

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* RESISTENTES A ÍONS CLORETO

T. Rosa, B. R de Oliveira, D. Bevilaqua, A. P. F. Novello, O. Garcia Junior
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Rua: Prof. Francisco Degni, s/n, Quitandinha – Araraquara, SP, 14.800-900
e-mail: anafelic@iq.unesp.br

RESUMO

A utilização de micro-organismos na recuperação de metais de minérios de baixos teores e sulfetos minerais secundários tem sido uma boa alternativa, no que diz respeito ao impacto ambiental e também aos custos gerados. A bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, uma das mais importantes espécies envolvidas no processo de biolixiviação, utiliza íons ferrosos (Fe^{2+}) ou sulfetos minerais como fonte de energia. A calcopirita é o sulfeto mineral de cobre mais abundante na natureza e refratário ao ataque químico e bacteriano. Dessa maneira, estudos sobre a otimização da dissolução desse sulfeto estão sendo realizados. O efeito acelerador da oxidação da camada passivadora da calcopirita causado pelos íons cloreto (Cl^-), bem como a formação de complexos solúveis de Cl^- e Cu , tem se mostrado interessante no processo de lixiviação. Porém, tais íons podem inibir o crescimento e a atividade de *A. ferrooxidans*. O objetivo desse trabalho foi verificar a resistência de linhagens de *A. ferrooxidans* a íons Cl^- , que futuramente possam ser utilizadas para otimizar o processo de biolixiviação da calcopirita. Os resultados obtidos mostraram diferenças no crescimento de duas linhagens de *A. ferrooxidans*, sendo que a linhagem LR oxidou íons Fe^{2+} na presença de até 100 mmol.L^{-1} de íons Cl^- , enquanto que a linhagem S oxidou essa fonte energética na presença de 100 e 200 mmol.L^{-1} de íons Cl^- . Futuramente, linhagens de *A. ferrooxidans* que sejam mais tolerantes a íons Cl^- poderão ser utilizadas para otimizar processos biohidrometalúrgicos, principalmente no que diz respeito a oxidação da calcopirita.

PALAVRAS-CHAVE: *Acidithiobacillus ferrooxidans*; biolixiviação; íons cloreto, calcopirita.

1. INTRODUÇÃO

Um interesse crescente em pesquisas acerca da exploração e tratamento de minerais constitui uma das bases do progresso industrial e econômico. Sendo assim, novas e melhores alternativas surgem, proporcionando redução de custos e de impactos ambientais.

As principais fontes de metais ocorrem na natureza na forma de sulfetos, sendo que o processo mais utilizado na extração de metais a partir de sulfetos minerais é o pirometalúrgico. Tal processo está embasado na utilização de altas temperaturas, com alto gasto energético e, portanto, elevado custo, o que o torna viável apenas para minérios de alto teor ou concentrados de flotação. Além disso, com a ustulação de sulfetos minerais, ocorre emissão de dióxido de enxofre (SO₂), um dos responsáveis pelas chuvas ácidas, causando poluição atmosférica.

O processo hidrometalúrgico, que é empregado na extração de metais a partir de minérios de baixos teores, tornou-se uma alternativa adequada em relação aos fatores negativos causados pela mineração, como poluição atmosférica, esgotamento de reservas minerais de alto teor e alto custo. Esse processo consiste basicamente na oxidação de sulfetos minerais para a liberação de metais de interesse com a utilização de soluções ácidas ou básicas, em condições apropriadas de pressão e temperatura.

Dentro do ramo da hidrometalurgia, a biolixiviação, ou lixiviação bacteriana, é uma alternativa adequada e promissora para a recuperação de metais de interesse econômico, principalmente o cobre, urânio e níquel e mais recentemente o ouro. Trata-se de um processo que utiliza micro-organismos que possuem a capacidade de oxidar íons ferrosos (Fe²⁺) e sulfetos minerais, solubilizando-se, assim, os metais, proporcionando baixo impacto ambiental e baixo consumo energético (Jensen; Webb, 1995).

