

Isolamento de Bactérias Nativas Heterótrofas Oxidantes de Ferro de uma Mina Abandonada de Cobre em Palca (Peru) e Identificação por MALDI-TOF

César Wilber Guzman Moreno¹
Denise Croce Espinosa Romano²
Joel Barbujianni Sigolo³

Resumo

As bactérias nativas oxidantes de ferro desempenham papel importante nos processos de biolixiviação de sulfetos de cobre. A utilização dessas bactérias viabiliza o processo de biolixiviação dos metais contidos devido a estarem adaptadas às condições ambientais e aos teores de metais presentes no minério. A proposta do presente trabalho foi isolar e identificar bactérias nativas heterótrofas oxidantes de ferro, a partir da drenagem acida de mina (DAM) proveniente de mina abandonada de cobre localizada em Palca no Peru. As amostras de DAM foram enriquecidas em meio de cultivo FeTo e os inóculos foram plaqueados para a obtenção de linhagens puras. No total foram isoladas sete linhagens bacterianas oxidantes de Fe²⁺ e sua morfologia celular foi observada por microscópio eletrônico de varredura (MEV). A avaliação da oxidação de Fe²⁺ pelas linhagens puras foi feita qualitativamente e detectada pela mudança de coloração do meio de cultivo. O método MALDI-TOF foi utilizado na identificação e permitiu a separação das linhagens isoladas segundo o perfil proteico.

Palavras-Chaves: Isolamento bacteriano; Biolixiviação; Palca; Identificação por MALDI-TOF

Isolation of iron-oxidizing heterotrophic bacteria indigenous from abandoned copper mine in Palca (Peru) and identification by MALDI-TOF

Abstract

Iron oxidizing bacteria indigenous play a major role in the bioleaching processes of copper sulfides ores. The use do these bacteria could improve bioleaching process due to be adapted to the environmental conditions and the levels of metals present in the ore. The aim of this study was to isolate and identify iron-oxidizing heterotrophic bacteria indigenous of acid mine drainage (AMD) from an abandoned copper mine located in Palca, Peru. Samples of AMD were enriched in FeTo cultivation medium and an inoculum was plated to obtain pure lines. In this study, seven bacterial strain iron-oxidizing were isolated and your cell morphology was observed by scanning electron microscope (SEM). Oxidation of ferrous iron by bacteria strain was studied qualitatively and detected by change in medium color. MALDI-TOF was used for the bacterial identification and allowed separating the bacterial strains according to their protein profile.

Keywords: Bacterial isolation; Bioleaching; Palca; Identification by MALDI-TOF

¹ *Biólogo, Doutorando, Departamento de Recursos Minerais e Meio Ambiente, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.*

² *Engenheira Metalurgista, Doutora, professora associada, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

³ *Geólogo, Doutor, professor Titular do Departamento de Geologia Sedimentar e Ambiental do Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.*

1. INTRODUÇÃO

As bactérias oxidantes de íon ferroso desenvolvem papel importante no ciclo geoquímico do ferro [1] e seu uso no aproveitamento e recuperação de metais como solutos em drenagens ácidas de mina, tem sido bem sucedida [2]. A importância desses microorganismos é refletida devido a seu uso em dois dos processos mais importantes da indústria de mineração. Na solubilização de metais presentes em minérios sulfetados (biolixiviação) e na abertura do minério (bio-oxidação) e posterior recuperação do metal de interesse por processos químicos [3]. Entre as bactérias mais amplamente estudadas e usadas nesses processos temos as bactérias acidófilas quimiolitotrofas *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrooxidans* [4]. O termo quimioautotrofas refere-se a um grupo de microrganismos que obtém sua energia a partir de compostos inorgânicos. De outra parte, as bactérias heterótrofas acidófilas são microrganismos que obtém sua energia, principalmente, da oxidação de compostos orgânicos. Recentes estudos têm demonstrado a importância desse grupo de microrganismos nos processos de lixiviação devido a sua capacidade de oxidar íon ferroso, compostos de enxofre inorgânico [5] e compostos orgânicos inibidores do crescimento de bactérias quimioautotrofas [4,5].

