

**EIJI YAMASSAKI DE ALMEIDA**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS DA ACIDITHIOBACILLUS  
FERROOXIDANS EM MEIOS RICOS EM Cu (II), Mn (II) E Cr  
(III): IMPLICAÇÕES EM EXPLORAÇÃO ESPACIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo - SP  
2020**

**EIJI YAMASSAKI DE ALMEIDA**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E APLICAÇÕES  
BIOTECNOLÓGICAS DA ACIDITHIOBACILLUS  
FERROOXIDANS EM MEIOS RICOS EM Cu (II), Mn (II) E Cr  
(III): IMPLICAÇÕES EM EXPLORAÇÃO ESPACIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rodrigues

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo - SP  
2020**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Yamassaki, Eiji  
RESPOSTA FISIOLÓGICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS  
DA ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM MEIOS RICOS EM  
Cu (II), Mn (II) E Cr (III): IMPLICAÇÕES EM  
EXPLORAÇÃO ESPACIAL / Eiji Yamassaki; orientador  
Fabio Rodrigues. -- São Paulo, 2021.  
112 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Exploração Espacial. 2. Astrobiologia. 3.  
Microbiologia. 4. Geomicrobiologia. 5. Extremófilos.  
I. Rodrigues, Fabio, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Eiji Yamassaki de Almeida

Titulo da Dissertação: RESPOSTA FISIOLÓGICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS EM MEIOS RICOS EM Cu (II), Mn (II) E Cr (III): IMPLICAÇÕES EM EXPLORAÇÃO ESPACIAL

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rodrigues

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**       **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

São Paulo, 26 de março de 2020

### TERMO DE ISENÇÃO DE USO DE ANIMAIS

Declaro que o projeto intitulado “Resposta Fisiológica e Aplicações Biotecnológicas da *Acidithiobacillus ferroxidans* em meios ricos em Cu(II), Mn(II) e Cr(III): Implicações em Exploração espacial”, desenvolvido pelo aluno Eiji Yamassaki de Almeida, sob orientação do Prof. Dr. Fabio Rodrigues, não utiliza experimentação animal e, portanto, não recebe avaliação pela Comissão de Ética e Cuidados Animais (CEUA) do Instituto de Química, USP.

Sem mais, me coloco à disposição para eventuais esclarecimentos.

Atenciosamente,



---

Profª. Dra. Daniela S. Bassères  
Coordenadora CEUA

A minha mãe,  
que sempre me incentivou e me inspirou.

## Agradecimentos

A Professora Dr. Cassiana Nomura, que gentilmente cedeu seu laboratório para a realização de experimentos. Além de confiar em mim para atividades de vestibular. Uma pessoa muito gentil que guardo grande apreço.

A Alexandrina Carvalho, aluna da professora Cassiana que me auxiliou na realização dos experimentos. Outra pessoa muito gentil que guardo grande apreço.

Ao Professor Dr. Erick Bastos, que gentilmente cedeu seu laboratório para a realização de experimentos. Além de ter me dado aulas no início da graduação que nunca esquecerei.

Ao Arthur, aluno do professor Erick, que me ajudou na realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. Carlos Menck, que desde o primeiro dia na faculdade sempre foi uma inspiração, não só como professor/pesquisador, mas também como pessoa.

Ao meu Orientador Fabio por ter me aguentado todos esses 5 anos. Anos de muito aprendizado, mas também de risadas e momentos que levarei comigo para sempre.

Ao Douglas Galante, que me auxiliou no entendimento de diversos experimentos e questões técnicas, além é claro de me contagiar com seu senso de humor.

Ao André Pulschen, que me apresentou o Astrolab. A culpa é dele.

Ao Evandro Pereira, meu amigo que sempre me ajudou me ensinando muito mais do que simplesmente os conceitos metodológicos. Obrigado por compartilhar bons momentos.

Ao Gabriel Funny Bramon Gonçalves, amigo que sempre tem alguma curiosidade para fazer o dia mais cheio de cultura e conhecimento.

Ao Gabriel Not Funny, pelos ensinamentos e momentos sarcásticos.

A Juliana Abrantes que sempre escutou minhas indagações filosóficas e compartilhou das crises existenciais de um jovem adulto.

A Ana Luiza que me ensinou muito sobre a vida que com toda a certeza me fizeram uma pessoa melhor.

Ao Gian e a Lari, grandes amigos que infelizmente partiram. Agora estão na Suíça.

