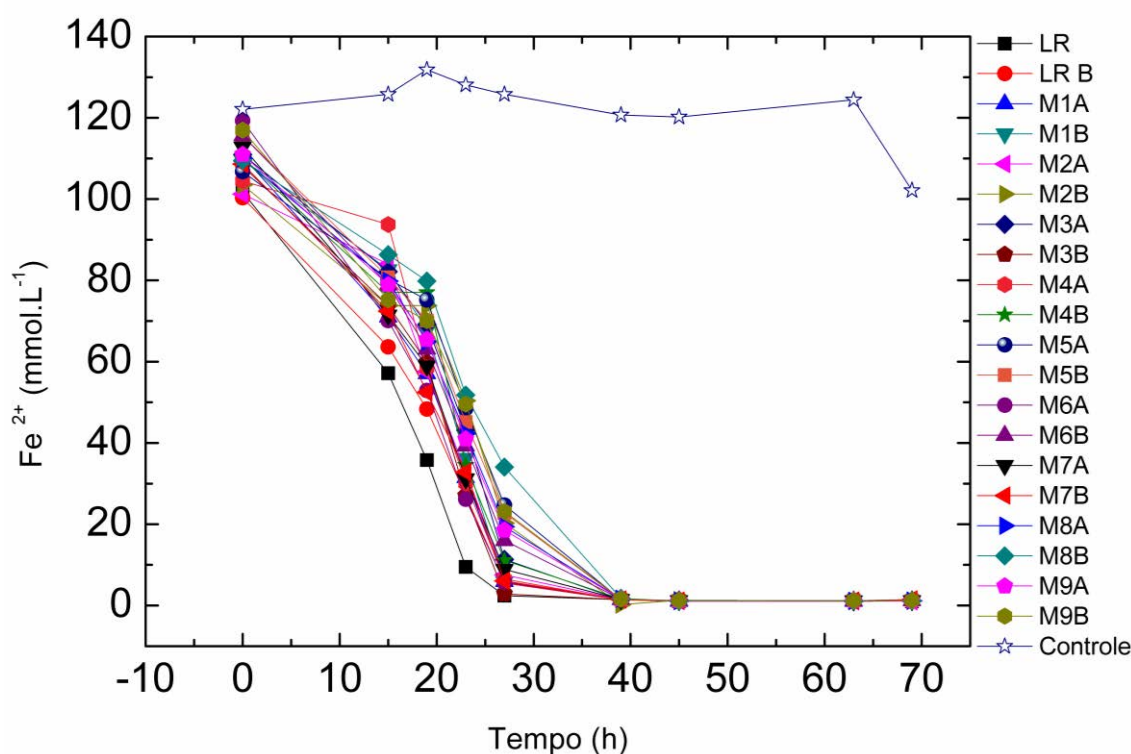


Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Ensaio da cinética de crescimento em Fe^{2+}

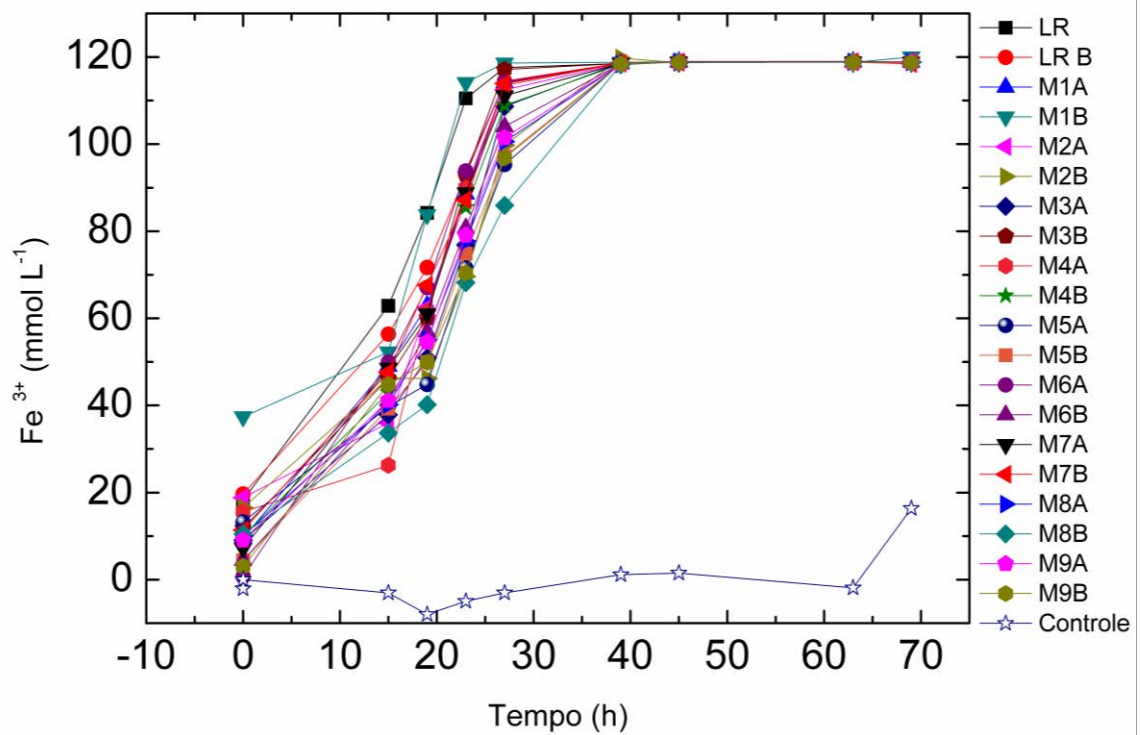
Foram obtidos os perfis cinéticos de oxidação dos íons ferrosos para todos os mutantes conforme demonstrado na Figura 12. A concentração inicial de íons ferrosos foi de 120 mmol L^{-1} . Portanto, quando a concentração de íons férricos atingiu este mesmo valor, pôde se concluir que o substrato havia sido 100% oxidado. Para que fosse possível estabelecer uma relação numérica a fim de comparação do desempenho dos mutantes, foram determinadas as respectivas velocidades iniciais de crescimento das culturas (V_0) (Figura 13). Na Figura 14 está representado o modelo de um destes cálculos, feitos utilizando-se um programa gráfico (Origin Pro 8 - v8.092).

Figura 12 – Variação da concentração dos íons ferrosos pelos mutantes em relação ao tempo.



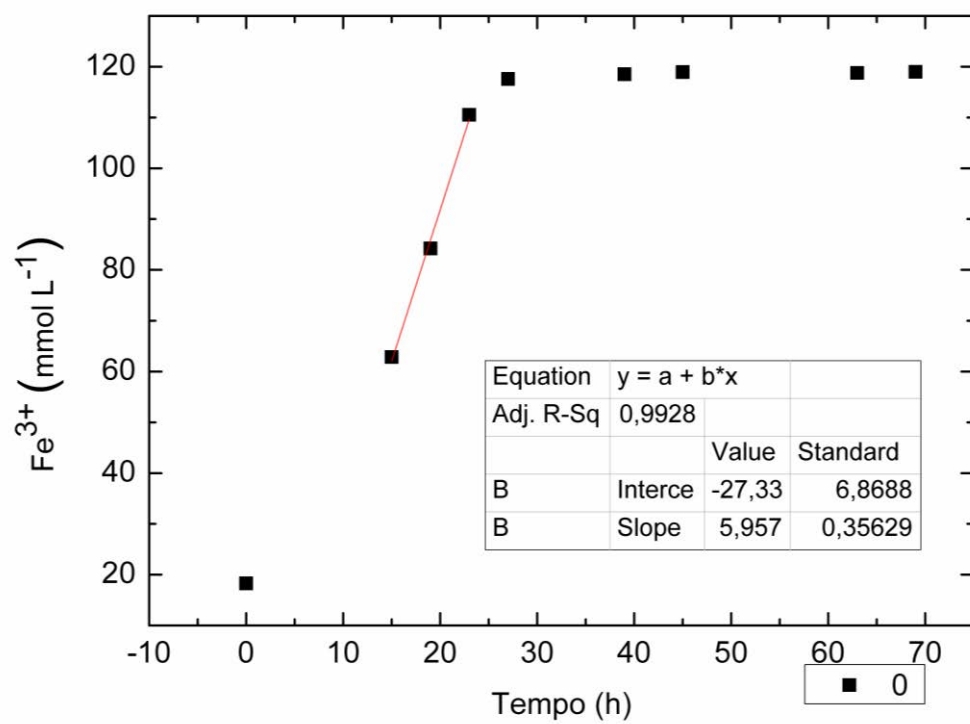
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13 – Variação da produção do íon férrico pelo tempo pelos mutantes crescidos em íons ferrosos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 – Exemplo do cálculo da velocidade inicial a partir da variação da produção de íons férricos pela linhagem LR.



Fonte: elaborado pelo autor.

Por meio da aplicação de regressão linear ao perfil da velocidade da fase exponencial de produção do íon férrico, foi possível obter a taxa de produção de íons férricos (coeficiente angular das curvas) entre as culturas mutantes, as quais se encontram discriminadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Taxa de produção de íons férricos pelos mutantes crescidos em íons ferrosos.

SUSPENSÃO CELULAR	TAXA (mmol L⁻¹ h⁻¹)	R
M4A	7,96	0,99
M1B	7,74	0,99
M3A	7,23	0,99
M3B	7,12	0,98
M2B	6,69	0,99
M1A	6,39	0,99
M2A	6,35	0,99
M5A	6,31	0,99
M7A	6,26	0,99
LR *	5,96	
M5B	5,91	0,99
M6A	5,89	0,98
M6B	5,89	0,99
M9B	5,87	0,99
M9A	5,86	0,99
M8A	5,70	0,99
M4B	5,47	0,99
M7B	5,46	0,99
M8B	3,02	0,97

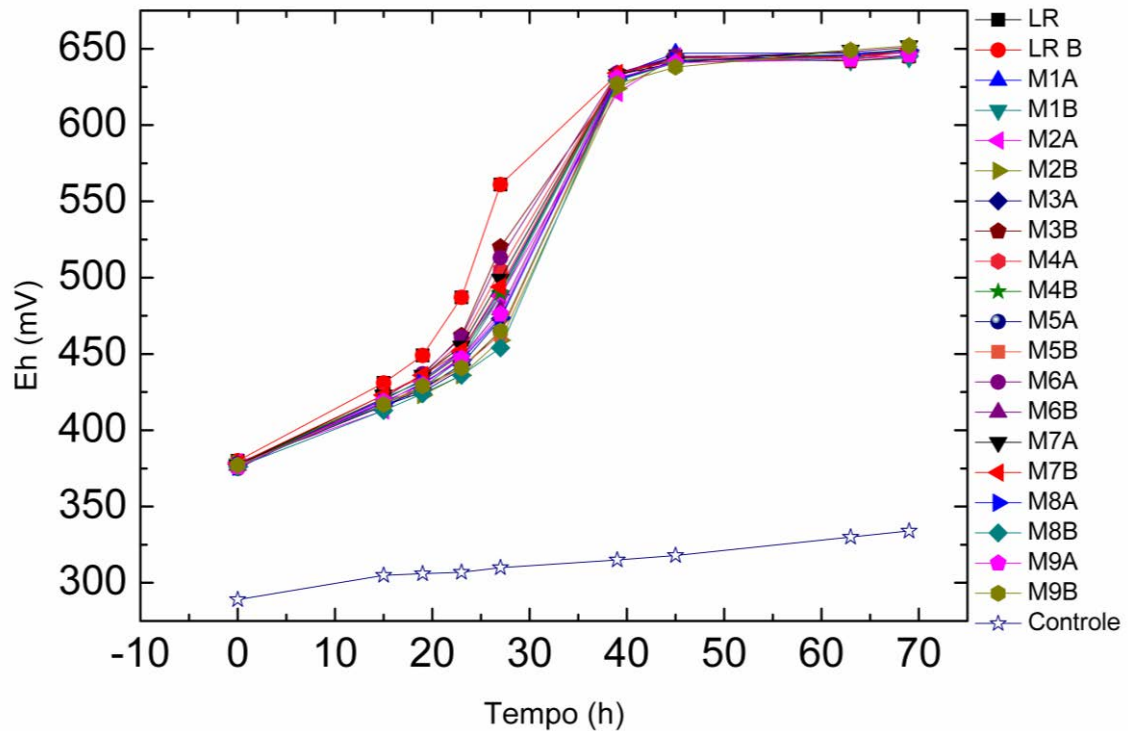
* Média da velocidade de produção da Linhagem LR selvagem.

Fonte: elaborado pelo autor.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 3 permite observar que houve uma variação na taxa de produção de 7,96 a 3,02 mmol L⁻¹ h⁻¹ entre os mutantes, enquanto a linhagem selvagem apresentou, em média, velocidade de 5,96 mmol L⁻¹ h⁻¹, o que indica que a radiação UV alterou o comportamento da linhagem selvagem. De maneira geral o consumo total do íon ferroso levou cerca de 35 horas. Dos 18 mutantes obtidos, nove deles apresentaram maior taxa que a linhagem selvagem. Para cada tempo de exposição foram retiradas duas alíquotas e estes apresentaram taxas diferentes, comprovando a capacidade aleatória da mutação proporcionada pela UV.

Os valores de Eh monitorados neste ensaio estão representados na Figura 15. Os valores obtidos corroboram os dados de oxidação dos íons ferrosos, uma vez que quando atingido 100% de oxidação destes íons (35 horas) os valores de Eh alcançaram o valor máximo e constante de 650 mV.

Figura 15 – Variação do potencial redox do ensaio de cinética de crescimento em íons ferrosos em função do tempo pelas mutantes.



Fonte: elaborado pelo autor.

A influência destes micro-organismos sobre o potencial de óxido-redução do meio pode ser demonstrada através da Equação de Nernst (11), onde (ROSSI, 1990):

E_h (potencial de óxido-redução do meio);

E_0 (potencial de óxido-redução padrão);

R (constante dos gases perfeitos);

T (temperatura);

n (número de mols de elétrons trocados na reação);

F (constante de Faraday);

$[]$ (concentração das espécies iônicas).

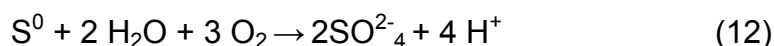
$$E = E_{\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]} \quad (11)$$

O potencial de óxido-redução (Eh) de uma solução é a medida da tendência desta solução de ser oxidada ou reduzida, isto é, sua habilidade de capturar ou liberar elétrons. Assim na presença da bactéria, o potencial é denominado em função do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ gerando perfis como na Figura 15. Em condições abióticas, o potencial eletroquímico dos íons hidratados determina o potencial da solução.

5.3 Ensaio de produção de ácido

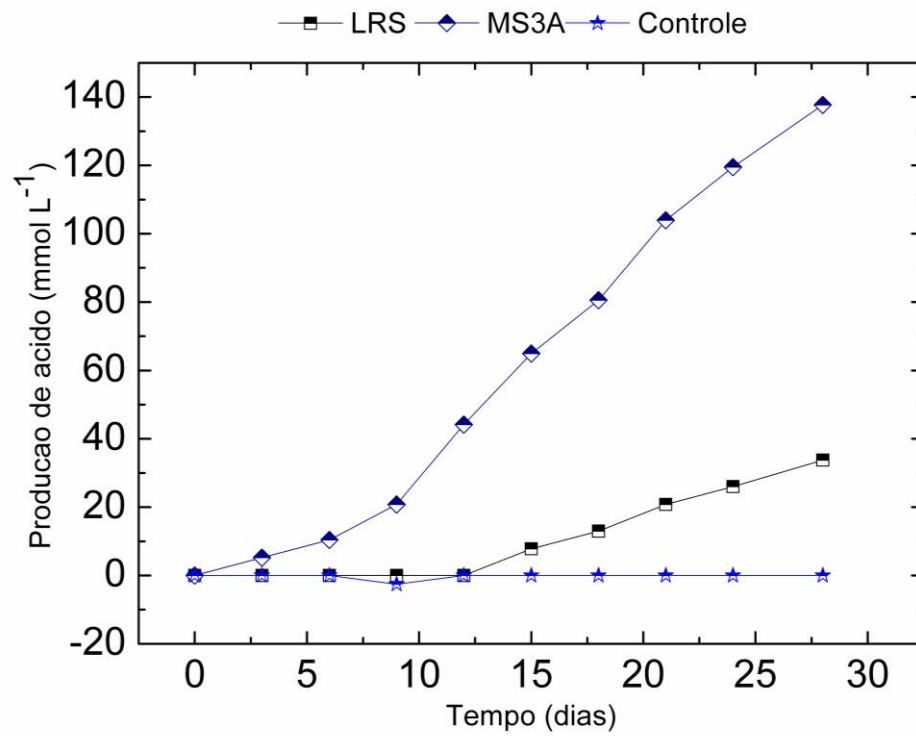
Os mutantes provenientes do cultivo em enxofre foram testados quanto a sua capacidade de produção de ácido (

Figura 16). A geração de ácido ocorre através da atuação da bactéria sobre o enxofre elementar, que ao ser oxidado forma íons H^+ que contribuem para a acidificação do meio (equação 12).



Assim após 28 dias de ensaio, a quantidade de ácido produzido por essas bactérias foi quantificada e verificou-se que uma das culturas mutantes, MS3A, se sobressaiu de forma significativa perante a linhagem selvagem e as outras mutantes. A elevada produção de ácido se refletiu na medida final do pH (Tabela 4). A linhagem MS3A apresentou pH abaixo de 1 (0,91). Este valor de pH alcançado para essa mutante é característico de outra espécie, a *Acidithiobacillus thiooxidans*, encontrada nos ambientes de minas, que oxida compostos reduzidos de enxofre como fonte energética e tem a capacidade de crescer em pH abaixo de 1,0, sendo umas das poucas espécies com a capacidade de crescer nessa faixa de pH (WAKSMAN, S. A., 1922; SCHIPPERS, 1999). Além disso, sabe-se que a espécie *A. ferrooxidans* normalmente cresce em uma faixa de pH de 1,5 - 6,0 com pH ótimo variando de 2,0 a 2,5, mas normalmente não sobrevive abaixo de 1,0 (LEDUC; FERRONI, 1994).

Figura 16 – Variação da produção de ácido pela mutante MS3A com relação ao tempo em meio contato enxofre elementar como fonte de energia.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Concentração de ácido e pH final após 28 dias do ensaio de produção de ácido pelos mutantes crescidos em enxofre elementar.