No processo de exploração mineral, a composição e teor de metais dissolvidos durante a etapa de lixiviação podem mudar ao longo do procedimento industrial dessa atividade. As bactérias nativas oxidantes de íon ferroso que participam na biolixiviação de minérios sulfatados são microrganismos que estão constantemente expostos a essas mudanças e podem apresentar vantagens sobre as bactérias comumente utilizadas na biolixiviação devido a que estão adaptadas a composição mineralógica e química dos minérios a serem tratados. Essas vantagens poderiam levar a um aumento nos valores de extração do metal durante o processo de biolixiviação [6].

Neste trabalho foram coletadas amostras líquidas de drenagem ácida de Mina (DAM) no distrito de Palca (Peru) e as mesmas utilizadas para isolar microrganismos com potencial para a oxidação de íon ferroso. Bactérias foram isoladas em meio FeTo sólido e avaliada a oxidação de ferro qualitativamente. Foi possível obter a morfologia celular bacteriana pela fixação e metalização de uma amostra bacteriana e observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV). A identificação, pelo método de MALDI-TOF, dos isolados bacterianos não foi bem-sucedida, no entanto foi possível agrupá-los em relação aos perfis proteicos gerados.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Local de amostragem

As amostras da DAM foram coletadas de uma mina abandonada na cidade de Palca no sul do Peru, província de Tacna, a 17°79'12" de latitude S e 69°87'50" de longitude O. Os parâmetros como temperatura e pH foram medidos no local da coleta. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C para o isolamento das bactérias nativas heterótrofas oxidantes de ferro.

2.2. Isolamento e conservação das bactérias acidófilas isoladas

O isolamento das bactérias acidófilas do local da coleta de amostra foi seguido da inoculação de uma alíquota (10% v/v) em frascos de 125 ml contendo 25 ml de meio de cultivo FeTo [7,8]. Os cultivos inoculados foram incubados a 30 °C sob agitação constante de 150 rpm por 15 dias. Após a incubação, foi retirada alíquota para o estriamento em placas de Petri. As colônias isoladas foram obtidas após a incubação das placas a 30 °C por um período de até 30 dias. As colônias foram selecionadas e retiradas das placas de Petri e inoculadas em meio de cultivo FeTo por até cinco dias. Uma alíquota (10 % v/v) foi retirada e inoculada em meio de cultivo de sais para conservação a 4 °C [9]. Um estoque de cada linhagem foi preservada a -80 °C [10].

2.3. Avaliação da oxidação de Fe²⁺ pelas bactérias acidófilas isoladas

Para avaliar a oxidação de Fe²⁺ pelas bactérias acidófilas isoladas, os cultivos foram inoculados em meio FeTo e incubados a 30 °C ate 7 dias. A oxidação de Fe²⁺ foi avaliada qualitativamente e determinada pela alteração da coloração inicial do meio de cultivo.

2.4. Identificação das bactérias isoladas por espectrometria de massa (MALDI-TOF Biotyper)

As linhagens selecionadas foram analisadas para identificação através do equipamento de espectrometria de massa (MALDI-TOF Biotyper). Uma colônia de cada linhagem, cultivada em placa, foi retirada e misturada com 1 µl de solução matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxinâmico em solução saturada com 50 % de acetonitrila e 2,5 % de acidotrifluoracético) em placa de espectrometria de massa. Após a secagem da amostra, foi realizada a análise para a geração dos espectros de massa de proteínas específicas para cada espécie [11].

2.5. Morfologia celular

A morfologia celular bacteriana foi obtida em microscópio eletrônico de varredura (MEV) seguindo a metodologia proposta por Watanabe [12] e modificada pelo autor. Uma alíquota de 2 ml do meio de cultivo com as bactérias inoculadas foram concentradas por centrifugação por um período de 5 minutos a 10000g. As bactérias inoculadas e concentradas foram resuspendidas em 1 ml de meio de cultivo. Uma alíquota de 20 a 30 µl das bactérias resuspendidas foi colocado no porta amostra (*stub*) do microscópio eletrônico. O porta amostra com a bactéria resuspendida foi secado a temperatura ambiente. Após a secagem, a amostra foi coberta com glutaraldeído (2,5 %) por duas horas e com tetraóxido de ósmio (1 %) por mais duas horas. A amostra foi lavada com uma solução de álcool etílico em diferentes concentrações (70, 90, 95 e 100 %) por 15 minutos e levada a estufa a 40 °C por um período máximo de 24 horas. O porta amostra com a bactéria foi metalizada com ouro por 10 segundos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Local de amostragem

A Figura 1 do lado superior esquerdo exibe a localização do Peru e a Figura 1 ao lado superior direito mostra a província de Tacna. Na parte inferior da Figura 1 a localização em detalhe da província de Tacna, e o distrito de Palca.