A. ferrooxidans é uma das principais espécies bacterianas envolvidas no processo de biolixiviação, podendo ser encontrada, naturalmente, em drenagem ácida de minas de ferro e de minas de carvão betuminoso (Jensen; Webb, 1995). Além disso, é um micro-organismo de natureza quimiolitotrófica, ou seja, obtém sua energia pela oxidação de substratos inorgânicos, basicamente íons Fe²⁺ e compostos reduzidos de enxofre, incluindo os sulfetos minerais (Francisco Júnior *et al.*, 2007.). Essa espécie é um micro-organismo acidófilo estrito, com pH ótimo de crescimento em torno de 2,0, ocorrendo o seu crescimento numa faixa de 1,5 a 4,5 e sobrevivência inibida em valores de pH menores que 1,0 (Smith *et al.*, 1988).

O uso de íons cloreto (Cl⁻) na dissolução da calcopirita, um sulfeto mineral, tem sido uma alternativa importante e que merece destaque. Alguns autores defendem a formação de complexos entre o Cl e Cu (Winand, 1991; Carneiro; Leão, 2007), enquanto outros defendem que a formação de uma camada de enxofre porosa que favorece a difusão dos reagentes através do filme de enxofre (produto da reação) e a continuação da reação na superfície do mineral (Lu *et al.*, 2000). Os íons Cl⁻ favorecem a cinética de lixiviação da calcopirita, melhorando o processo. Porém, esses íons podem causar um efeito inibitório no crescimento e atividade de *A. ferrooxidans*. Dessa maneira, a seleção e obtenção de linhagens de *A. ferrooxidans* mais resistentes a íons Cl⁻ pode ser uma boa alternativa na otimização da biolixiviação da calcopirita.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo selecionar linhagens de *A. ferrooxidans*, que sejam resistentes a íons Cl^- . Sendo assim, a influência desses íons foi analisada no crescimento de *A. ferrooxidans* linhagens LR e S.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho foram *A. ferrooxidans* LR, isolada do efluente de lixiviação de minério de urânio de Lagoa Real-BA e *A. ferrooxidans* S, isolada da mina de cobre de Surubim, Caraíba-BA (Garcia Junior, 1991). Essas linhagens foram selecionadas para este estudo, pois mostraram, previamente, uma melhor capacidade de oxidar a calcopirita em comparação com outras linhagens testadas (Novello, 2008).

3.2. Meio de cultivo e crescimento bacteriano

Para o crescimento bacteriano, foi utilizado o meio de cultivo T&K modificado (Tuovinen; Kelly, 1973) composto por sais inorgânicos ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com pH corrigido para 1,8). O crescimento (30°C , 150 rpm em mesa agitadora) foi monitorado através da dosagem da fonte energética (Fe^{2+}) até sua completa oxidação. Tal determinação foi realizada titulando-se alíquotas da cultura com dicromato de potássio em meio ácido.

3.3. Crescimento bacteriano na presença de íons Cl^-

O efeito de íons Cl^- no crescimento de *A. ferrooxidans* LR e S foi analisado pela oxidação de íons Fe^{2+} . Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, com inóculo (5%, v/v) da linhagem de *A. ferrooxidans* e meio T&K completo. Utilizando-se uma solução estoque de NaCl 1 mol.L^{-1} , quantidades crescentes desse íon foram adicionadas ao meio T&K completo, sendo as concentrações utilizadas de 0, 100, 200, 400 e 500 mmol.L^{-1} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os íons Cl^- têm se mostrado um poderoso acelerador da oxidação da calcopirita. Com o objetivo de otimizar o processo de biolixiviação desse sulfeto mineral, o efeito desses íons foi, primeiramente, analisado durante a oxidação de uma fonte energética solúvel e mais disponível, os íons Fe^{2+} . O efeito dos íons Cl^- foi verificado no crescimento de *A. ferrooxidans* LR e S, durante a oxidação de íons Fe^{2+} , bem como a tolerância da bactéria a diferentes concentrações desses íons.