SUSPENSÃO CELULAR	PRODUÇÃO DE ÁCIDO	pH final
	(mmol L ⁻¹)	
MS3A	137,72	0,91
MS5A	59,77	1,24
MS7A	51,97	1,31
MS9B	51,97	1,32
MS1A	49,37	1,20
MS1B	49,37	1,25
MS6B	49,37	1,36
MS8A	49,17	1,30
MS2A	46,77	1,31
MS6A	46,77	1,37
MS8B	46,77	1,29
MS9A	46,77	1,37
MS3B	44,17	1,31
MS4B	41,58	1,36
MS7B	41,58	1,39
MS2B	36,38	1,42
MS4A	36,38	1,39
MS5B	36,38	1,44
LRS	33,78	1,40
Controle	0	2,73

Fonte: elaborado pelo autor.

Essa elevada produção de ácido tem considerável potencial na biolixiviação, pois a oxidação de compostos de enxofre reduzidos leva a uma diminuição do pH do meio, o que promove um ataque protônico sobre o mineral (SCHIPPERS; SAND, 1999), além de minimizar a precipitação de jarositas e facilitar a remoção da camada de enxofre da superfície dos minerais presentes nos meios de lixiviação, tornando esses substratos mais acessíveis à biolixiviação (BEVILAQUA et al., 2002).

5.4 Ensaios de biolixiviação na presença de calcopirita

Os valores do potencial redox durante o ensaio de biolixiviação são mostrados na Figura 17. Independentemente do tempo de irradiação, a curva de potencial seguiu o mesmo perfil da linhagem original. Pôde ser observada uma elevação contínua dos valores de Eh, estabilizando-se em torno de 550 mV para todas as culturas de mutantes testadas, com exceção do mutante obtido a partir do cultivo em enxofre e do frasco controle. Este último apresentou um valor estabilizado ao redor de 350 mV após 10 dias, o que era esperado, uma vez que por ter sido cultivado em enxofre em repiques sucessivos a capacidade de oxidar íons ferrosos fica afetada. Até cerca de 40 dias as culturas em enxofre apresentaram um comportamento muito semelhante ao controle, quando então apresentou elevação abrupta do potencial, assemelhando-se aos outros mutantes ao final do ensaio.

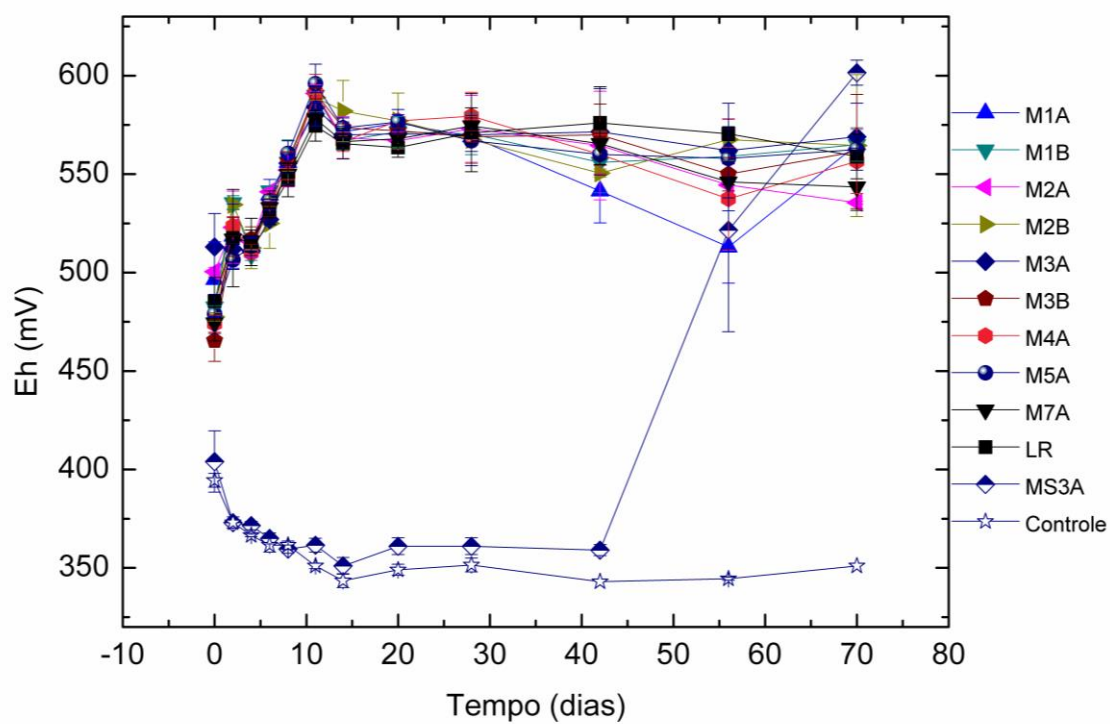
Todos os frascos inoculados apresentaram um aumento nos valores de pH nos primeiros 10 dias ficando em torno de 2,0 (Figura 18). Este aumento é consequência do consumo de ácido pelo próprio mineral e/ou à oxidação biológica da calcopirita que é uma reação que consome ácido, como pode ser observado nas equações 6 e 7.

Neste experimento, quando o pH esteve em torno de 2,0, houve o ajuste do mesmo de maneira a evitar a precipitação dos íons férricos, que podem dificultar a dissolução da calcopirita (STOTT et al., 2000).

Foram realizadas medidas periódicas em relação ao consumo da fonte de energia (Figura 19). Foi observado que a concentração dos íons ferrosos nos frascos inoculados manteve-se muito baixa ($<3 \text{ mmol L}^{-1}$) na primeira semana de ensaio e praticamente não detectável após este período. Nos frascos controle

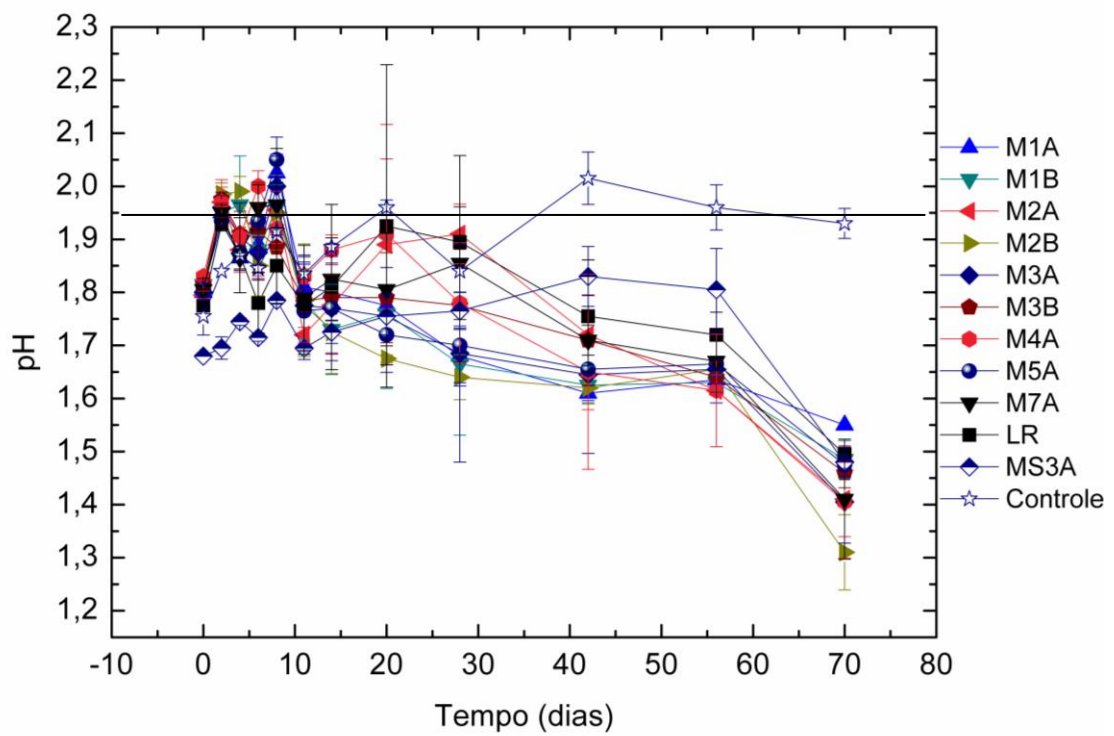
elevou-se continuamente atingindo 9 mmol L^{-1} no final do ensaio, conforme mostrado na Figura 19.

Figura 17 – Variação do potencial de oxi-redução no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



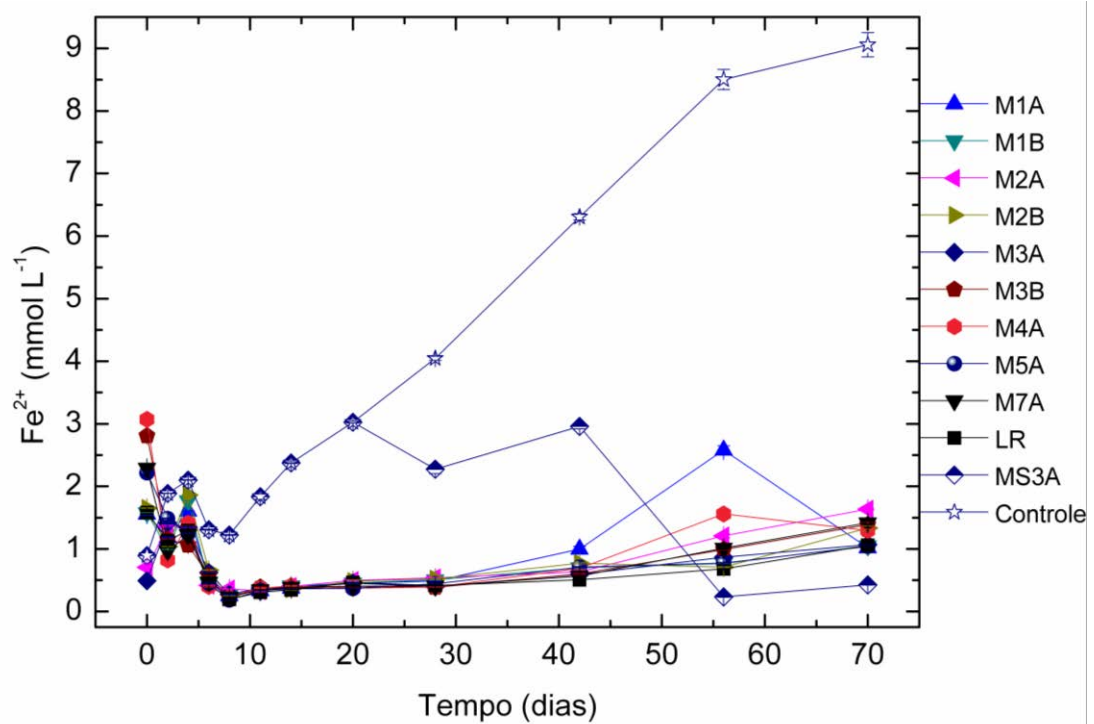
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18 – Variação do pH no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19 - Consumo de íons ferrosos no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



Fonte: elaborado pelo autor.

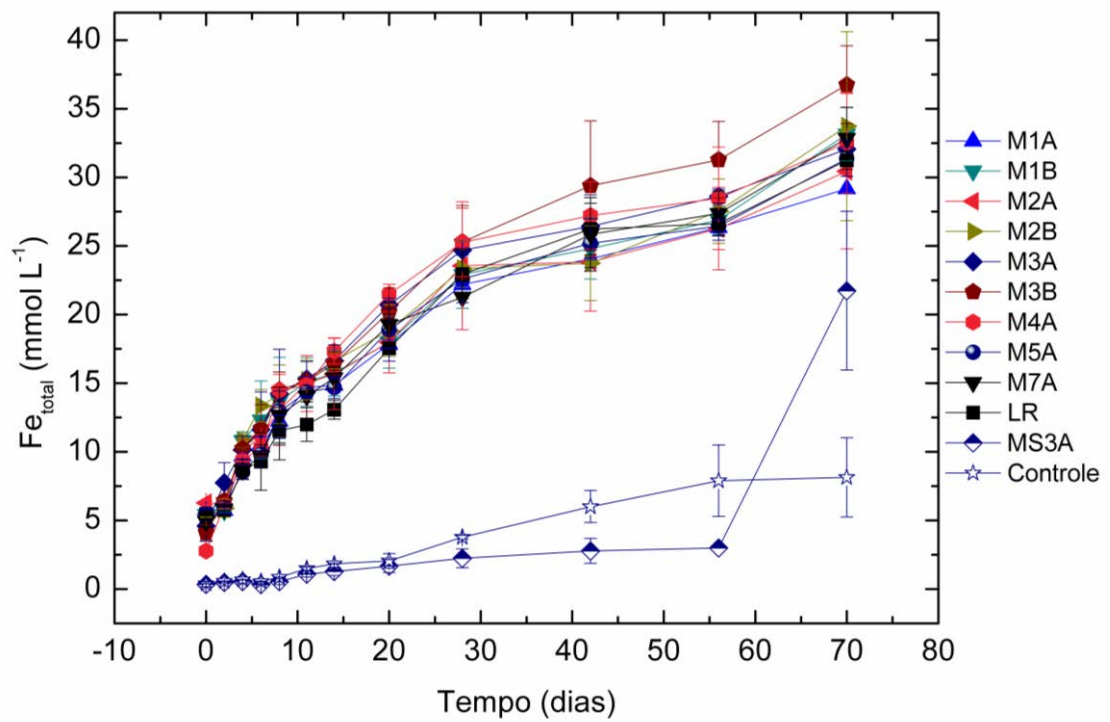
A concentração do ferro total ($\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$), Figura 20, nos ensaios em frascos agitados aumentou continuamente no decorrer do ensaio para todas as condições testadas, com exceção dos frascos controle. A princípio o mutante do cultivo em enxofre elementar apresentou o mesmo perfil dos frascos controles (MS3A), evidenciando alguma atividade somente depois do 56º dia. Estes resultados provavelmente estão relacionados à oxidação da calcopirita que resulta na liberação de ferro, e na habilidade destes micro-organismos oxidarem este substrato.

A solubilização do cobre foi outro parâmetro acompanhado durante o ensaio, conforme mostrado na Figura 21. Foi possível observar diferenças significativas entre os diversos mutantes, porém esta diferença é observada de maneira mais evidente nos primeiros 10 dias de ensaio, destacados na Figura 22.

Ao final do ensaio (70 dias de monitoramento) as diferenças entre a quantidade de cobre solúvel total extraído foram menos significativas. Dentre as culturas, o mutante M3B alcançou a maior extração, que atingiu 27,9 % ($2,15 \text{ g L}^{-1}$) em relação a 22,6% ($1,75 \text{ g L}^{-1}$) da linhagem selvagem LR. Além disso, foi alcançado uma taxa de extração de $1,66 \text{ mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ pela M2B, que apresentou uma taxa 22% maior quando comparada a linhagem selvagem ($1,36 \text{ mmol L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

Outro fato que merece destaque é o início da extração de cobre pela cultura MS3A. Apesar dessa linhagem de *A. ferrooxidans* ter sido cultivada em meio contendo enxofre, o qual apresenta uma hidrofobicidade maior do que o íon ferroso e que causa uma modificação da sua superfície celular, favorecendo a interação entre a bactéria e a superfície do minério (van LOOSDRECHT, 1987; CURUTCHET, 2000; SAMPSON, 2000), a extração de cobre para esse mutante ocorreu após 55 dias, alcançando 18,4% de solubilização. A intensa atividade bacteriana foi comprovada pelo potencial redox acima de 600 mV e pelo consumo dos íons ferrosos provenientes da calcopirita estudada.

Figura 20 – Variação da concentração de ferro total no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



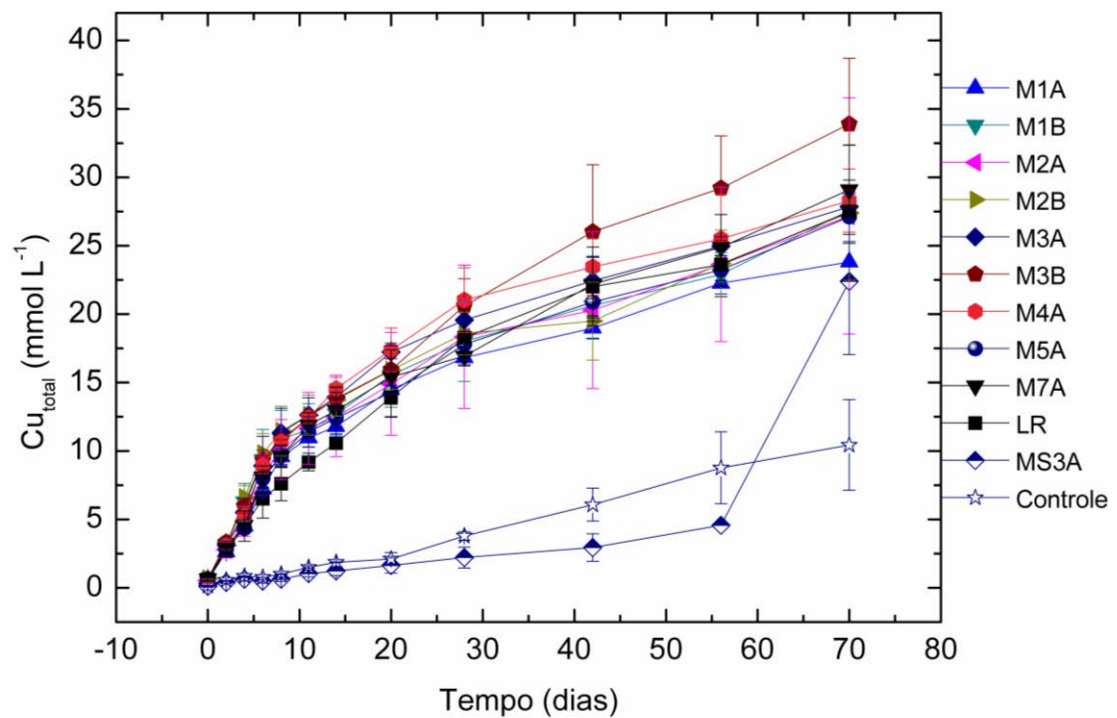
Fonte: elaborado pelo autor.

Existem poucos estudos que avaliaram os micro-organismos biolixiviantes e que sofreram mutação quanto à capacidade de solubilizarem cobre a partir de minerais. Um deles foi realizado por Xu et al. (2010), que utilizou condições comparáveis com as empregadas neste trabalho, tais como: mesma espécie (*A. ferrooxidans*), calcopirita, mutação induzida por UV e ensaios realizados em frasco a 30°C e 150 rpm. No estudo dos autores supracitados, a linhagem mutante avaliada solubilizou após 30 dias um total de 1,98 g L⁻¹ de cobre, valor superior a linhagem selvagem (1,77 g L⁻¹). Comparando os resultados obtidos no presente estudo aos de Xu et al. (2010), os resultados mostraram um ganho na extração de Cu de 23 %, enquanto que Xu et al. (2010) foi de 11%.