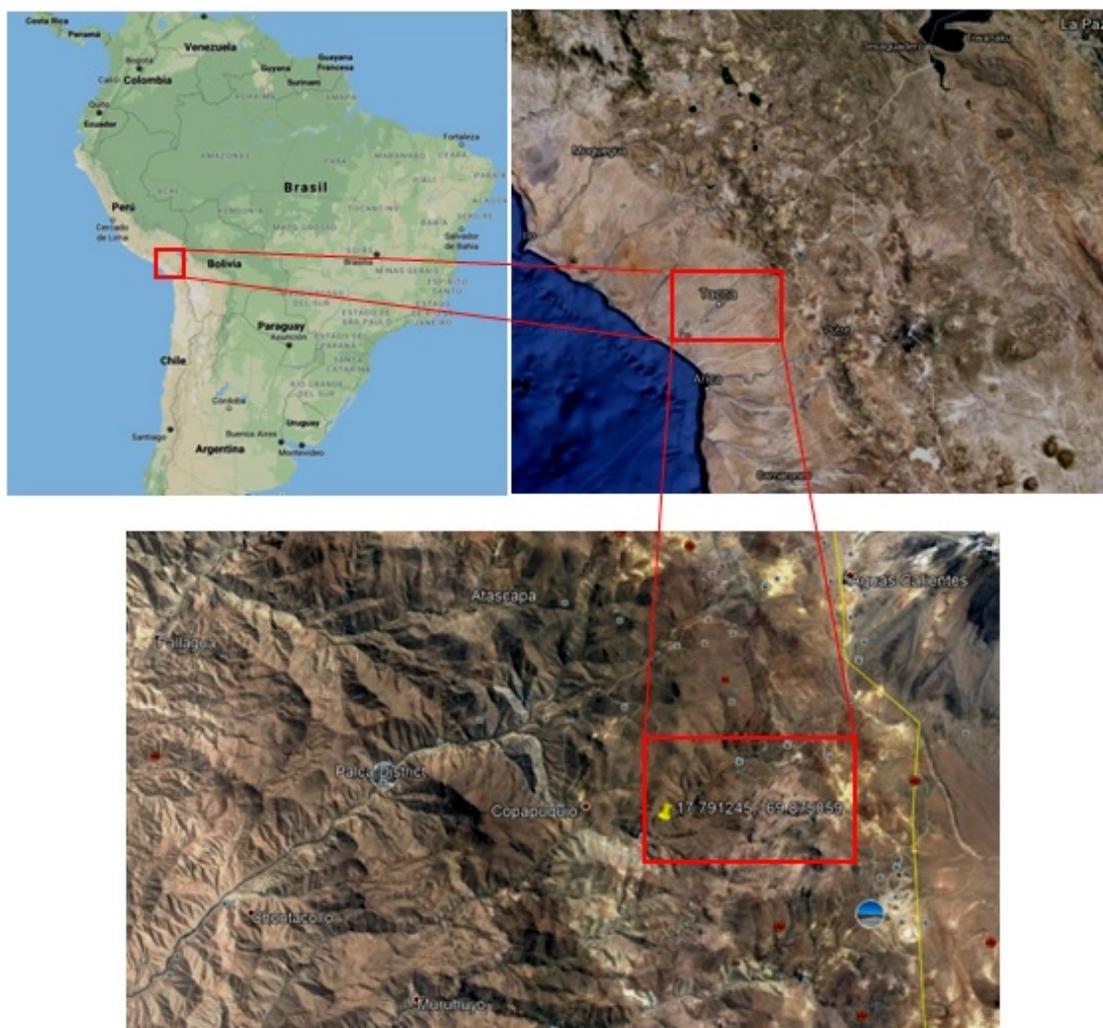


Figura 1. Localização da área de coleta das amostras. No requadro vermelho o setor específico da área de coleta. Fonte: Google Earth™ Mapping Service.

As condições de coleta das amostras foram de temperatura aproximada de 10 °C e pH em torno de 5 a 6.