A curva de crescimento de *A. ferrooxidans* LR mostra que o tempo de oxidação total dos íons Fe^{2+} foi de, aproximadamente, 50 e 170 horas na presença de 0 e 100 mmol.L^{-1} de íons Cl^- , respectivamente (Figura 1). Comparando-se essas duas condições (0 e 100 mmol.L^{-1} de íons Cl^-), observa-se um aumento da fase lag, indicando uma inibição do crescimento celular na presença

de 100 mmol.L⁻¹ de íons Cl⁻ (Figura 1). Porém, diante dessa situação de estresse, células de *A. ferrooxidans* LR foram capazes de oxidar totalmente a fonte energética, mesmo em um tempo maior, em comparação ao controle (ausência de íons Cl⁻). Por outro lado, o crescimento bacteriano na presença de 200, 400 e 500 mmol.L⁻¹ de íons Cl⁻ foi totalmente inibido, o que mostra a toxicidade desses íons na oxidação de Fe²⁺ por *A. ferrooxidans* LR (Figura 1).

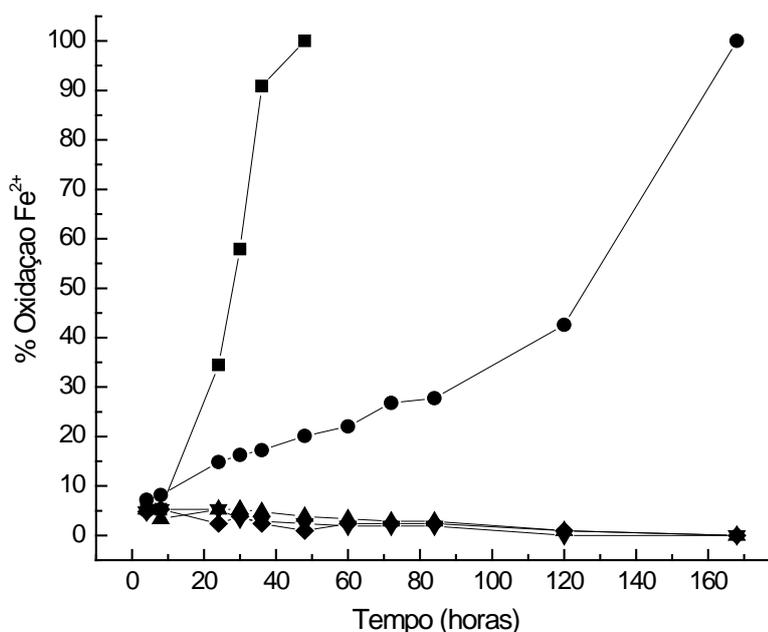


Figura 1. Variação da porcentagem de oxidação dos íons Fe²⁺ durante o crescimento de *A. ferrooxidans* LR em meio T&K completo na presença de íons Cl⁻ nas seguintes concentrações (mmol.L⁻¹): (■) 0; (●) 100; (▲) 200; (▼) 400; (◆) 500.

De maneira análoga, o efeito dos íons Cl⁻, bem como a tolerância de *A. ferrooxidans* S, foram analisados no crescimento bacteriano durante a oxidação de íons Fe²⁺. Uma curva de oxidação de íons Fe²⁺ foi obtida e analisada (Figura 2). Durante o crescimento de *A. ferrooxidans* S observou-se uma diferença na oxidação total da fonte energética de aproximadamente 24 horas entre a condição controle (ausência de íons Cl⁻) e na presença de 100 mmol.L⁻¹ de íons Cl⁻ (Figura 2).