Dong et al.(2011) realizaram biolixiviação em minério com baixo teor de cobre com a mesma espécie (*A. ferrooxidans*) radiada com UV. Os autores demonstraram uma extração de 30,8% de cobre do sistema pelos mutantes comparado com 26,4 % da cultura selvagem, promovendo uma melhora de 17%, reforçando novamente a atuação positiva da radiação sobre a bactéria em termos de melhora na extração de cobre.

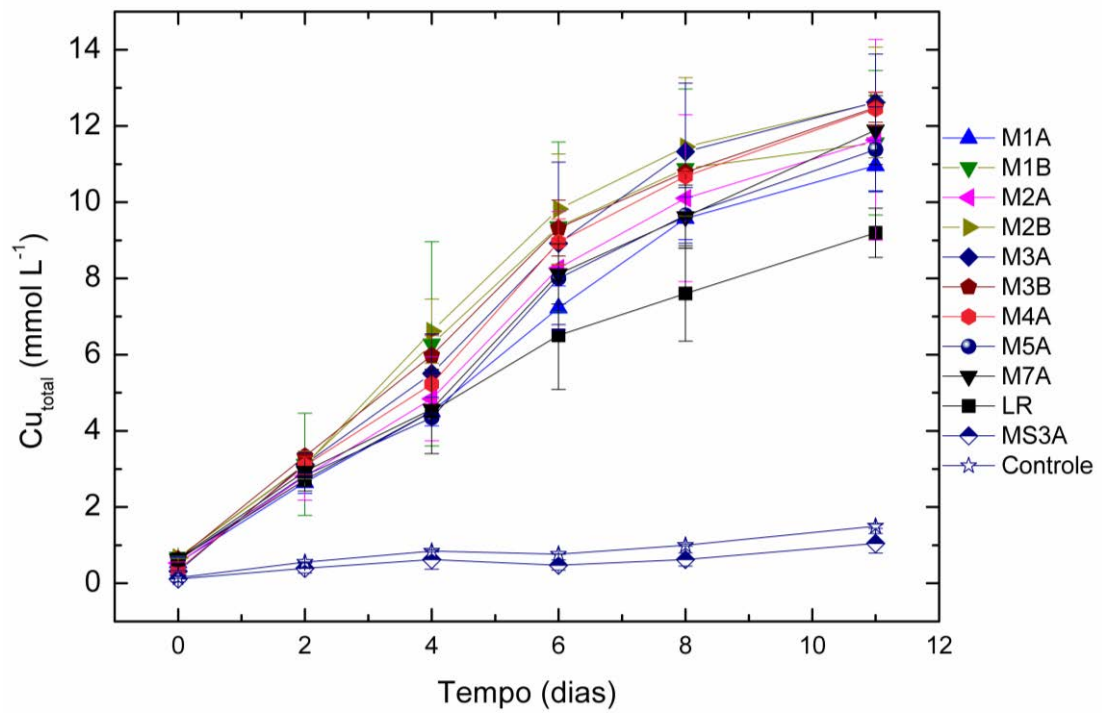
Todo o trabalho experimental desenvolvido neste estudo foi realizado em escala de bancada. O que pode parecer pouco significativo nesta escala, quando dimensionado para uma situação real, em que são tratados toneladas de material, assume proporções muito significativas.

Figura 21 - Variação da concentração de cobre em solução no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22 – Variação da concentração de cobre solubilizado após 11 dias no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.



Fonte: elaborada pelo autor.

Os ensaios de biolixiviação permitiram estudar a cinética de consumo por parte dos mutantes que utilizavam sulfeto mineral como substrato. A velocidade inicial que cada mutante alcançou durante o ensaio possibilitou a comparação da sua capacidade de solubilização do cobre (Tabela 5). Dentre as suspensões utilizadas, a M5A foi a que apresentou maior velocidade de oxidação dos íons ferrosos, o que necessariamente não resultou em uma solubilização maior de cobre. A linhagem M3B foi a única que alcançou valores significativamente maiores de solubilização de cobre que a linhagem selvagem.

Tabela 5 – Velocidade inicial e porcentagem de extração no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.

SUSPENSÃO CELULAR	V ₀ (mmol L ⁻¹ .dia ⁻¹)	R	EXTRAÇÃO DE Cu (%)
M5A	1,79	0,98	22,32
M2B	1,38	0,98	22,56
M3A	1,38	0,99	22,93
M4A	1,29	0,99	23,30
M1B	1,25	0,99	22,71
M3B	1,25	0,99	27,91
M2A	1,18	0,99	22,38
M1A	1,09	0,99	19,62
LR	0,96	0,99	22,63
M7A	0,85	0,99	23,96

Fonte: elaborada pelo autor.

Ao se expressar a taxa de solubilização de cobre para as diversas condições avaliadas no período total de ensaio (70 dias) observa-se que, de maneira geral, na primeira semana (amostragem de 2, 4 e 6 dias) os mutantes apresentaram maior taxa de solubilização de cobre que a linhagem selvagem. Na amostragem do oitavo dia os valores se equipararam aos da linhagem selvagem no segundo dia. Nas amostragens seguintes as diferenças não são mais significativas e diminuem progressivamente até o final do ensaio. Esse comportamento encontra-se descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Taxas de solubilização do cobre em relação ao dia no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita.

Tempos (dias)	TAXA (mmol L ⁻¹ dia)											
	M1A	M1B	M2A	M2B	M3A	M3B	M4A	M5A	M7A	LR	MS3A	Controle
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1,32	1,56	1,40	1,55	1,56	1,66	1,54	1,41	1,47	1,36	0,28	0,20
4	1,13	1,57	1,21	1,65	1,38	1,40	1,31	1,09	1,14	1,13	0,21	0,16
6	1,20	1,56	1,38	1,64	1,49	1,47	1,49	1,33	1,45	1,08	0,13	0,08
8	1,20	1,36	1,26	1,43	1,42	1,35	1,33	1,21	1,28	0,95	0,12	0,08
11	1,00	1,05	1,06	1,15	1,15	1,16	1,13	1,03	1,14	0,84	0,14	0,10
14	0,84	0,91	0,89	0,98	0,99	1,03	1,04	0,89	0,99	0,76	0,13	0,09
20	0,73	0,78	0,74	0,80	0,86	0,82	0,87	0,71	0,84	0,70	0,11	0,08
28	0,60	0,64	0,66	0,66	0,70	0,79	0,75	0,64	0,60	0,65	0,14	0,08
42	0,45	0,49	0,48	0,46	0,53	0,70	0,56	0,50	0,57	0,51	0,14	0,07
56	0,40	0,41	0,42	0,42	0,45	0,57	0,46	0,42	0,47	0,41	0,16	0,08
70	0,34	0,39	0,39	0,39	0,40	0,53	0,40	0,39	0,45	0,39	0,15	0,32

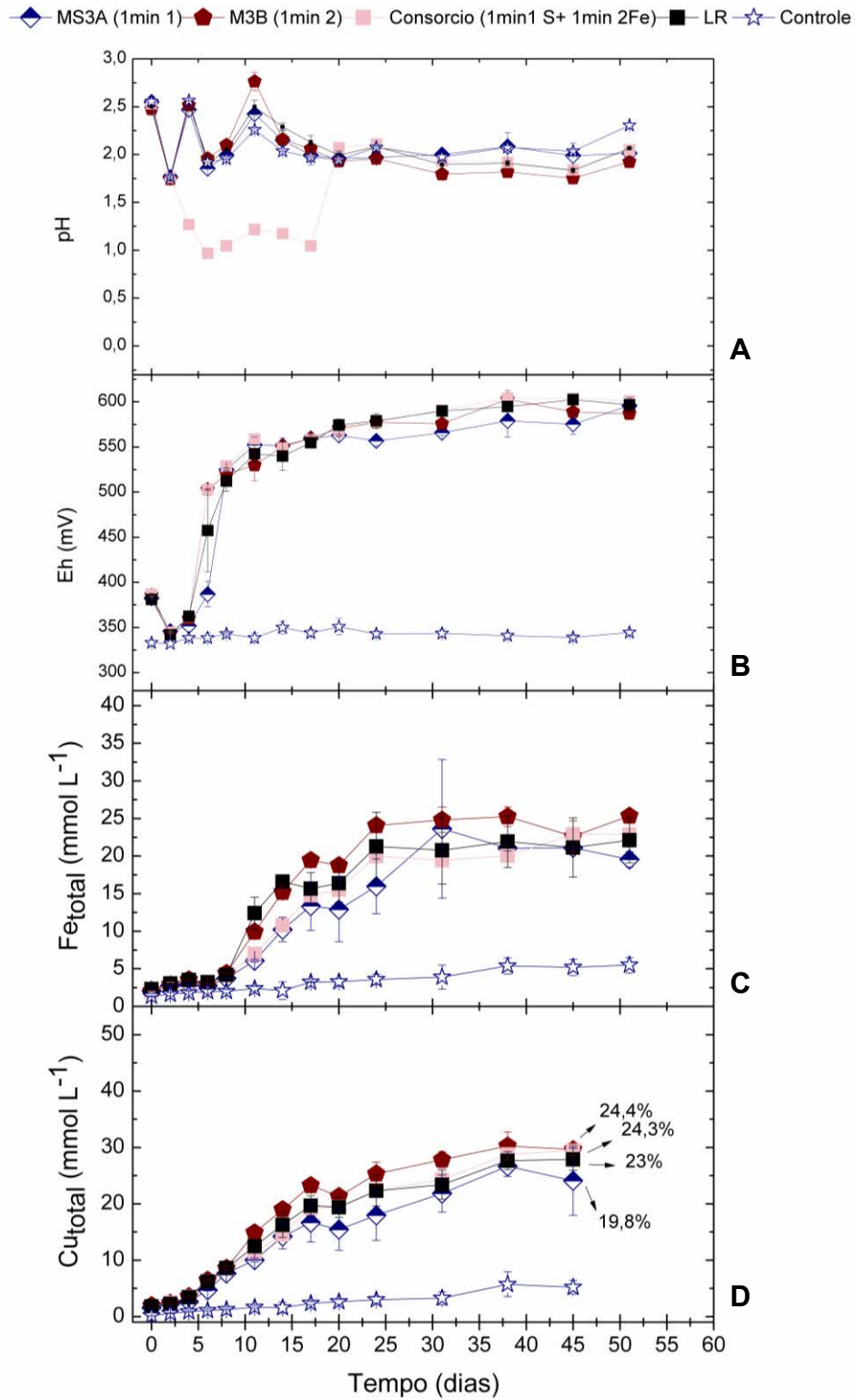
Fonte: elaborada pelo autor.

5.5 Ensaio de biolixiviação continuada na presença de calcopirita

As culturas crescidas após 70 dias serviram de inóculo para novo ensaio de crescimento em frascos agitados. O objetivo deste ensaio era avaliar se após este longo período as culturas estariam mais aptas a biolixiviarem a calcopirita, sobretudo a linhagem MS3A, que apresentou um elevado aumento na solubilização de cobre após 55 dias de ensaio. Além destas condições, foi montado um consórcio com as linhagens M3B e MS3A. Assim esse inóculo em meio fresco permitiu visualizar a continuação do processo e caracterizar o perfil cinético da solubilização do cobre, bem como possibilitar o monitoramento de outros parâmetros como Eh, pH e ferro total (Figura 23).

De acordo com os resultados mostrados na Figura 23, as culturas inoculadas não apresentaram diferenças significativas quanto a evolução dos parâmetros avaliados, Eh, pH e ferro total. Outros estudos realizados utilizando a mesma espécie e calcopirita como sulfeto mineral, a adaptação permitiu um aumento da extração quando comparados com o ensaio na ausência da adaptação (LIZAMA, 1987; CANCHO, 2007).

Figura 23 – Variação do (A) pH, (B) Eh, (C) ferro total e (D) cobre total no ensaio de biolixiviação continuada na presença de calcopirita.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nas primeiras duas semanas a linhagem M3B apresentou cinética de solubilização de cobre mais elevada, seguida pela linhagem selvagem LR, consórcio e finalmente a linhagem MS3A. Porém ao final do ensaio as diferenças entre as condições avaliadas não foram mais evidentes.

Tabela 7 – Avaliação da velocidade inicial e porcentagem de extração de cobre no ensaio de biolixiviação continuada na presença da calcopirita.

SUSPENSÃO CELULAR	V_0 (mmol L⁻¹ dia⁻¹)	R	EXTRAÇÃO DE Cu (%)
M3B	1,5229	0,99	24,4
LR	1,2822	0,99	23
Consórcio	1,1591	0,99	24,3
MS3A	1,1235	0,99	19,8

Fonte: elaborada pelo autor.

Em comparação com o ensaio anterior, onde as taxas de solubilização de cobre foram maiores nos primeiros dias, no ensaio de biolixiviação continuada não foi observada essa elevação (Tabela 8). Apesar de ambos os ensaios terem a mesma quantidade de inóculo (5% v/v) nada se pode afirmar quanto as condições metabólicas após os 70 dias do primeiro ensaio. Provavelmente o numero de células viáveis deste inóculo foi menor do que o esperado. Em relação a esta condição, deve-se ressaltar que o controle entre células viáveis e não viáveis para esses organismos acidofílicos ainda não é bem estabelecido na literatura.

Tabela 8 - Taxa de solubilização do cobre na biolixiviação continuada na presença da calcopirita em relação ao tempo.

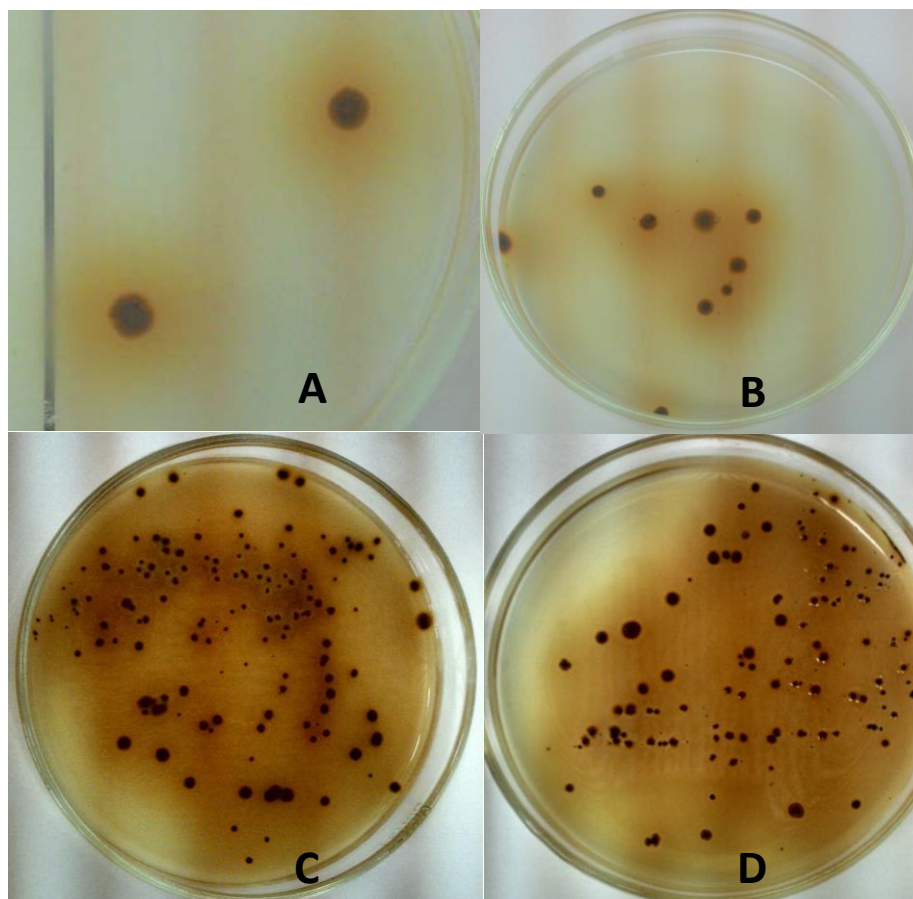
TEMPO	TAXA (mmol.L ⁻¹ . dia ⁻¹)				
	MS3A	M3B	Consórcio	LR	Controle
0	0	0	0	0	0
2	1,15	1,20	1,26	1,13	0,29
4	0,66	0,90	0,89	0,85	0,22
6	0,78	1,08	1,04	1,03	0,18
8	0,96	1,08	1,06	1,08	0,16
11	0,91	1,35	1,04	1,13	0,15
14	1,02	1,36	1,04	1,16	0,11
17	0,98	1,37	1,13	1,16	0,14
20	0,77	1,07	0,97	0,97	0,13
24	0,75	1,06	0,93	0,93	0,12
31	0,70	0,90	0,78	0,75	0,11
38	0,70	0,80	0,76	0,73	0,15
45	0,54	0,66	0,66	0,62	0,12
52	0,56	0,61	0,70	0,58	0,12

Fonte: elaborada pelo autor.

De forma a complementar o estudo realizado sobre a capacidade de modificação pela radiação UV foi realizado um plaqueamento em meio sólido contendo como fonte de energia os íons ferrosos. Os inóculos utilizados foram retirados após a biolixiviação continuada. Foi então possível verificar a ausência de modificações aparentes na morfologia das suspensões irradiadas com UV quando comparadas com a LR sem o procedimento de irradiação. A manutenção da morfologia das colônias pode confirmar uma alta eficiência do mecanismo de correção de possíveis modificações genéticas da *A. ferrooxidans* linhagem LR, podendo impedir possíveis mutações negativas. Além da forma da colônia, todas as suspensões apresentaram colônias marrom-avermelhadas, resultantes da precipitação do ferro III, apresentando características semelhantes, conforme também reportado por Garcia Jr. (1991), que realizou o isolamento dessa linhagem LR no mesmo meio sólido.

0

Figura 24 – Morfologia das colônias das linhagens (A) selvagem LR, (B) M3, (C) MS3A e (D) consórcio que foram obtidas através do plaqueamento após biolixiviação.



Fonte: elaborada pelo autor.

CONCLUSÃO

Com a aplicação de radiação ultravioleta foram gerados prováveis mutantes da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR obtidos a partir de meio contendo enxofre elementar quanto íons ferrosos como fonte energética. Além disso, a mutação gerou micro-organismos com a capacidade de melhorar a cinética do processo de biolixiviação da calcopirita quando comparados com a linhagem selvagem LR.