3.2. Isolamento de bactérias heterótrofas nativas oxidantes de Fe²⁺

Para o isolamento das bactérias acidófilas das amostras de DAM foi utilizado o meio de cultivo FeTo. A escolha desse meio de cultivo deve-se ao nutriente Triptona de soja (TSB) para o desenvolvimento de bactérias heterótrofas

oxidantes de íon ferroso e do tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para sustentar o crescimento de bactérias oxidantes de enxofre reduzido. De acordo com Johnson [13], foi demonstrado que bactérias acidófilas heterótrofas moderadas podem ser isoladas pelo meio FeTo. O pH do meio de cultivo FeTo se diferencia dos demais meios de cultura como o 9K [14] e T&K [15], que apresentam um pH baixo ($\text{pH} < 2$). O meio de cultivo FeTo apresenta um $\text{pH} > 4$ o que favorece o crescimento dos microrganismos presentes nas amostras coletadas com pH 5 a 6 [8]. A Figura 2 exhibe as colônias desenvolvidas de bactérias oxidantes de Fe^{2+} da amostra de DAM em placas de Petri.

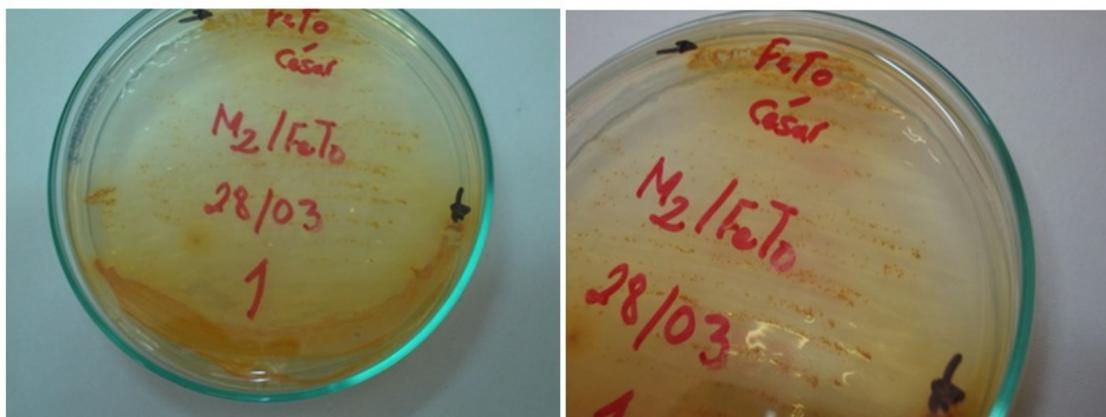


Figura 2. Colônias crescidas de bactérias oxidantes de Fe^{2+} sobre placas Petri contendo meio sólido FeTo. Fonte: Acervo pessoal.

As colônias bacterianas foram selecionadas em 7 linhagens para os testes de oxidação de Fe^{2+} , para as análises no MEV e para a sua identificação pelo método de MALDI-TOF. A seleção das linhagens foi determinada em função da relação morfológica da colônia (formato, coloração e tamanho) e da bactéria através de microscopia óptica.

3.3. Avaliação da oxidação de Fe^{2+} pelas bactérias acidófilas isoladas

As bactérias selecionadas na etapa de isolamento demonstraram capacidade de oxidar Fe^{2+} presente no meio de cultivo. A oxidação do íon ferroso foi avaliada pela mudança de coloração do meio de cultivo de incolor para marrom-avermelhada [16]. A Figura 3 exhibe de forma distinta a oxidação biológica e química de íon ferroso. No lado esquerdo da Figura 3 é apresentado um frasco com meio de cultivo FeTo inoculado com uma das bactérias isoladas. A coloração marrom-avermelhada do meio de cultivo deve-se a oxidação do íon ferroso [16]. No lado direito da Figura 3 é apresentado um frasco com meio de cultivo FeTo não inoculado com bactéria. A coloração alaranjada do meio de cultivo deve-se a oxidação parcial de íon ferroso por condições químicas [17] e a hidrólise do tiosulfato [7]. De acordo com Meruane [17], a oxidação de íon ferroso pode ocorrer em condições biológicas e químicas. Meruane [17] demonstrou que em $\text{pH} < 5$, como o pH do meio de cultivo FeTo ($\text{pH} \cong 4$), a oxidação de íon ferroso é maior em condições biológicas que em condições abióticas.



Figura 3. Meio de cultivo FeTo inoculado com bactérias oxidantes de Fe^{2+} . No lado esquerdo da Figura o cultivo inoculado com a bactéria heterótrofa oxidante de íon ferroso. No lado direito da Figura o meio de cultivo sem inoculação de bactéria (controle).