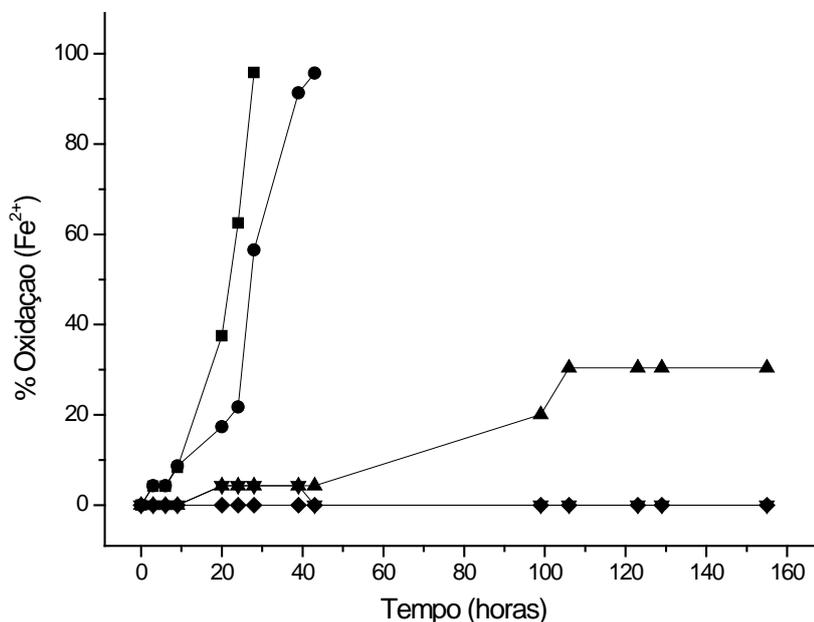


Figura 2. Variação da porcentagem de oxidação dos íons Fe^{2+} durante o crescimento de *A. ferrooxidans* S em meio T&K completo na presença de íons Cl^- nas seguintes concentrações (mmol.L^{-1}): (■) 0; (●) 100; (▲) 200; (▼) 400; (◆) 500.

5. CONCLUSÕES

Os íons Cl^- podem ser utilizados como agentes aceleradores em processos de biolixiviação da calcopirita, porém podem causar inibição da atividade bacteriana. O presente estudo permitiu analisar a influência dos íons Cl^- no crescimento bacteriano e na tolerância da bactéria *A. ferrooxidans* linhagens LR e S na presença dos mesmos.

Os resultados mostraram diferenças no efeito dos íons Cl^- no crescimento de *A. ferrooxidans* LR e S. Em relação à bactéria *A. ferrooxidans* LR, essa linhagem foi tolerante somente a concentração de 100 mmol.L^{-1} desses íons, embora o crescimento bacteriano foi prejudicado nessa condição, em comparação ao controle. Acima de 200 mmol.L^{-1} não se observou atividade bacteriana na oxidação de íons Fe^{2+} , o que mostra o efeito totalmente inibitório de íons Cl^- no crescimento dessa linhagem.

Por outro lado, o *A. ferrooxidans* S oxidou íons Fe^{2+} na presença de 100 e 200 mmol.L^{-1} de íons Cl^- , sendo que nessa última condição, a fase *lag* de crescimento foi prolongada. Provavelmente, um crescimento contínuo nessas condições ou um aumento gradativo na concentração de íons Cl^- do meio, permitirá uma maior tolerância das células de *A. ferrooxidans* S a esses íons, sendo que a oxidação bacteriana total de íons Fe^{2+} poderá ocorrer em um tempo reduzido. Futuramente, células de *A. ferrooxidans* S que sejam mais tolerantes a íons Cl^- poderão

ser utilizadas para otimizar processos biohidrometalúrgicos, principalmente no que diz respeito à oxidação da calcopirita, sulfeto de cobre altamente refratário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Francisco Júnior, W. E.; [Bevilaqua, D.](#); Garcia Junior, O. Estudo da dissolução oxidativa microbiológica de uma complexa amostra mineral contendo pirita (FeS_2), Pirrotita (Fe_{1-x}S) e Molibdenita (MoS_2). *Química Nova (Impresso)*, v. 30, p. 1095-1099, 2007.

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

Jensen, A. B.; Webb, C. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. *Process Biochemistry*, v. 30, n. 3, p. 225-236, 1995.

Lu, Z. Y.; Jeffrey, M. I.; Lawson, F. The effect of chloride ions on the dissolution of chalcopirite in acidic solutions. *Hydrometallurgy*, v. 56, p. 189-202, 2000.

Novello, A. P. F. Análise proteotômica diferencial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* em resposta aos sulfetos minerais calcopirita e bornita e efeito de uma proteína recombinante de *A. ferrooxidans* LR contendo cisteína na oxidação bacteriana da calcopirita. 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

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

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

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