- O processo de radiação ultravioleta permitiu gerar nove mutantes mais eficientes na cinética de oxidação de íons ferrosos e um mutante capaz de produzir ácido e reduzir o pH abaixo de 1 quando em meio contendo enxofre elementar.
- As bactérias mutantes selecionadas para o ensaio de biolixiviação apresentaram uma cinética de solubilização de cobre maior que a linhagem selvagem LR quando analisadas nos primeiros 11 dias de experimento.
- Ao final do primeiro ensaio de biolixiviação da calcopirita não foi observado diferenças significativas entre os mutantes avaliados e a linhagem selvagem. O mutante (M3B) apresentou maior velocidade inicial de solubilização de cobre e extração final que as demais linhagens estudadas.
- A cultura mutante MS3A, obtida após crescimento em enxofre, após 55 dias de ensaio na presença de calcopirita apresentou uma elevação brusca na solubilização de cobre, o que evidencia a capacidade de utilização de íons ferrosos e sulfeto como fonte de energia.
- As culturas (linhagem selvagem LR, a M3B e a MS3A) utilizadas na biolixiviação continuada não demonstraram uma diferença significativa na extração de cobre quando comparadas com o primeiro ensaio de biolixiviação.

- Mesmo após a segunda biolixiviação, e, portanto mais de 4 meses em meio contendo sulfeto, as culturas não apresentaram nenhuma alteração morfológica, sem fonte suplementar de energia o que poderia levar a um stress metabólico.

Referências

ACEVEDO, F. Present and future of bioleaching in developing countries. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 196-199, 2002.

AKCIL, A. Potencial bioleaching developments to words comercial reality: Turkish metal mining's future. **Minerals Engineering**, v. 17, n. 3, p. 477-480, 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Replicação, reparo e recombinação do DNA. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 5, p. 263-328.

ALVARADO, S.; MALDONADO, P.; JAQUES, I. Energy and enviromental implications of Cooper production. **Energy**, v. 24, n. 4, p. 307-316, 1999.

ANDREWS, G. F.; MacZUGA, J. Bacterial removal of pyrite from coal. **Fuel**, v. 63, n. 3, p. 297-302, 1984.

BARRON, J. L.; LUEKING, D. R. Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2801-2806. 1990.

BATTY, J. D.; RORKE, G. V. Development and commercial demonstration of the BioCOP™ thermophile process. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1/4, p. 83-89, 2006.

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

BEVILAQUA, D. **Estudo da interação do *Acidithiobacillus ferrooxidans* com calcopirita (CuFeS₂) e bornita (Cu₅FeS₄)**. 2003. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

BEVILAQUA, D.; LEITE, A. L. L. C.; GARCIA JUNIOR, O.; TUOVINEN, O. H. Oxidation of chalcopirite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 587-592, 2002.

BEVILAQUA, D.; DIEZ-PEREZ, I.; FUGIVARA, C. S.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; GARCIA JÚNIOR, O. Oxidative dissolution of chalcopirite (CuFeS₂) by *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by electrochemical impedance spectroscopy and atomic force microscopy. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 1, p. 79-84, 2004.

BRIERLEY, C. L. Microbial mining. **Scientific American**, v. 247, p. 42-51, 1982.

BRIERLEY, C. L. Biohydrometallurgical prospects. **Hydrometallurgy**, v. 104, n. 3/4, p. 324-328, 2010.

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

BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Present and future applications of biohydrometallurgy. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2/3, p. 233-239, 2001.

BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. **Applied Microbiology of Biotechnology**, v. 97, p. 7543-7552, 2013.

CABRERA, G.; GOMEZ, J. M.; CANTERO, D. Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2683-2687, 2005.

CANCHO, L.; BLÁZQUEZ, M. L.; BALLESTER, A.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J. A. Bioleaching of a chalcopirite concentrate with moderate thermophilic microorganisms in a continuous reactor system. **Hydrometallurgy**, v. 87, n. 3/4, p. 100-111. 2007.

CHEN, L.; LIN, J.; LI, B.; LIN, J.; LIU, X. Method development for electrotransformation of *Acidithiobacillus caldus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 39-44, 2010.

CHI, R.; HUANG, X.; XIAO, C.; WU, Y.; ZHANG, W. Bioleaching of soluble phosphorus from rock phosphate containing pyrite with DES-induced *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Central South University of Technology**, v. 16, n. 5, p. 758-762, 2009.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. Introdução ao ultravioleta/visível. In: _____. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. Cap. 1, p. 1-54.

CLARK, D. A.; NORRIS, P. R. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. **Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 785-790, 1996.

COLMER, A. R.; HINKLE, M. E. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. **Science**, v. 106, n. 2751, p. 253-256, 1947.

COLMER, A. R.; TEMPLE, K. L.; HINKLE, M. E. An iron-oxidizing bacterium from acid drainage of some bituminous coal mines. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 3, p. 317-328, 1950.

CÓRDOBA, E. M.; MUÑOZ, J. A.; BLÁZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; BALLESTER, A. Leaching of chalcopirite with ferric ion. Part I: general aspects. **Hydrometallurgy**, v. 93, n. 3/4, p. 81-87, 2008.

COX, M. M.; NELSON, D. L. Nucleotides and nucleic acids. In: _____. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. Cap. 8, p. 271-302.

CURUTCHET, G.; DONATI, E. Iron-oxidizing and leaching activities of sulphur-grow *Thiobacillus ferrooxidans* cell on other substrates: effect of culture pH. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 90, p. 54-58, 2000.

DAS, A.; MISHRA, A. K. Role of *Thiobacillus ferrooxidans* and sulphur (sulphide) – dependent ferric-ion-reducing activity in the oxidation of sulfide minerals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 377-382, 1996.

DEVASIA, P.; NATARAJAN, K. A. Bacterial leaching: biotechnology in the mining industry. **Resonance**, v. 9, n. 8, p. 27-34, 2004.

DEVECI, H.; AKCIL, A.; ALP, I. Parameters for control and optimization of bioleaching of sulfide minerals. In: KONGOLI, F.; THOMAS, B. G.; SAWAMIPHAKDI, K. (Ed.). **Modeling, control and optimization in ferrous and nonferrous industry: proceedings of the Symposium held at the Materials Science & Technology Conference**. Warrendale: Minerals, Metals & Materials Society, 2003. p. 77-90.

DONG, Y.; LIN, H.; WANG, H.; MO, X.; FU, K; WEN, H. Effects of ultraviolet irradiation on bacteria mutation and bioleaching of low-grade copper tailings. **Minerals Engineering**, n. 24, p. 870-875, 2011.

DREISINGER, D. Copper leaching from primary sulfides: options for biological and chemical extraction of copper. **Hydrometallurgy**, v. 83, n. 1/4, p. 10-20, 2006.

DUTRIZAC, J. E.; MacDONALD, R. J. C. The effect of sodium chloride on the dissolution of chalcopyrite under simulated dump leaching conditions. **Metallurgical and Materials Transactions B**, v. 2, n. 8, p. 2310-2312, 1971.

EMPRESAS NUCLEARES BRASILEIRAS. **MA-42**: determinação gravimétrica de sulfeto e sulfato em minérios. [Rio de Janeiro, 1980]. Método de análise.

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

GARCIA JUNIOR, O.; BEVILAQUA, D. Microrganismos, minerais e metais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. Cap. 3, p. 49-81.

GARCIA JUNIOR, O.; URENHA, L. C. Lixiviação bacteriana de minérios. In: LIMA, U. L. **Biotechnology industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. v. 3, cap. 22, p. 285-512.

HABASHI, F. **Chalcopyrite**: its chemistry and metallurgy. New York: MacGraw-Hill, 1978. 165 p.

HANSFORD, G. S.; VARGAS, T. Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2/3, p. 135-145, 2001.

HOLMES, D. S.; BONNEFOY, V. Genetic and bioinformatic insights into iron and sulfur oxidation mechanisms of bioleaching organisms. In: RAWLINGS, D. E.; JOHNSON, D. B. (Ed). **Biomining**. Berlin: Springer, 2007. Cap. 16, p. 281-307.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 6. ed. 2011. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00001669.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 7. ed. 2012. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites/1300/1382/00002806.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2013

IVARSON, K. C. Microbiological formation of basic ferric sulfates. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 16, p. 23-33, 1973.

JIN, S. M.; YAN, W. M.; WANG, Z. N. Transfer of IncP plasmids to extremely acidophilic *Thiobacillus thiooxidans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 429-430, 1992.

KANG, J.; QIU, G.; GAO, J.; WANG, H.; WU, X.; DING, J. Bioleaching of chalcocite by mixed microorganisms subjected to mutation. **Journal of Central South University of Technology**, v. 16, n. 2, p. 218-222, 2009.

KUSANO, T.; SUGAWARA, K.; INOUE, C.; TAKESHIMA, T.; NUMATA, M.; SHIRATORI, T. Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6617-6623, 1992.

LAWSON, E. N.; NICHOLAS, C. J.; PELLAT, H. The toxic effects of chloride ions on *Thiobacillus ferrooxidans*. In: VARGAS, T.; JEREZ, C. A.; WIERTZ, J. V.; TOLEDO, H. **Biohydrometallurgy processing**. Santiago: University of Chile, 1995. v. 1, p. 165-174.

LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. **FEMS Microbiology Review**, v. 14, n. 2, p. 103-120, 1994.

LEXIAN, X.; JIA, Z.; JIANLAN, D.; YI, Y.; BO, Z.; JIANSHE, L.; GUANZHOU, Q. Comparison of three induced mutation methods for *Acidithiobacillus caldus* in processing sphalerite. **Minerals Engineering**, v. 20, n. 14, p. 1323-1326, 2007.

LIDDICOAT, J.; DREISINGER, D. Chloride leaching of chalcopyrite. **Hydrometallurgy**, v. 89, n. 3/4, p. 323-331, 2007.

LIU, X.; LIN, J.; ZHANG, Z.; BIAN, J.; ZHAO, Q.; LIU, Y.; YAN, W. Construction of conjugative gene transfer system between *E. coli* and moderately thermophilic, extremely acidophilic *Acidithiobacillus caldus* MTH-04. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 162-167, 2007.

LIZAMA, H. M.; SUZUKI, I. Bacterial leaching of a sulfide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: I. Shake flask studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, 110-116, 1988.

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, n. 2, p. 145-155, 2000.

MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Crescimento microbiano. In: _____. Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 6, p. 141-174.

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.

PENG, J. B.; YAN, W. M.; BAO, X. Z. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 10, p. 2892-2897, 1994.

PRONK, J. T.; JOHNSON, D. B. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. **Geomicrobiology Journal**, v. 10, n. 3/4, p. 153-171, 1992.

QIU, M.; XIONG, S.; ZHANG, W.; WANG, G. A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture. **Minerals Engineering**, v. 18, n. 9, p. 987-990, 2005.

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, n. 2, p. 267-275, 1981.

ROSSI, G. Fundamentals. In: _____. **Biohydrometallurgy**. New York: McGraw-Hill, 1990. Cap. 2, p. 15-179.

SALO-ZIEMAN, V. L. A.; SIVONEN, T.; PLUMB, J. J.; HADDAD, C. M.; LAUKKANEN, K.; KINNUNEN, P. H. M.; KAKSONEN, A. H.; FRANZMANN, P. D.; PUHAKKA, J. A. J. Characterization of a thermophilic sulfur oxidizing enrichment culture dominated by a *Sulfolobus* sp. obtained from an underground hot spring for use in extreme bioleaching conditions. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 12, p. 984-994, 2006.

SAMPSON, M. I.; PHILLIPS, C. V.; BLAKE II, R. C. Influence of the attachment of acidophilic bacteria during the oxidation of mineral sulfides. **Minerals Engineering**, v. 13, p. 373-389, 2000.

SAND, W.; GEHRKE, T.; JOZSA, P. G.; SCHIPPERS, A. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. **Hydrometallurgy**, v. 54, n. 2/3, p. 159-175, 2001.

SCHIPPERS, A.; SAND, W. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. **Applied Environment Microbiology**, v. 65, p. 319-521, 1999.

SILVERMAN, M. P.; LUNDGREN, D. G. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* 1: an improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields. **Journal of Bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 642-647, 1959.

SMITH, J. R.; LUTHY, G. R.; MIDDLETON, A. C. Microbial ferrous iron oxidation in acidic solution. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 60, n. 4, p. 518-530, 1988.

SOLCIA, R. de B. **Remoção de H₂S de ar por *Thiobacillus denitrificans* utilizando biofiltro percolador**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

STOTT, M.; WATLING, H.; FRANZMANN, P.; SUTTON, D. The role of iron hydroxyprecipitates in the passivation of chalcopyrite. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 10/11, p. 1117-1127, 2000.

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

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

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 ¹⁴CO₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. **Archiv fuer Mikrobiologie**, v. 88, n. 4, p. 285-298, 1973.

TUOVINEN, O. H.; PANDA, F. A.; TSUSHUJA, H. M. Nitrogen requirements of iron-oxidizing *Thiobacilli* for acidic ferric sulfate regeneration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 954-958, 1979.

VALE S. A.; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (Brasil). A. P. G. Christ; F. Alexandrino, L. M. M. Ottoboni, O. Garcia Junior. **Processo de modificação genética de bactérias acidófilas e construção de um vetor de transformação**. BRPI 1100418-5, 18 fev. 201, 21 maio 2013.

VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A. J. B. Eletrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1898-1901, 1987.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. p. 552.

VOGEL, A. I. Colorimetria e espectrofotometria. In: _____. **Análise inorgânica quantitativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. Cap. 18, p. 552-553.

WANG, S. Copper leaching from chalcopyrite concentrates. **Copper Leaching from Chalcopyrite Concentrates**, v. 57, n. 7, p. 48-51, 2005.

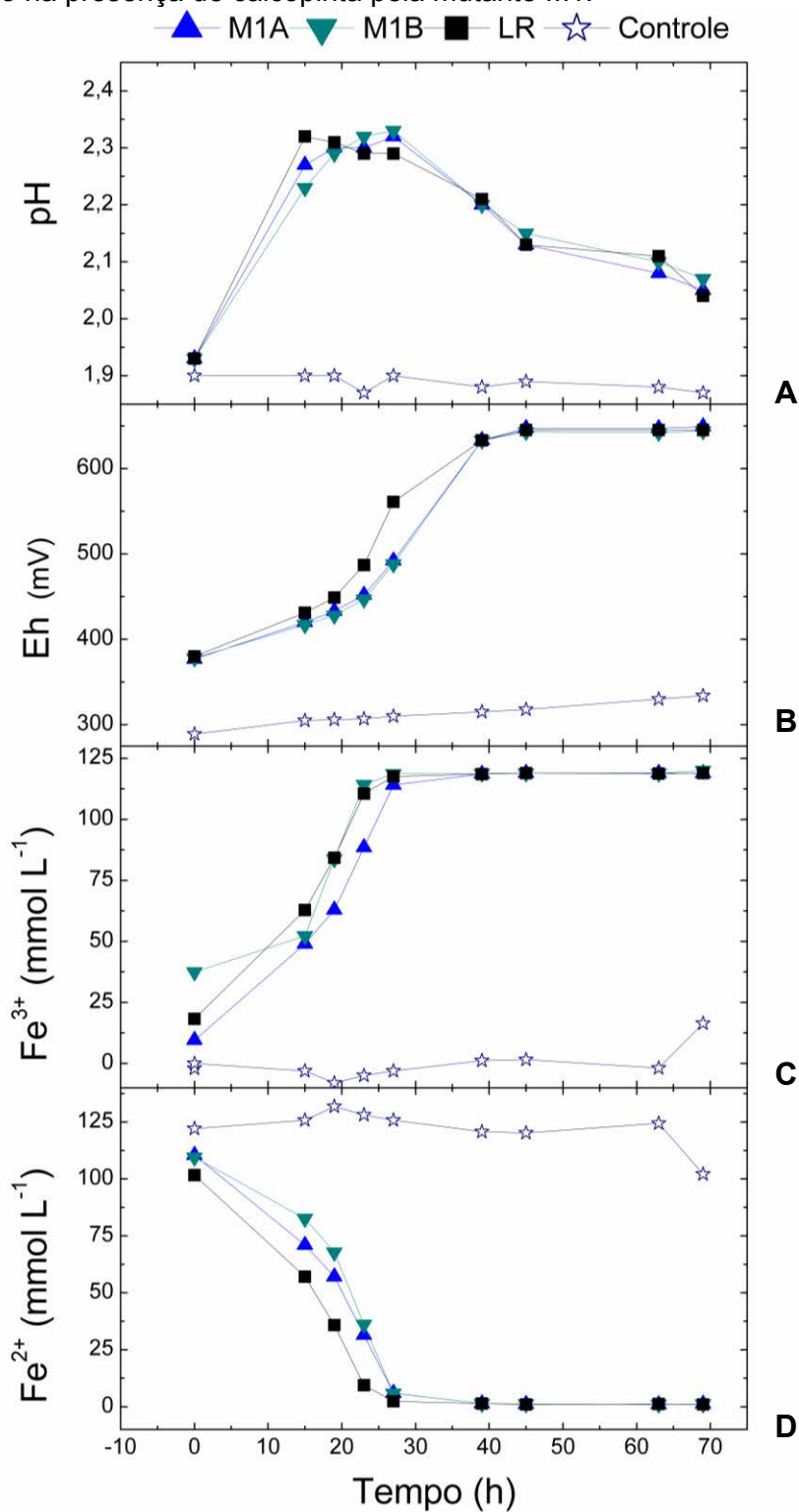
WATLING, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides: a review. **Hydrometallurgy**, v. 84, n. 1/2, p. 81-108, 2006.

WAKSMAN, S. A.; JOFFE, J. S. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillus Thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. **Journal of Bacteriology**, v. 7, p. 239-256, 1922.

XU, A.; XIA, J.; ZHANG, S.; YANG, Y.; NIE, Z.; QIU, G. Bioleaching of chalcopyrite by UV-induced mutagenized *Acidiphilium cryptum* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **Transactions of Nonferrous Metal Society of China**, v. 20, n. 2, p. 315-321, 2010.