3.4. Identificação das bactérias isoladas por espectrometria de massa (MALDI-TOF Biotyper)

A Figura 4 exibe os sete espectros proteicos das colônias escolhidas no isolamento e analisadas pelo método de MALDI-TOF.

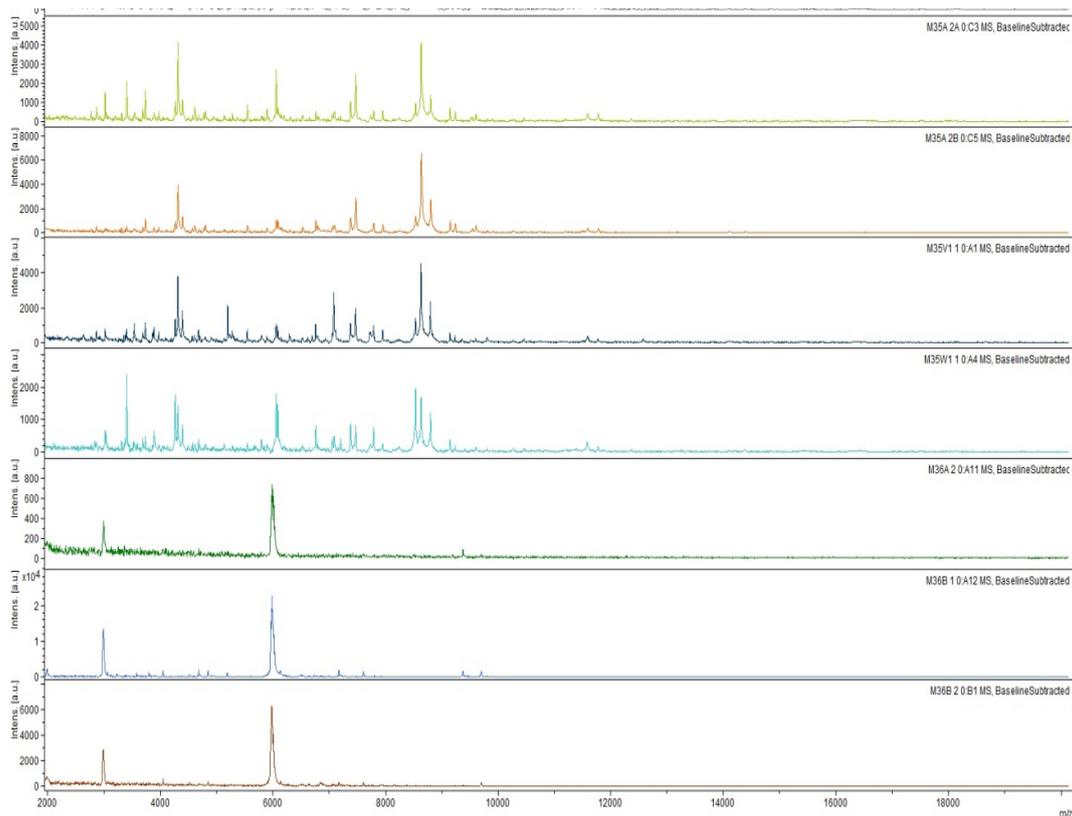


Figura 4. Espectro de proteínas fornecido por MALDI-TOF para a identificação das bactérias isoladas. Podem-se observar, no espectrograma, dois perfis proteicos bem diferenciados.

Os quatro espectros superiores tem semelhança com relação ao perfil proteico o que poderia evidenciar que essas quatro colônias escolhidas pertencem à mesma espécie microbiana. De acordo com Singhal [18], uma espécie bacteriana pode ter diferentes linhagens. Os três espectros inferiores mostram

também um único perfil proteico para as outras três colônias escolhidas no isolamento.

A Figura 4 exibe dois perfis proteicos diferentes, o que evidenciaria a existência de duas espécies microbianas diferentes. De acordo com Singhal [18] os perfis proteicos são semelhantes para as linhagens diferentes de uma única espécie microbiana.

Após a análise dos perfis proteicos das amostras no banco de dados do programa MALDI-TOF, foi constatado um valor inferior a dois. Com esse valor informado pelo MALDI-TOF não é possível identificar os microrganismos ao nível de gênero ou espécie [19].

3.5. Morfologia celular

A Figura 5 mostra a morfologia analisada no MEV de um dos microrganismos isolados e cultivado no meio FeTo.