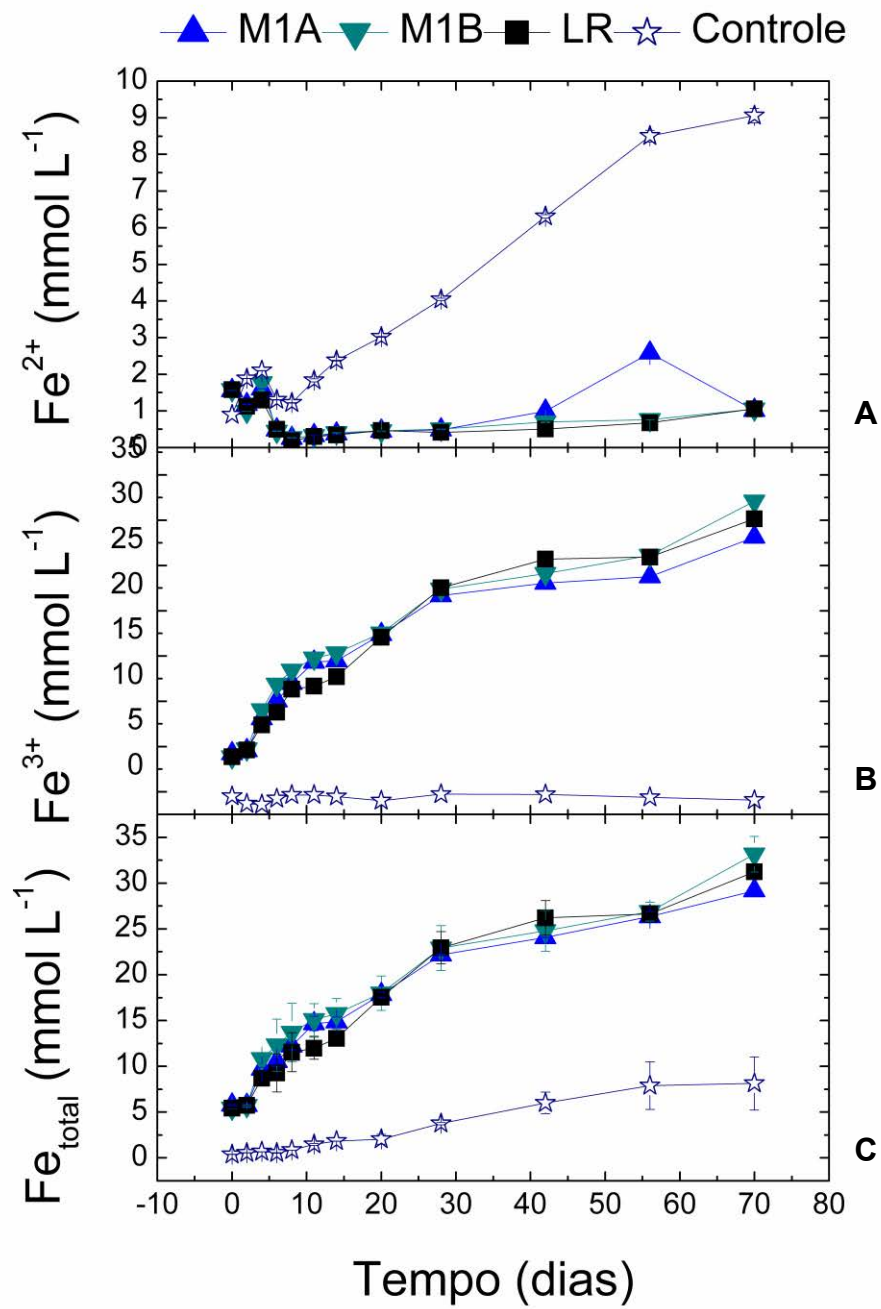
APENDICE A – Estudos relacionados a cinética do mutante M1.

Figura A1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M1.



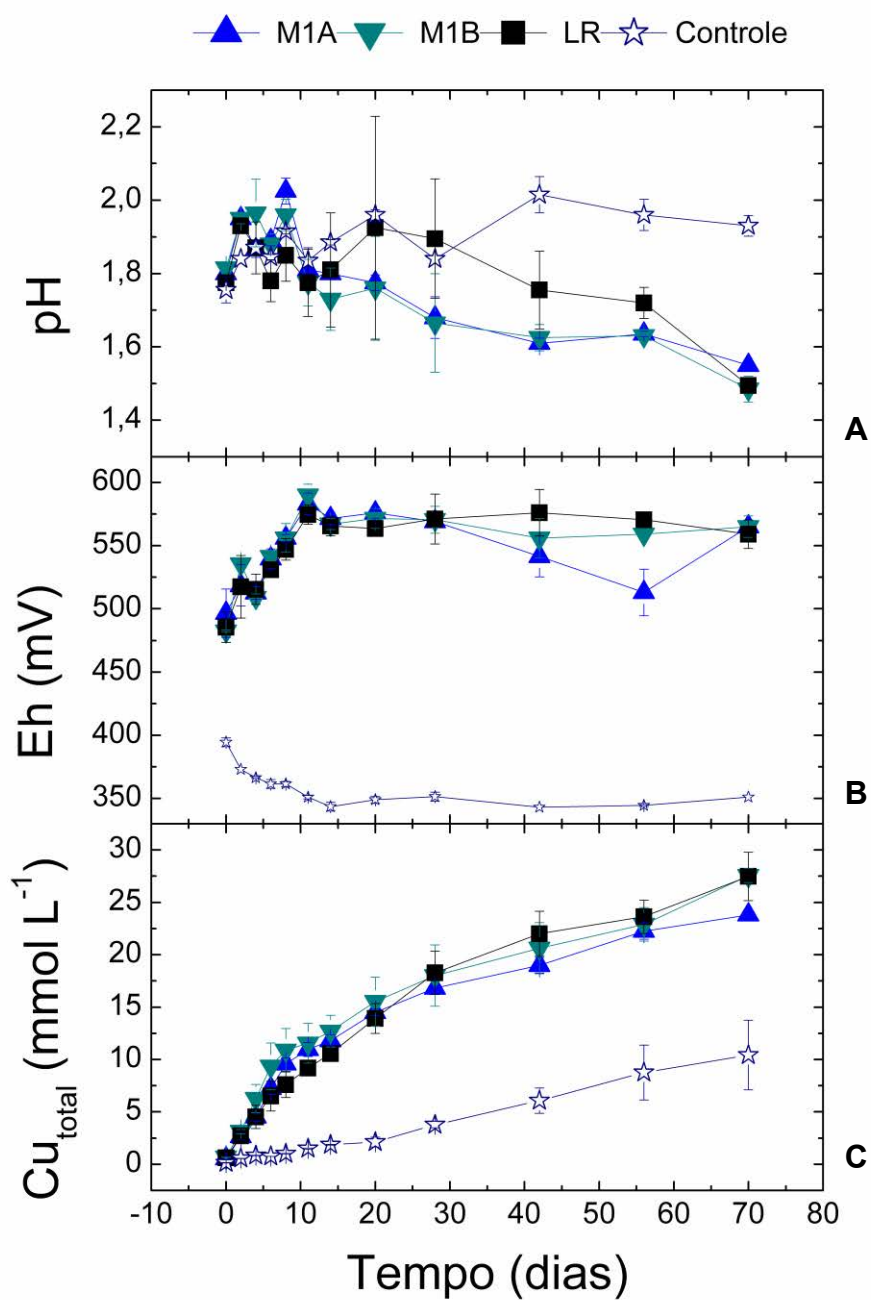
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura A2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M1.



Fonte: elaborado pelo autor.

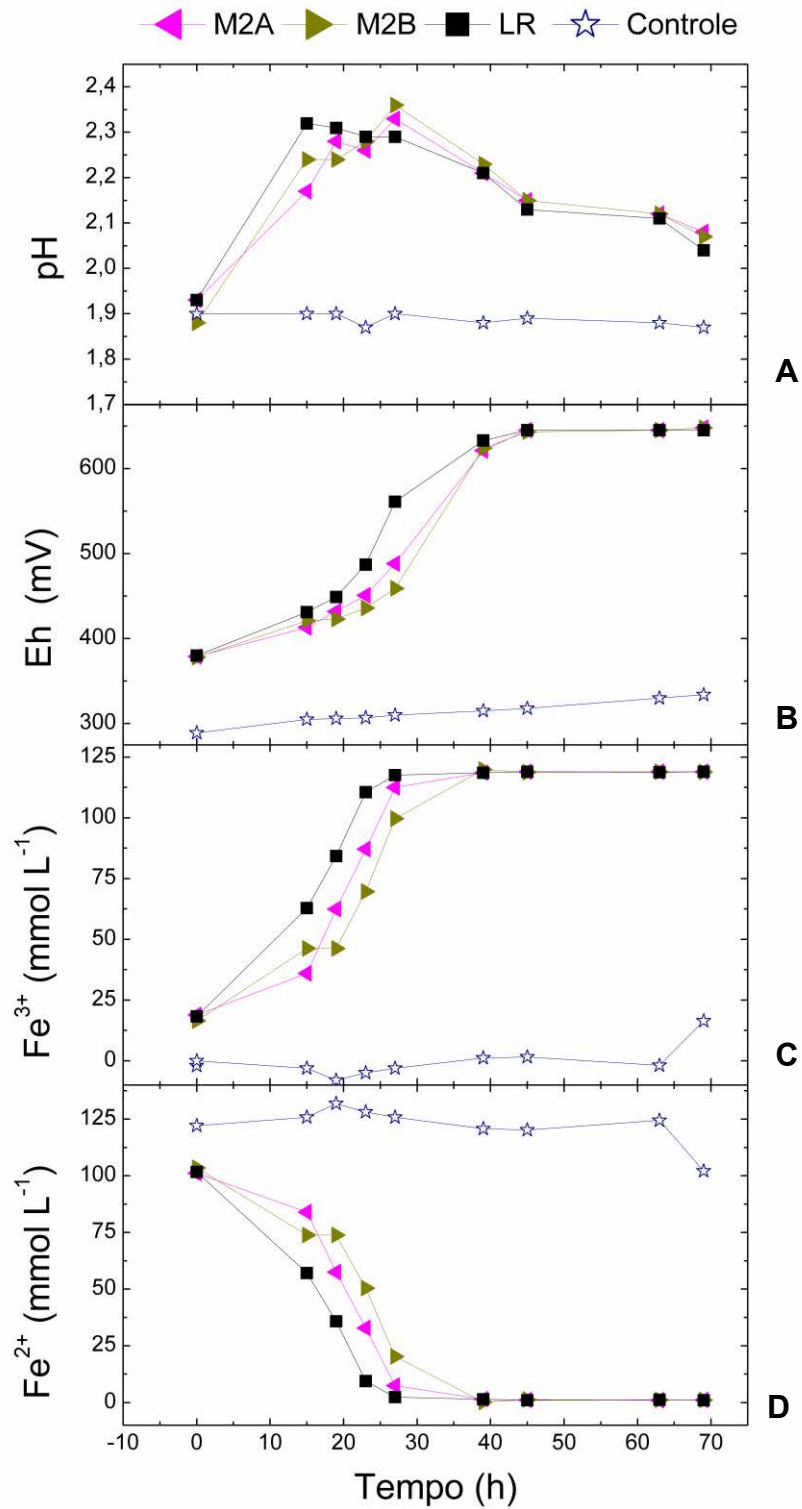
Figura A3 – Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M1.



Fonte: elaborado pelo autor.

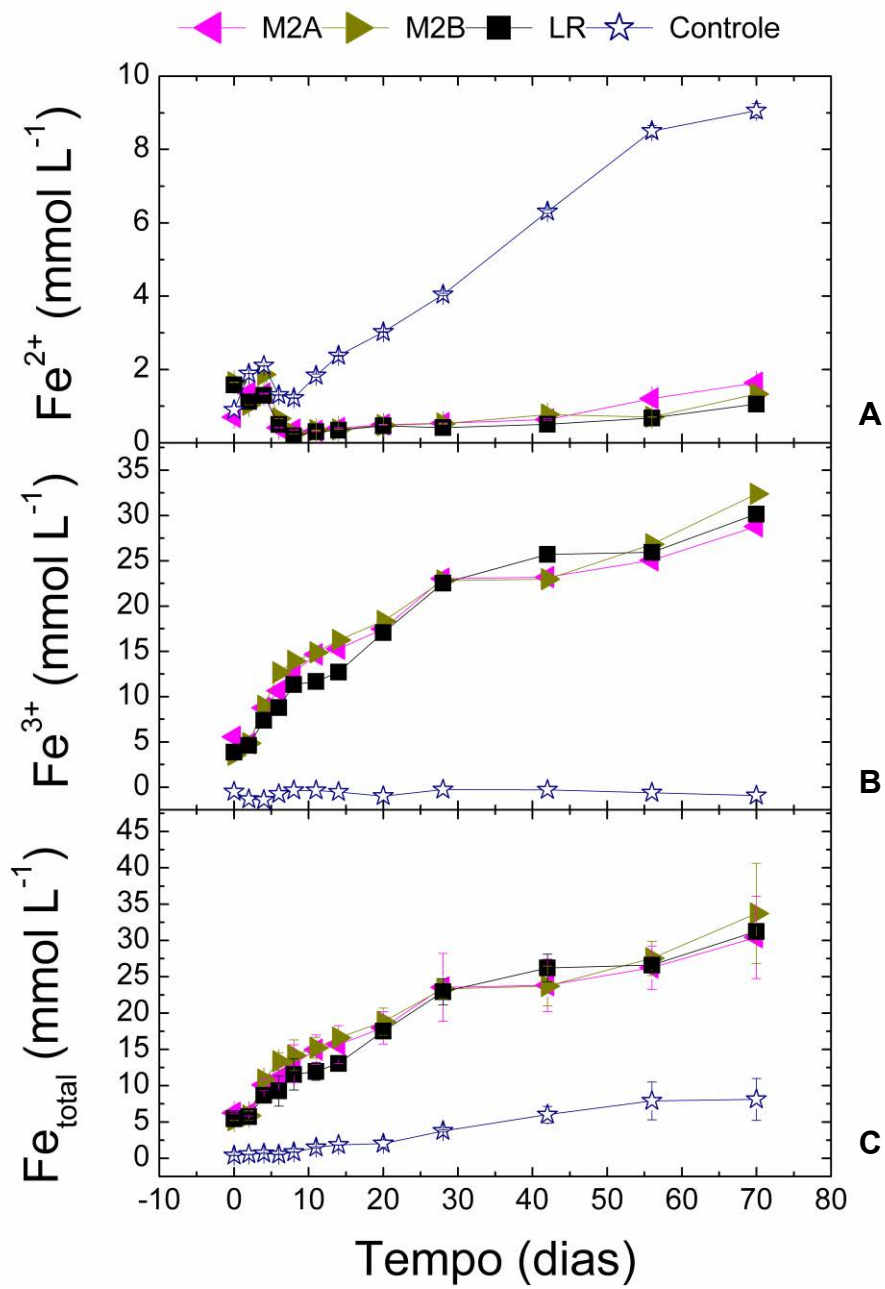
APENDICE B – Estudos relacionados a cinética do mutante M2.

Figura B1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M2.



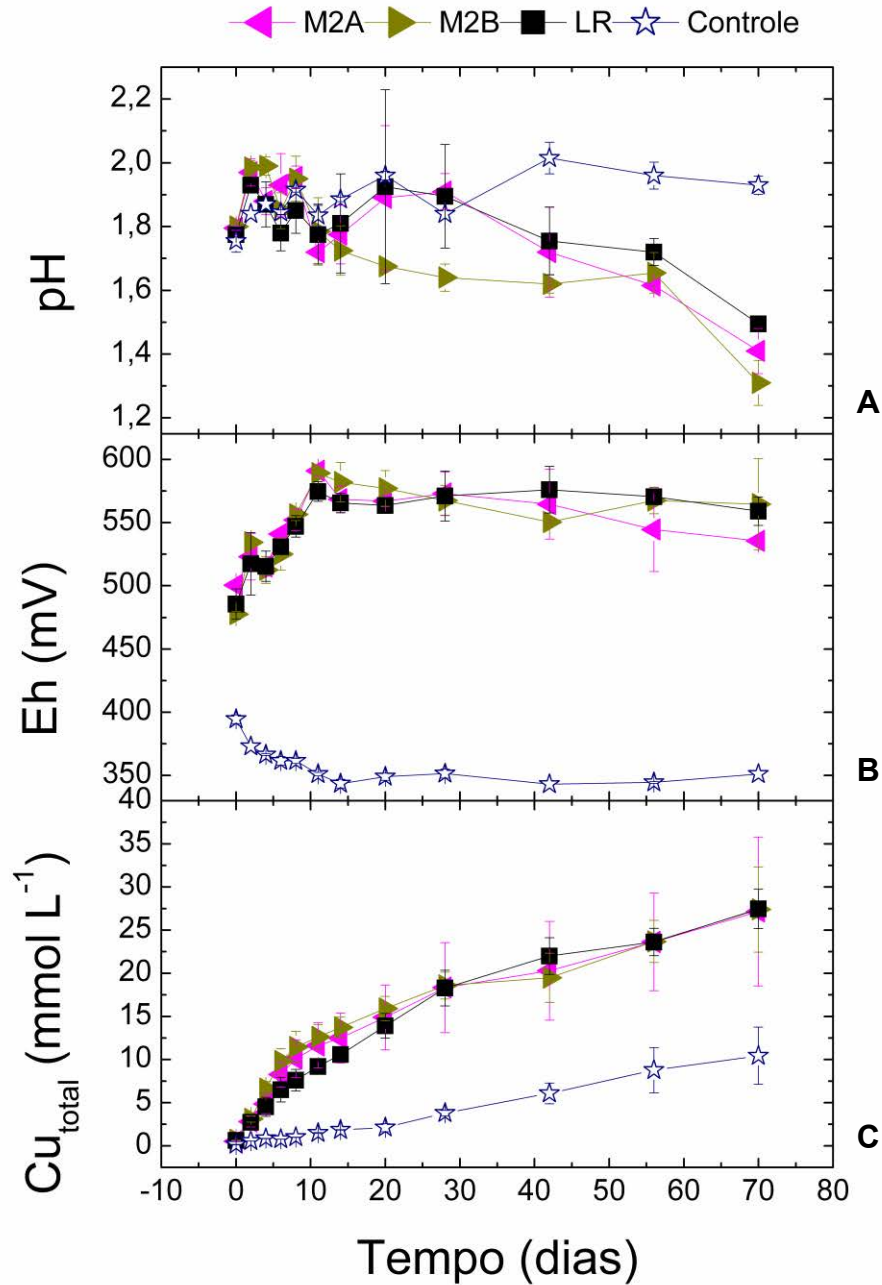
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura B2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M2.



Fonte: elaborado pelo autor.

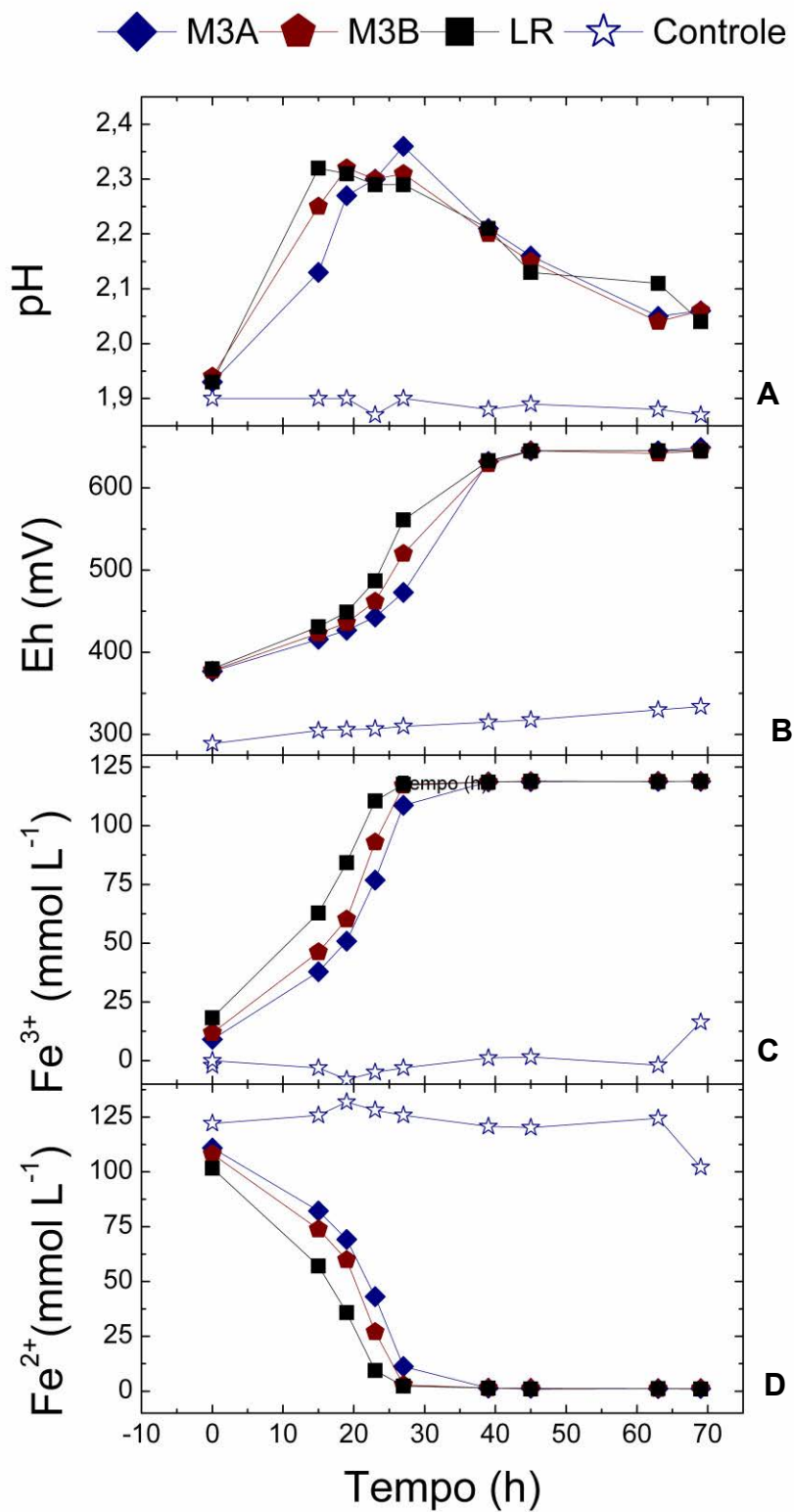
Figura B3 – Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M2.



Fonte: elaborado pelo autor.

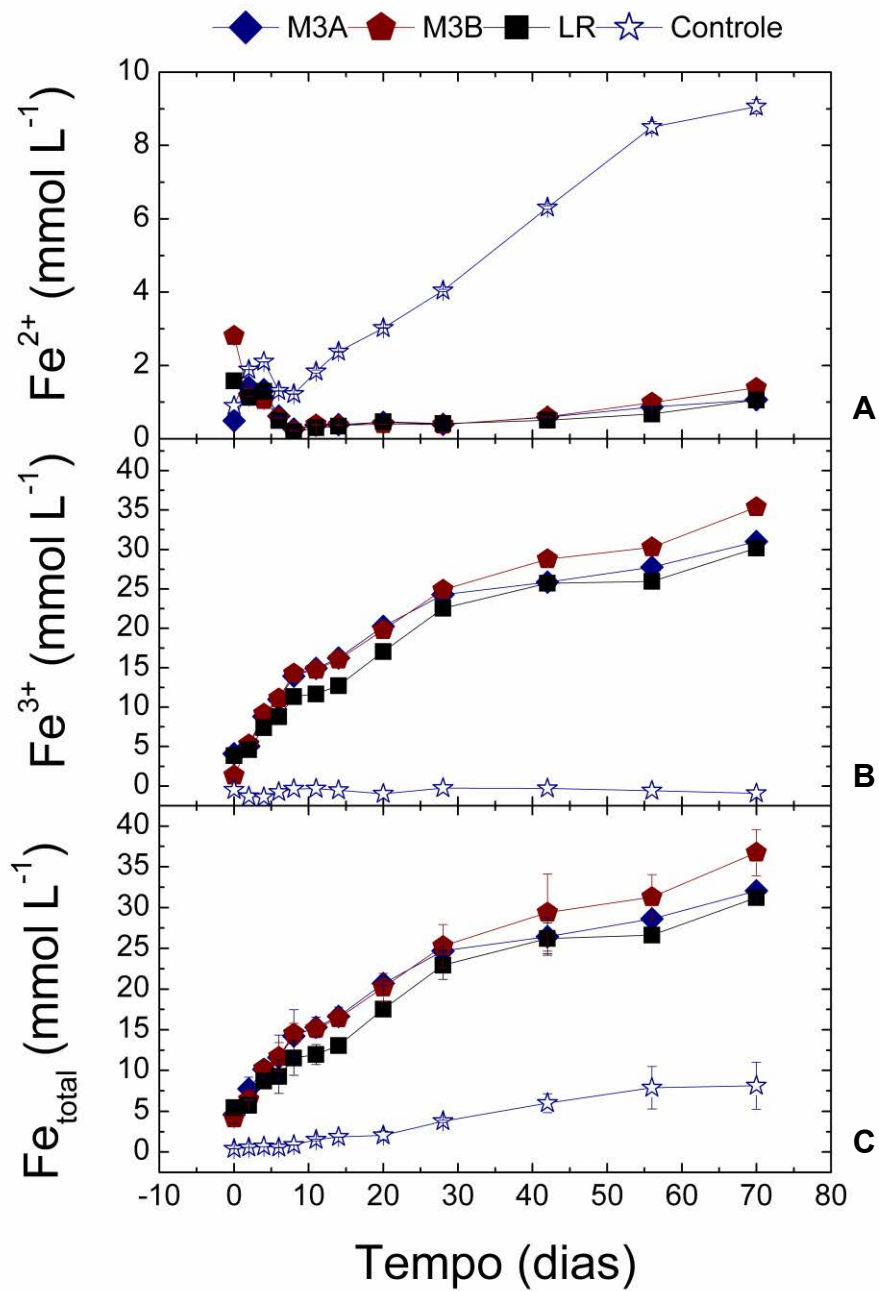
APENDICE C – Estudos relacionados a cinética do mutante M3.

Figura C1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M3.



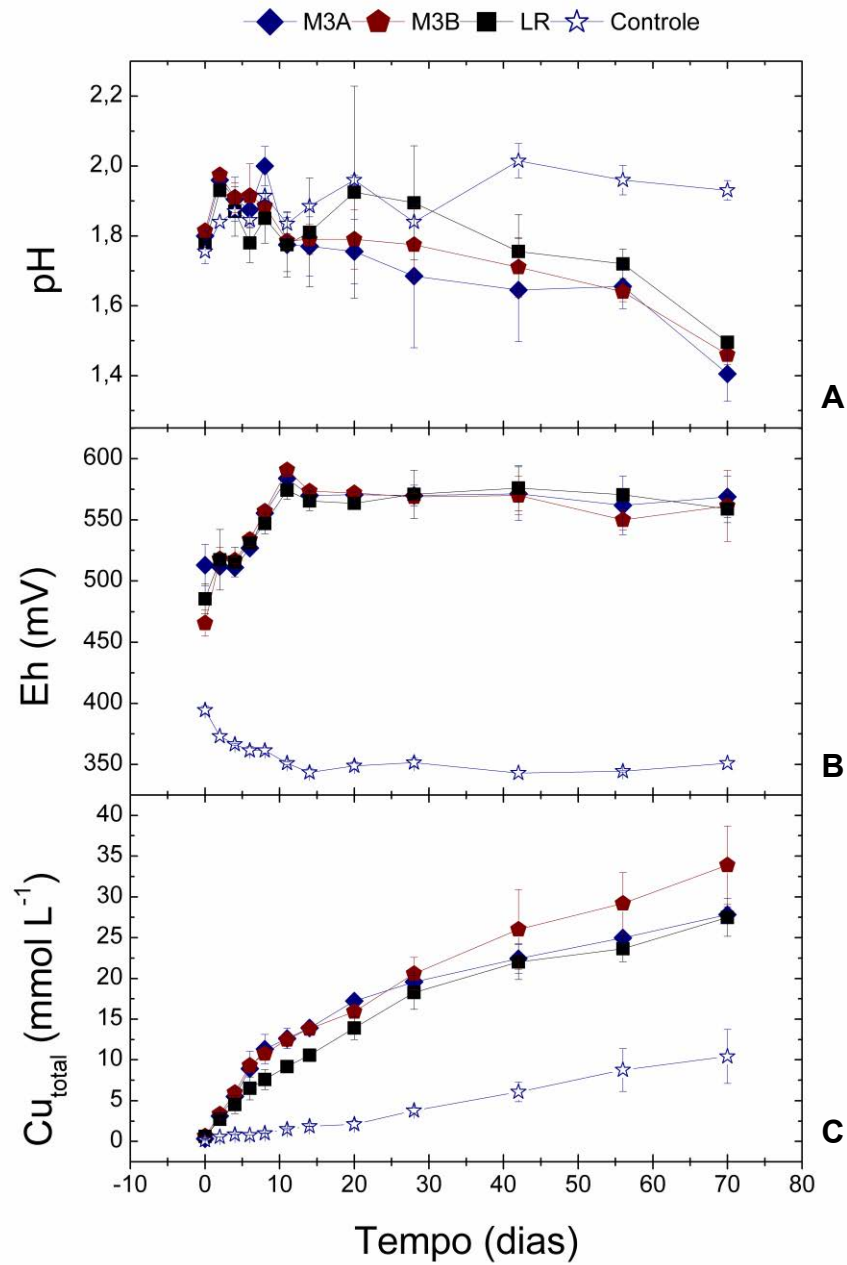
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura C2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M3.



Fonte: elaborado pelo autor.

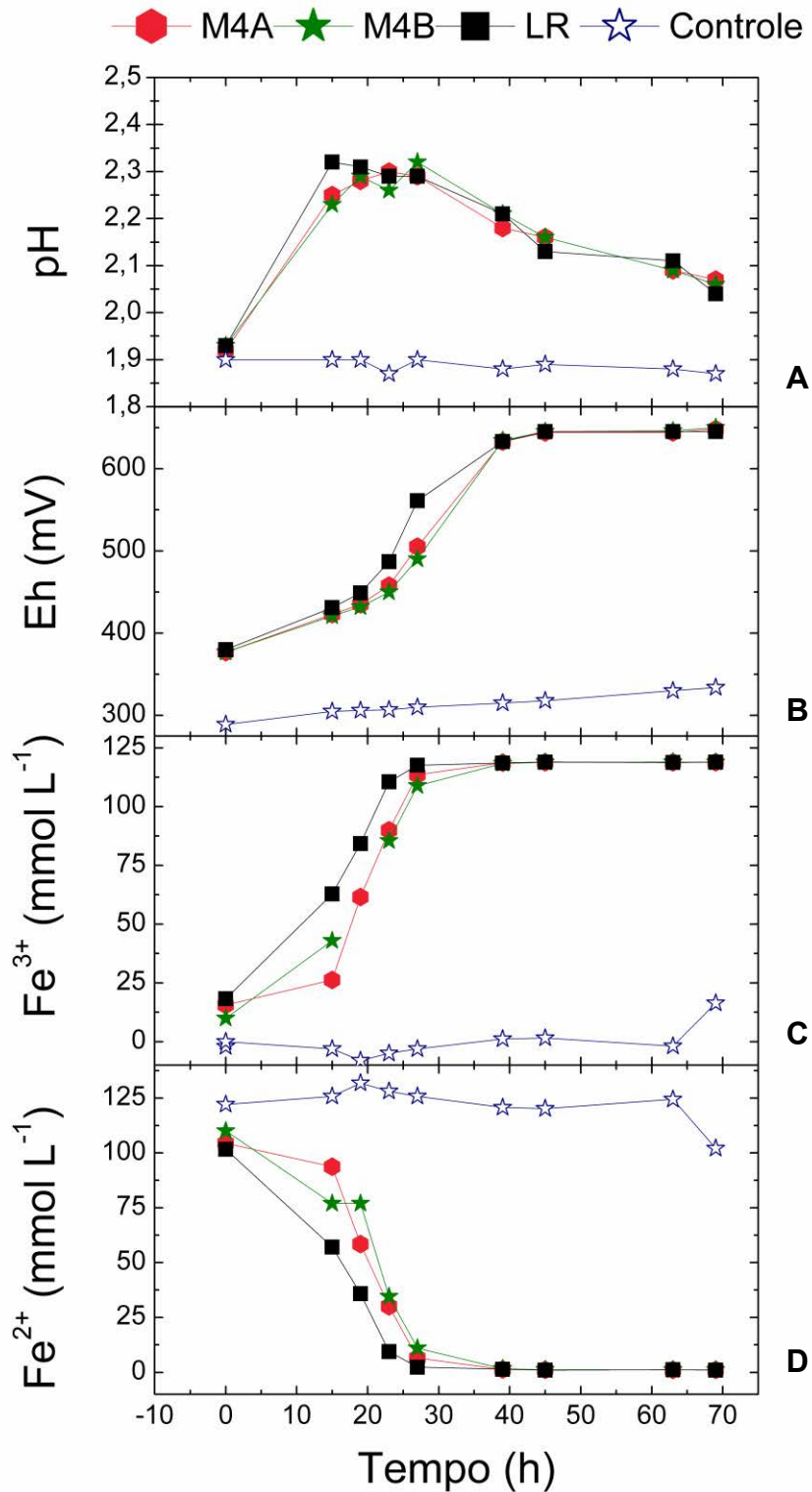
Figura C3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M3.



Fonte: elaborado pelo autor.

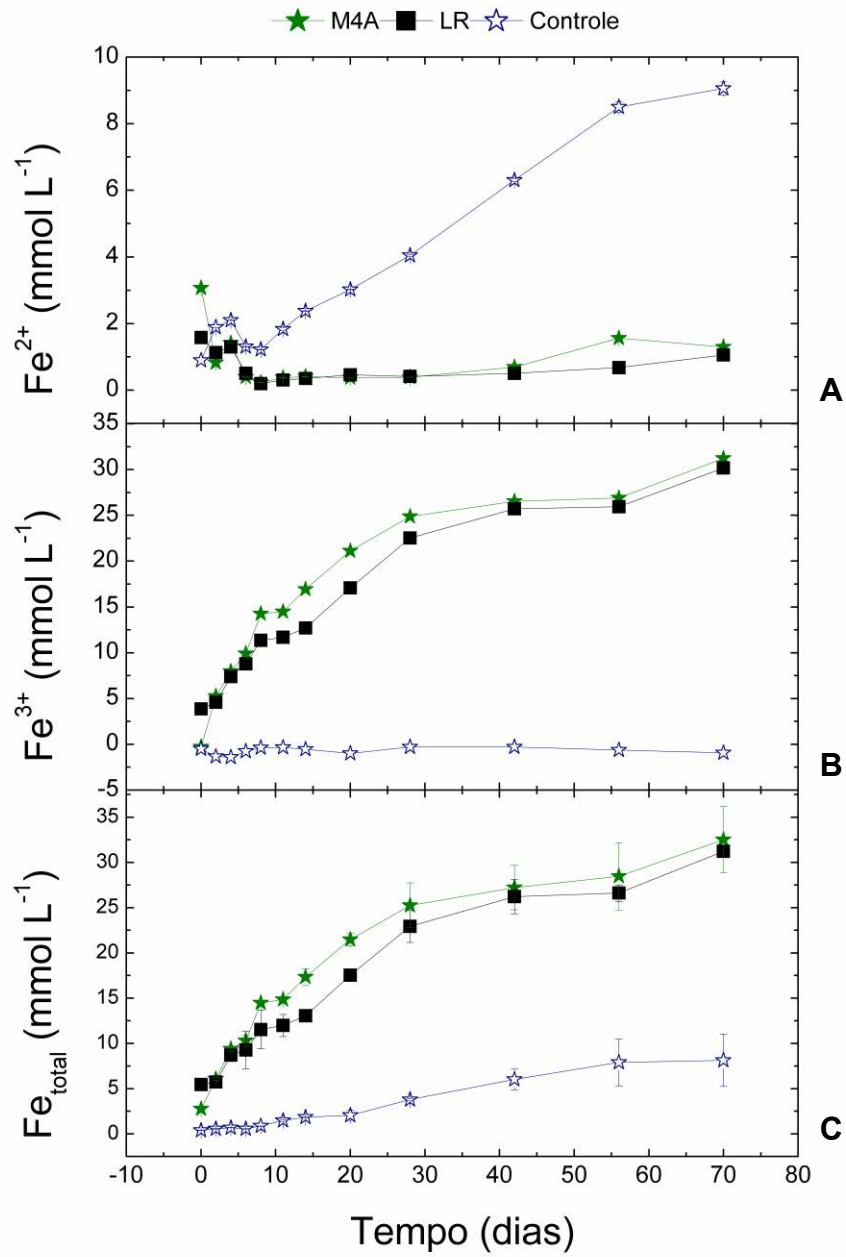
APENDICE D – Estudos relacionados a cinética do mutante M4.

Figura D1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M4.