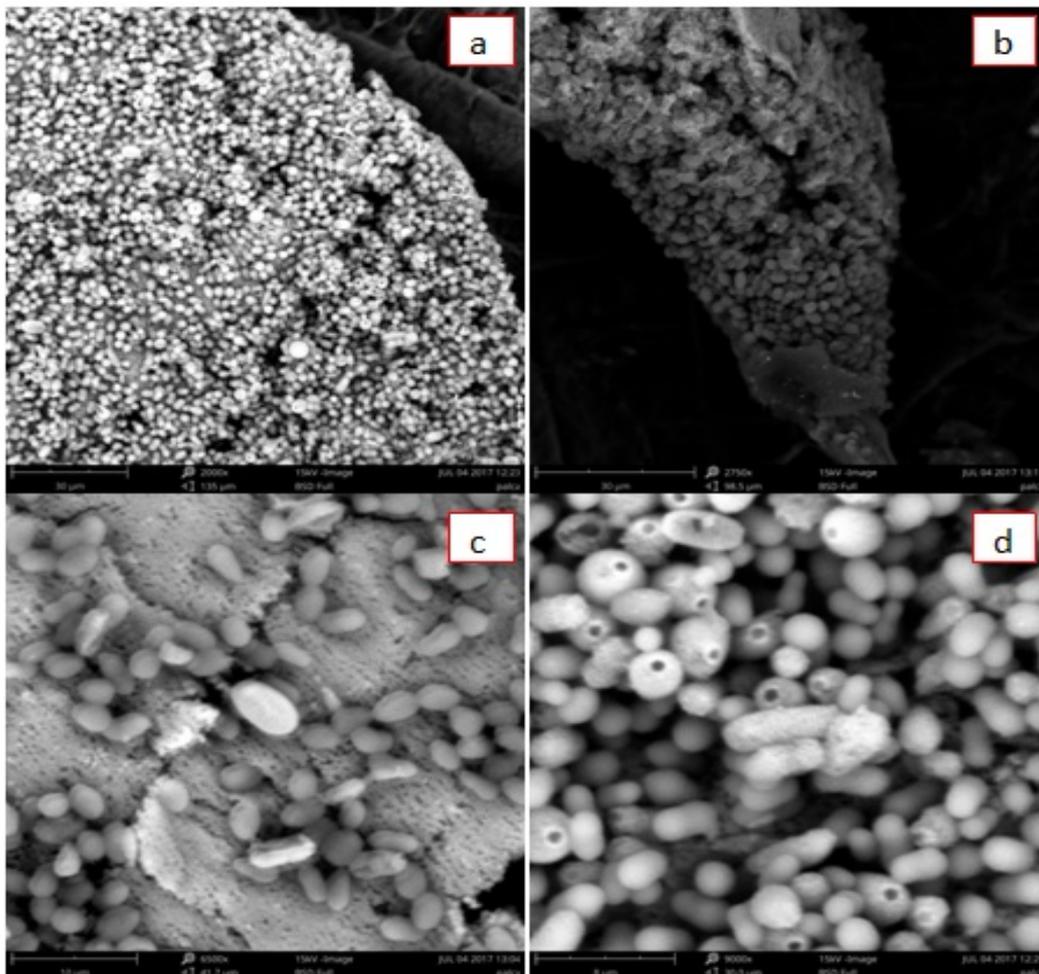


Figura 5. Micrografia eletrônica obtida por MEV de um microrganismo isolado e cultivado em meio de cultivo FeTo. (a, b, c e d).

Na Figura 5 (a, b, c, d) está sendo apresentado o microrganismo (no formato bacilar) aderido sobre a superfície do ferro precipitado presente no meio de cultivo. O ferro precipitado foi adicionado na forma reduzida (Fe^{2+}) e usado como fonte de energia para o microrganismo.

4. CONCLUSÃO

As amostras coletadas de uma mina abandonada de cobre no Distrito de Palca no sul do Peru permitiu o isolamento de microrganismos oxidantes de Fe^{2+} . No ensaio de isolamento dos microrganismos foi possível selecionar sete linhagens oxidantes de Fe^{2+} . Na análise do método MALDI-TOF foram gerados os perfis proteicos dos microrganismos isolados, o que permitiu agrupar as linhagens selecionadas em duas possíveis espécies diferentes. A capacidade bacteriana para oxidar Fe^{2+} foi avaliada qualitativamente e a morfologia das células microbianas foi obtida por MEV.