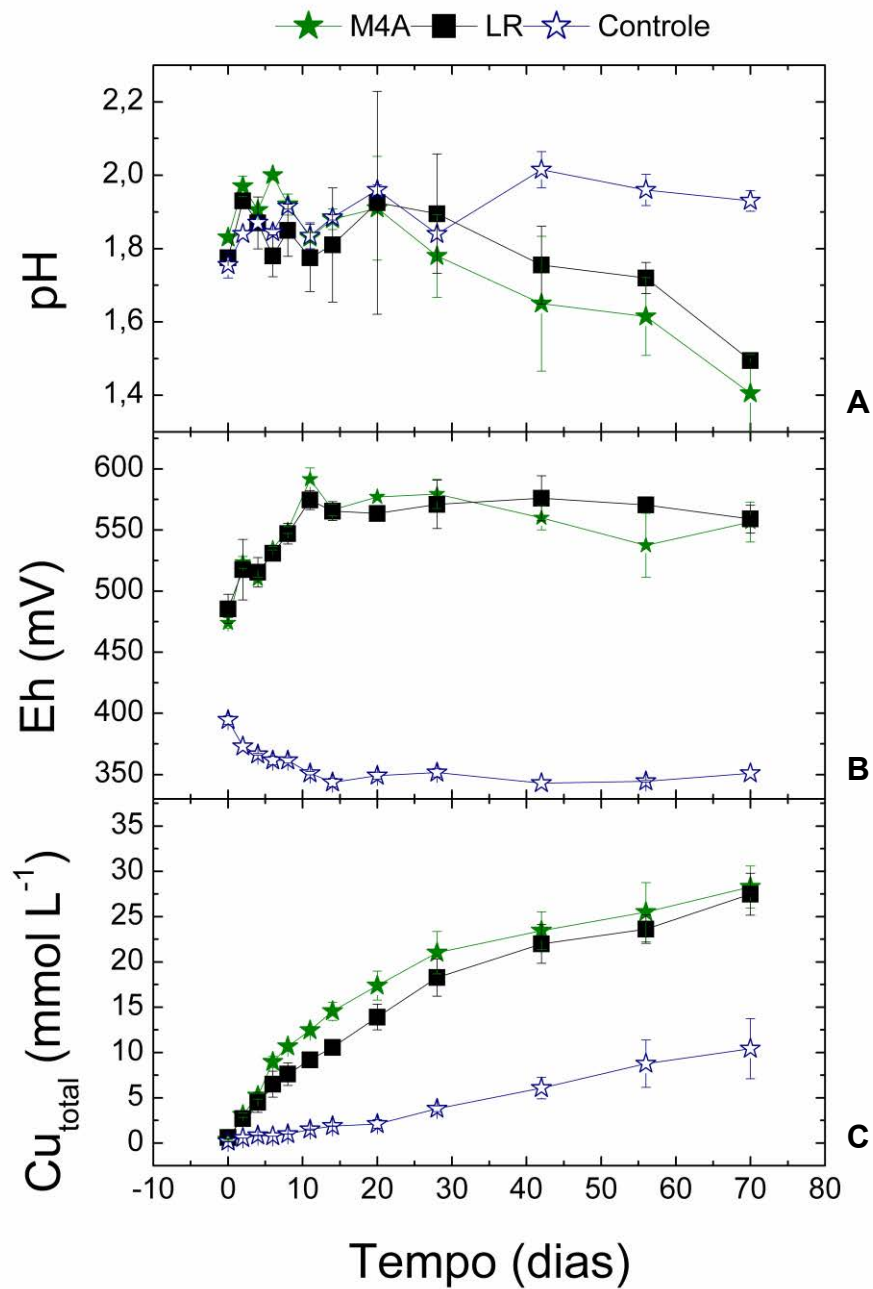
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura D2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M4.



Fonte: elaborado pelo autor.

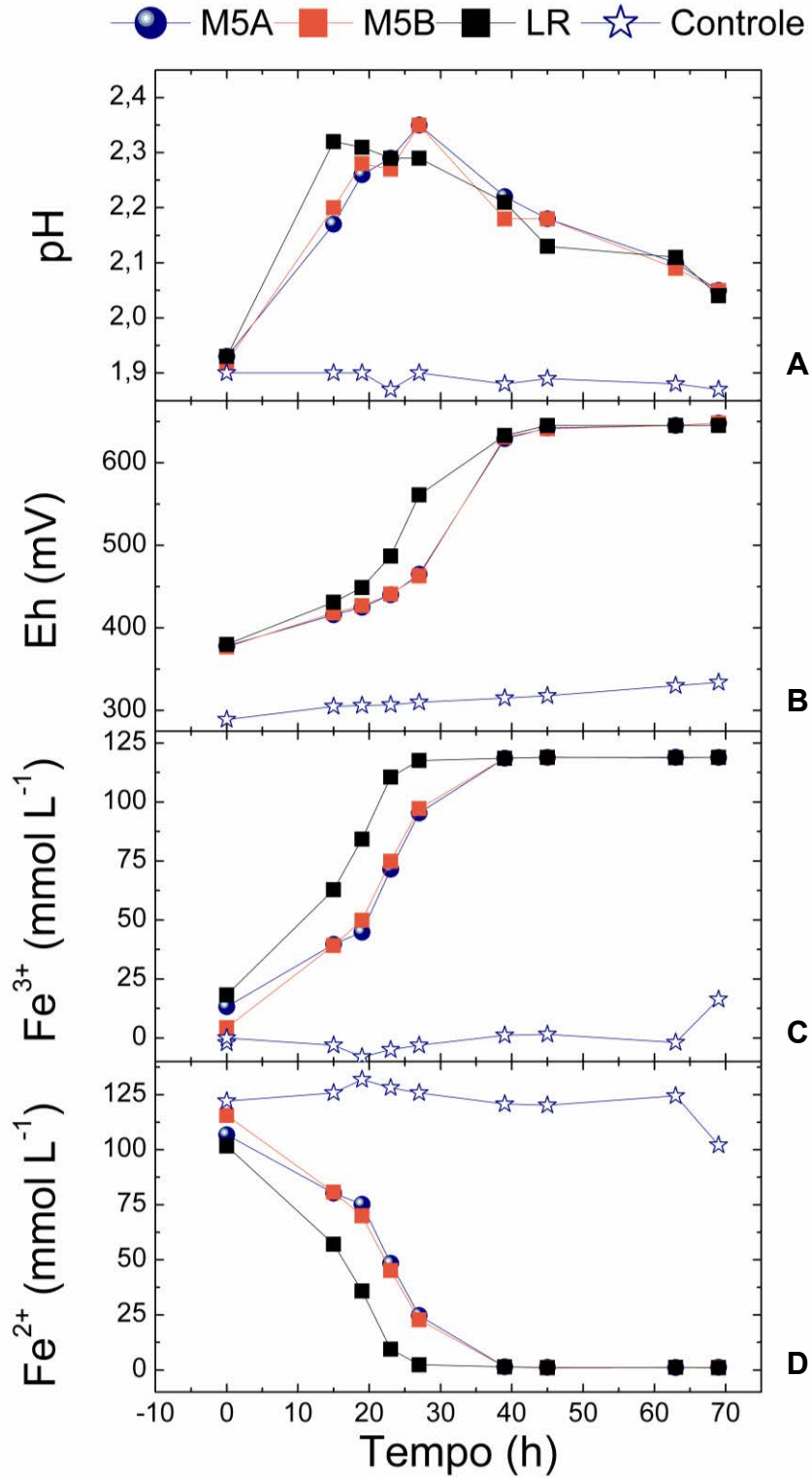
Figura D3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M4.



Fonte: elaborado pelo autor.

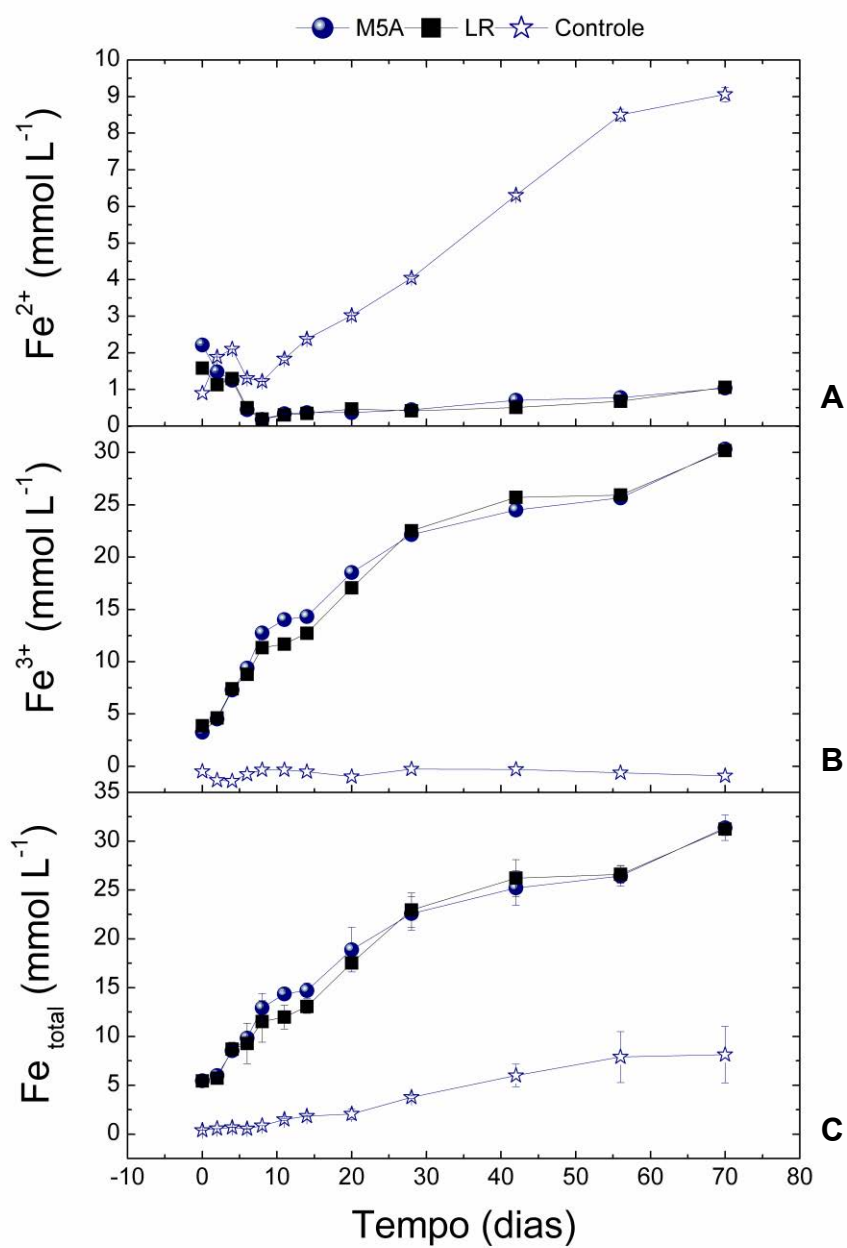
APENDICE E – Estudos relacionados a cinética do mutante M5.

Figura E1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M5.



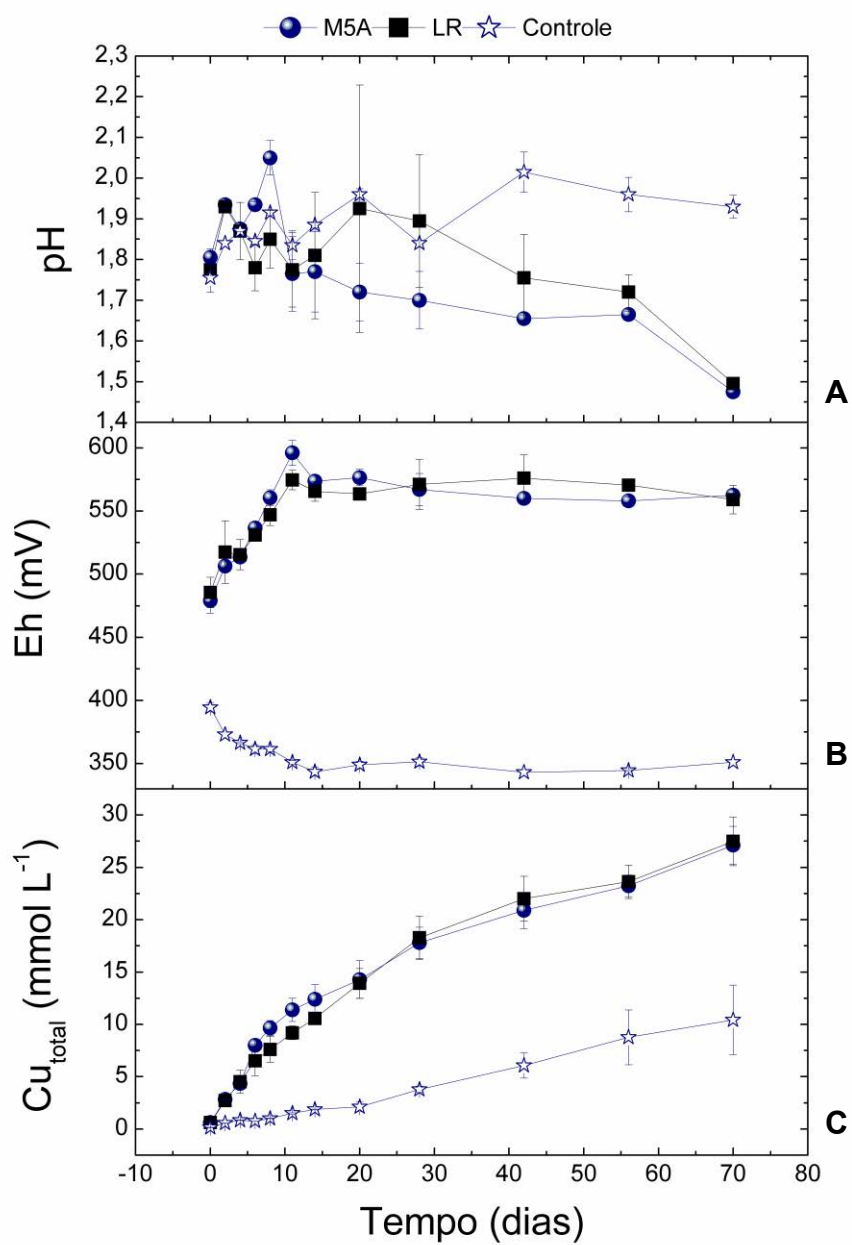
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura E2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M5.



Fonte: elaborado pelo autor.

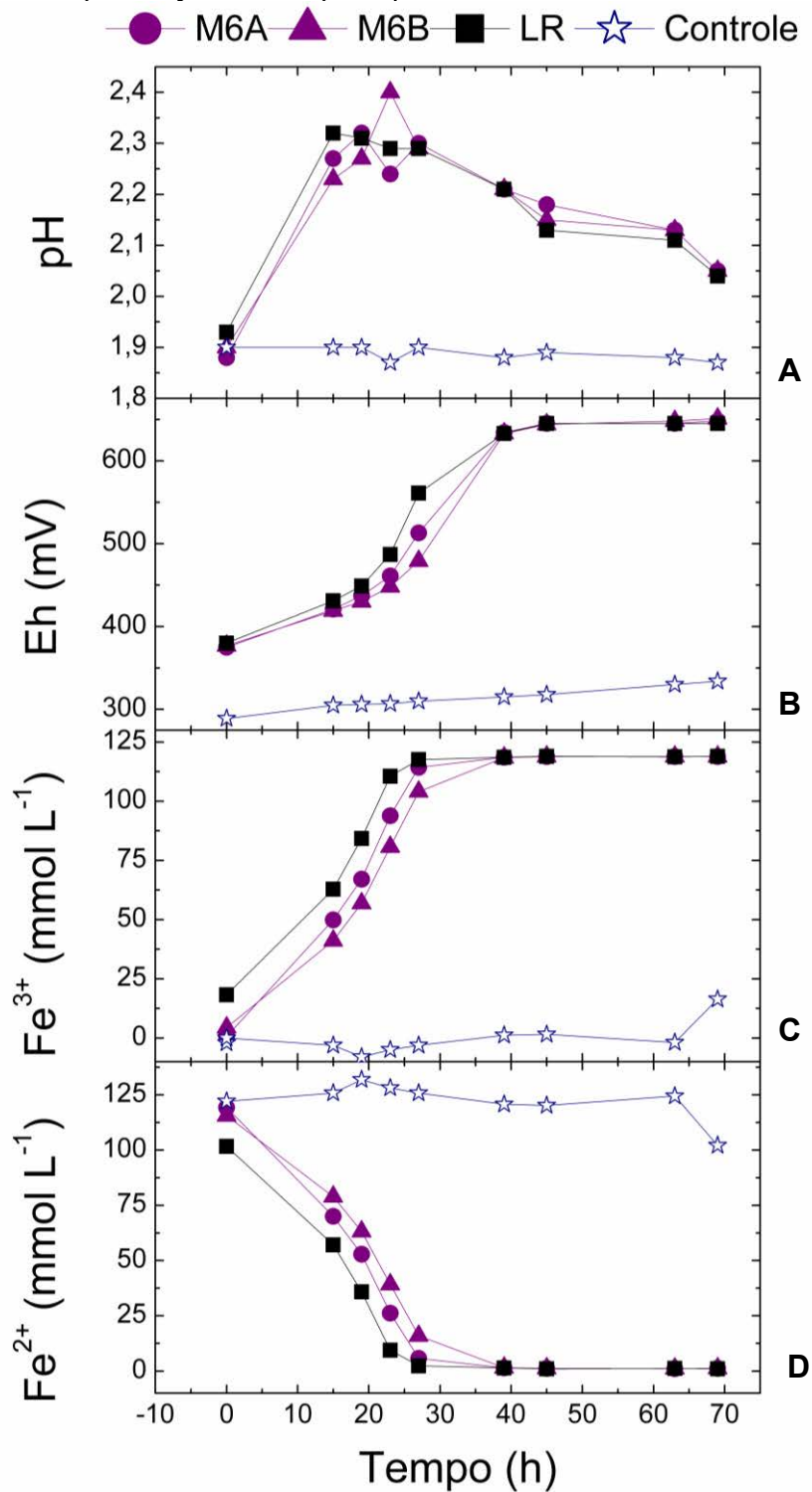
Figura E3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M5.



Fonte: elaborado pelo autor.

APENDICE F – Estudos relacionados a cinética do mutante M6.