Agradecimento

Os autores agradecem pelo suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): Cota Institucional (Demanda Social), pela bolsa concedida de doutorado ao primeiro autor deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Hedrich S, Schlomann M, Johnson DB. The iron-oxidizing proteobacteria. Microbiology [Internet]. Microbiology Society; 2011 Jun 1 [cited 2018 Jul 12];157(6):1551–64. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.045344-0>
2. Okibe N, Gericke M, Hallberg KB, Johnson DB. Enumeration and Characterization of Acidophilic Microorganisms Isolated from a Pilot Plant Stirred-Tank Bioleaching Operation. 2003;69(4):1936–43.
3. Rawlings DE. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. Microbial cell factories [Internet]. BioMed Central; 2005 May 6 [cited 2018 Jul 12];4(1):13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15877814>
4. Joe S, Suto K, Inoie C, Chida T. Isolation and Characterization of Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacterium from Enrichment Culture Obtained from Acid Mine Drainage Treatment Plant. 2007;104(2):117–23.
5. Johnson DB, Rolfe S, Hallberg KB, Iversen E. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. Environmental Microbiology [Internet]. Wiley/Blackwell (10.1111); 2001 Oct 1 [cited 2018 Jul 12];3(10):630–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2001.00234.x>
6. Lavallo L, Chiacchiarini P, Pogliani C, Donati E. Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. Process Biochemistry [Internet]. Elsevier; 2005 Mar 1 [cited 2018 Jul 12];40(3–4):1095–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204001852>
7. Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating

- acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* [Internet]. Elsevier; 1995 Aug 1 [cited 2018 Jul 8];23(2):205–18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129500015D>
8. Johnson DB, Hallberg KB. Techniques for Detecting and Identifying Acidophilic Mineral-Oxidizing Microorganisms. In: *Biomining* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2018 Jul 8]. p. 237–61. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-34911-2_12
 9. Bacelar-nicolau P, Johnson DB. Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures. *Applied and environmental microbiology*. 1999;65(2):585–90.
 10. Balfour-Cunningham A, Boxall NJ, Banning N, Morris C. Preservation of salt-tolerant acidophiles used for chalcopyrite bioleaching: Assessment of cryopreservation, liquid-drying and cold storage. *Minerals Engineering* [Internet]. Pergamon; 2017 May 15 [cited 2018 Jul 8];106:91–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0892687516302953>
 11. Avanzi IR, Gracioso LH, Baltazar M dos PG, Karolski B, Perpetuo EA, do Nascimento CAO. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Environmental Science and Pollution Research* [Internet]. 2017 Feb 25 [cited 2018 Jul 8];24(4):3717–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888481>
 12. Watanabe I-S, Ogawa K, Cury DP, Dias FJ, Sosthenes MCK, Issa JPM, et al. Fine Structure of Bacterial Adhesion to the Epithelial Cell Membranes of the Filiform Papillae of Tongue and Palatine Mucosa of Rodents: A Morphometric, TEM, and HRSEM Study. *Microscopy Research and Technique* [Internet]. 2013 Dec [cited 2018 Jul 8];76(12):1226–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.22289>
 13. Hallberg KB, Johnson DB. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. 2003;71:139–48.
 14. Li Q, Wang C, Li B, Sun C, Deng F, Song C, et al. Isolation of *Thiobacillus* spp. and its application in the removal of heavy metals from activated sludge [Internet]. Vol. 11, *African Journal of Biotechnology*. Academic Journals; 2012 [cited 2018 Jul 12]. 16336-16341 p. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129906>
 15. Tuovinen OH, Kelly DP. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with $^{14}\text{CO}_2$ -fixation and iron oxidation as measures of growth. *Archiv fur Mikrobiologie* [Internet]. 1973 [cited 2018 Jul 12];88(4):285–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4684598>
 16. Yahya A, Hallberg KB, Johnson DB. Iron and carbon metabolism by a mineral-oxidizing *Alicyclobacillus*-like bacterium. 2008;305–12.
 17. Meruane G, Vargas T. Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0. *Hydrometallurgy* [Internet]. Elsevier; 2003 Oct 1 [cited 2018 Jul 12];71(1–2):149–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X03001518>

18. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015 Aug 5 [cited 2018 Jul 12];6:791. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300860>
19. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Jul 2];29(8):601–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X11001571>