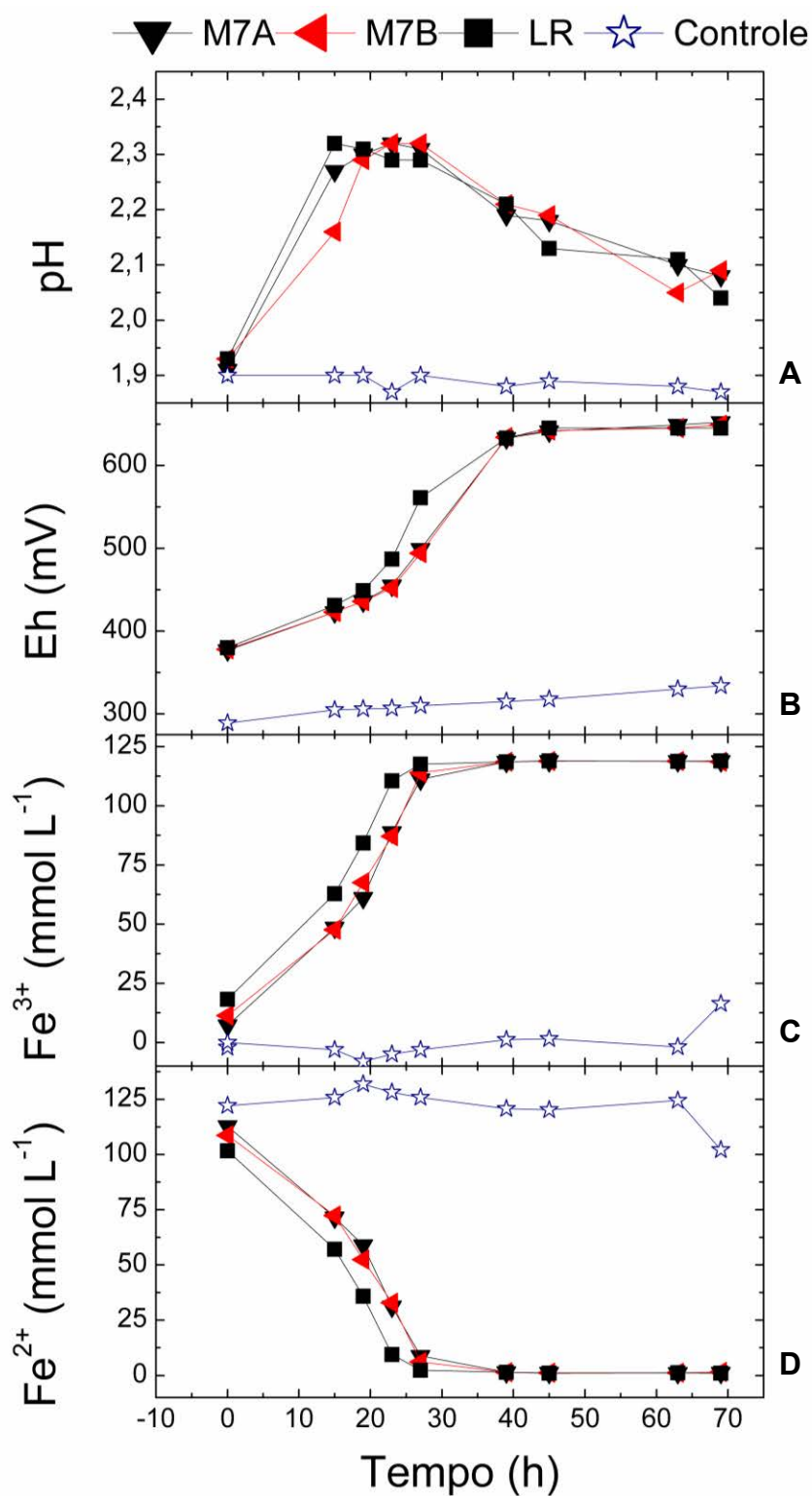
Figura F1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M6.



Fonte: elaborado pelo autor.

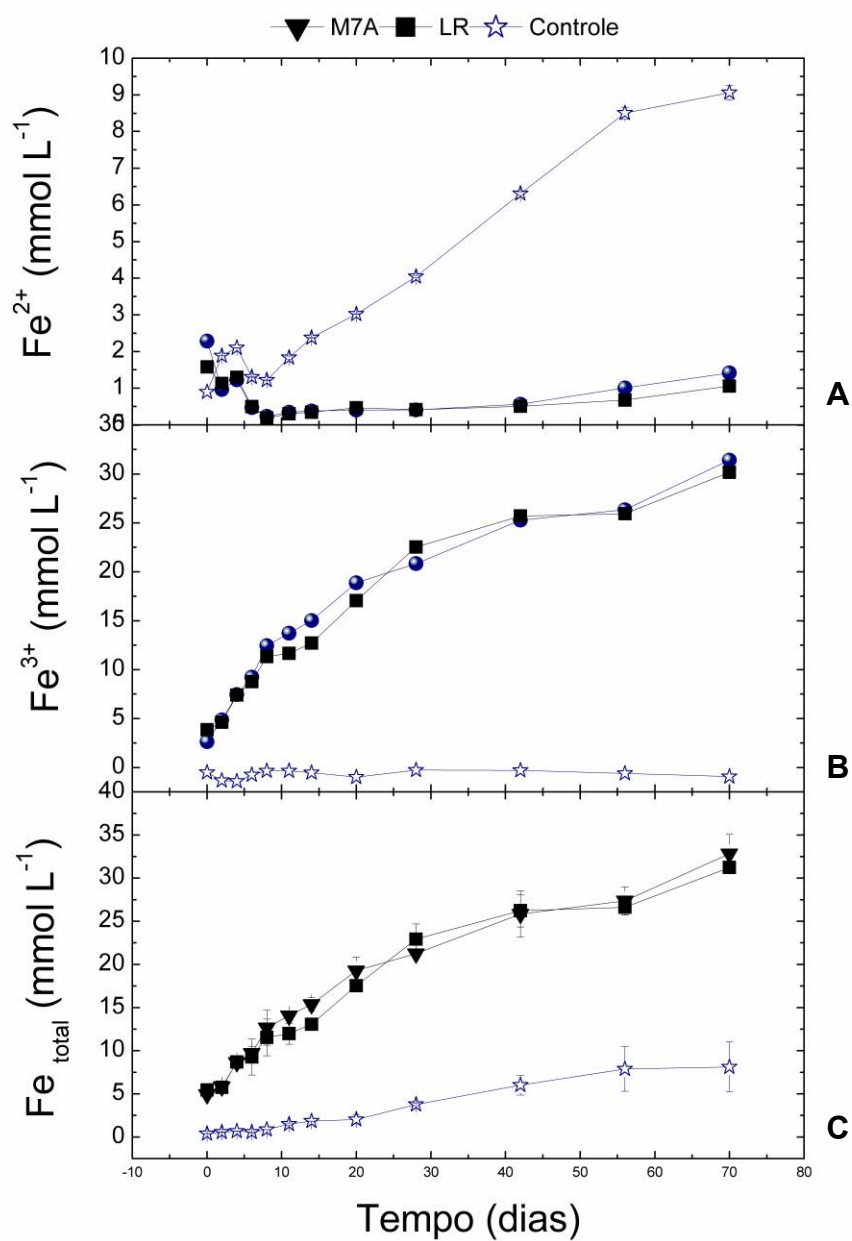
APENDICE G – Estudos relacionados a cinética do mutante M7.

Figura G1 – Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M7.



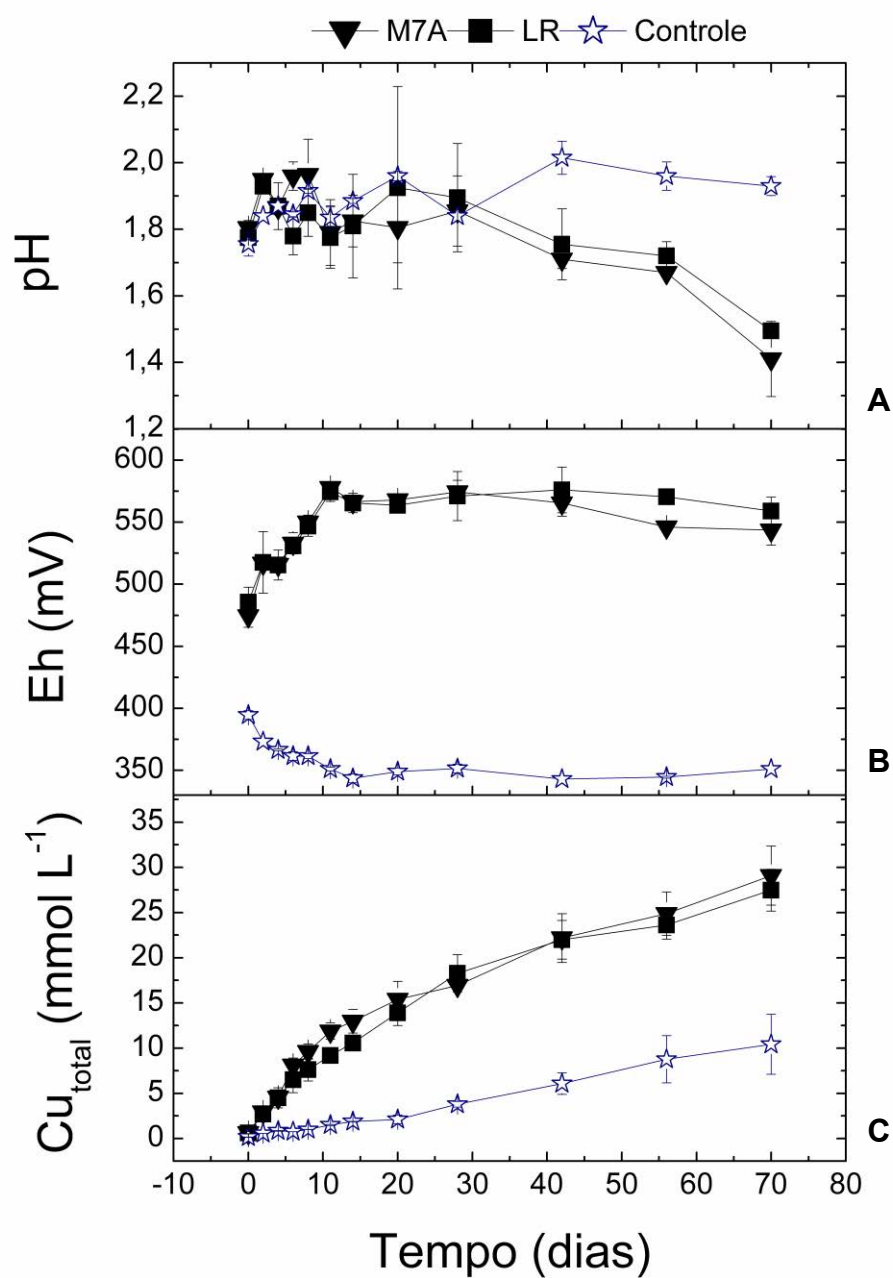
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura G2 – Variação da concentração de ferro II (A), ferro III (B) e ferro total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M7.



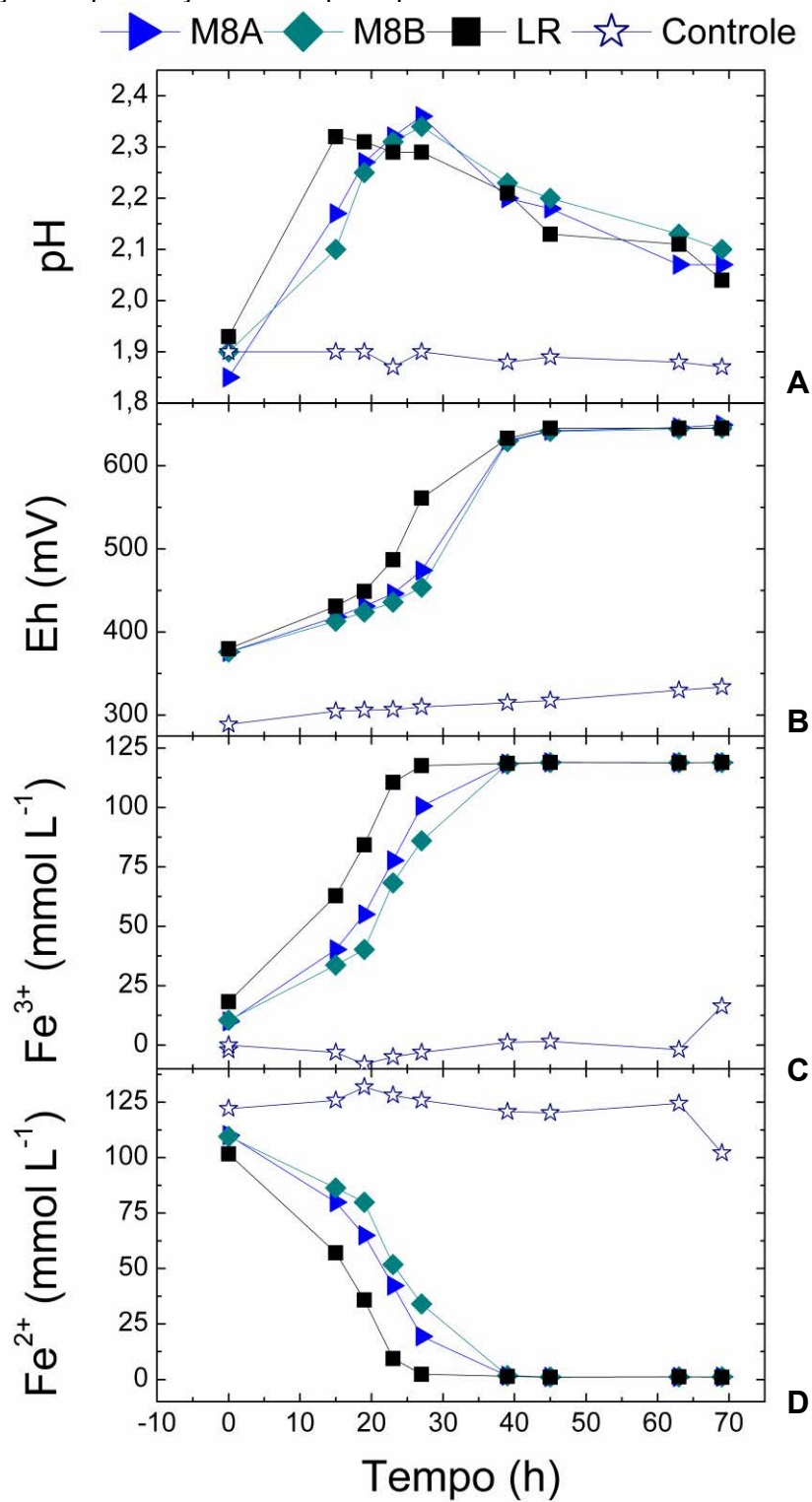
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura G3 - Variação do pH (A), Eh (B) e concentração de cobre total (C) em relação ao tempo no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita do mutante M7.



APENDICE H – Estudos relacionados a cinética do mutante M8.

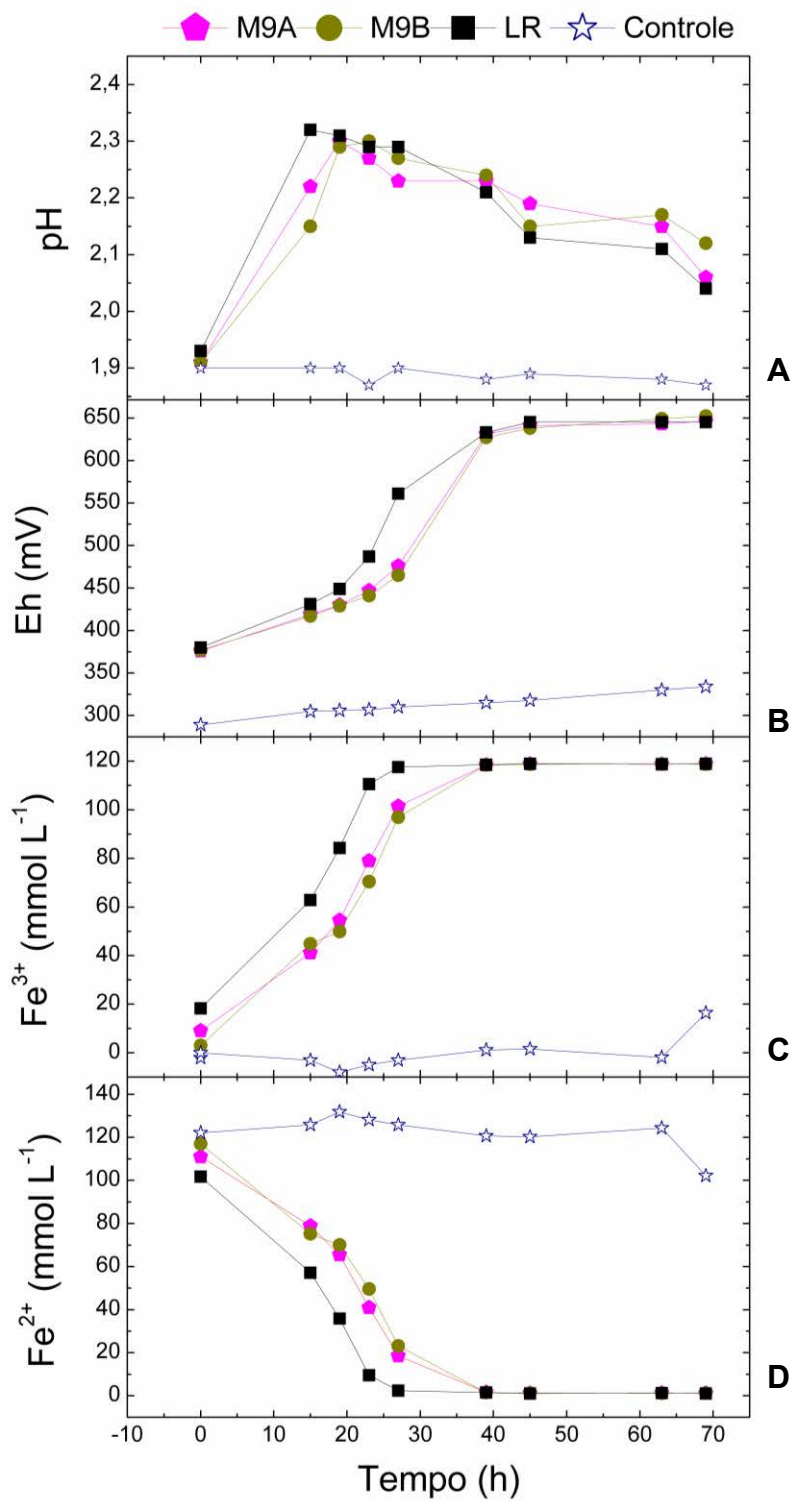
Figura H1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M8.



Fonte: elaborado pelo autor.

APENDICE I – Estudos relacionados a cinética do mutante M9.

Figura I1 - Variação do pH (A), Eh (B), íons férrico (C) e íons ferrosos (D) no ensaio de biolixiviação na presença de calcopirita pela mutante M9.



Fonte: elaborado pelo autor.