A Jaja e a Glia, duas pessoas que guardo boas recordações e me ensinaram bastante.

A Carola, por sempre ser a amiga doida que todos precisam.

A todos os membros do Astrolab por todos esses anos de convivência e boas experiências.

Aos meus irmãos de coração, Patrick e Felipe, que sempre estiveram comigo. Muitas ideias ruins, ideias não tão ruins e muitas risadas para levar a vida.

Ao Giovanni Mietto Foltran, meu fiel amigo que sempre busca uma forma de afirmar que é italiano.

Aos meus amigos Renato, Fabre e Roni, que desde o ensino médio seguem compartilhando bons momentos e comentários engraçados nos momentos de tristeza.

A todos os meus outros amigos, pessoas que tenho grande estima e apreço os momentos que compartilhamos.

Aos demais professores e pesquisadores que integraram a banca avaliadora deste trabalho e aos que também, de alguma forma, contribuíram para a realização dele.

Aos técnicos, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a realização deste trabalho.

A USP e seus docentes e funcionários, sem os quais nada disso seria possível.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade.

## **Agradecimentos**

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro e concessão de bolsa de mestrado.

## Resumo

ALMEIDA, E. Y. **Resposta fisiológica *Acidithiobacillus ferrooxidans* em meios ricos em Cu (II), Mn (II) e Cr (III): biotecnologia na exploração espacial**, 107f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Microrganismos extremófilos são caracterizados por crescerem ou sobreviverem em ambientes tidos como extremos, cujos fatores físicos ou geoquímicos estão fora das faixas consideradas ideais para a maioria dos seres vivos. Ao se adaptarem a esses locais inóspitos, esses organismos foram selecionados por terem diferentes estratégias, como metabolismos diferenciados comparados aos considerados padrões. Entre esses microrganismos encontram-se os organismos quimiolitotróficos, ou seja, aqueles autotróficos que conseguem usar compostos inorgânicos para obtenção de energia e fixação de carbono. Um exemplo é a bactéria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* capaz de oxidar formas reduzidas de ferro e enxofre levando a formação de minerais como Schwertmanita e Jarosita. A Schwertmanita (fórmula ideal  $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_n\text{H}_2\text{O}$ ) é gerada inicialmente, não possuindo uma estrutura cristalina bem definida; numa segunda etapa, esse mineral se transforma em Jarosita (fórmula ideal  $\text{AFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$  onde A é um Cátion mono ou divalente), mineral com estrutura cristalina bem definida. Esses minerais têm a capacidade retirar alguns metais do ambiente durante a sua formação, entretanto o mecanismo ainda não foi elucidado. A precipitação biótica de minerais de ferro tem implicações importantes para estudos tanto da área básica, para entendimento da diversidade microbiológica do planeta, e também aplicada no contexto da Astrobiologia e exploração espacial. A Astrobiologia dedica-se a estudar cientificamente origem, evolução, distribuição e futuro da vida tanto na Terra quanto a possibilidade de ocorrer em outros corpos celestes. Baseado nessas informações, o presente projeto tem como objetivo estudar a resposta fisiológica da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* frente a condições de meio com excesso de cobre divalente (Cu II), manganês divalente (Mn II) e cromo trivalente (Cr III). O intuito é analisar sua sobrevivência em ambientes com quimiotoxicidade e verificar influências no precipitado. Após o entendimento do metabolismo, analisar possíveis propostas de aplicação desses conhecimentos nas áreas de Astrobiologia.

Palavras Chave: Bactéria – Astrobiologia – Metais tóxicos – Resistência – Exploração espacial

## Abstract

ALMEIDA, E. Y. **Physiological response *Acidithiobacillus ferrooxidans* in media rich in Cu (II), Mn (II) and Cr (III): biotechnology in space exploration**, 107f. Dissertation (Master in Biotecnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Extremophiles microorganisms are characterized by growing or surviving in environments considered to be extreme, whose physical or geochemical factors are outside the ranges considered ideal for most living beings. When adapting to these inhospitable places, these organisms were selected because they have different strategies, such as different metabolisms compared to those considered standards. Among these microorganisms are chemolithotrophic organisms, that is, those autotrophic organisms that are able to use inorganic compounds to obtain energy and carbon fixation. An example is the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* capable of oxidizing reduced forms of iron and sulfur leading to the formation of minerals such as Schwertmanite and Jarosite. Schwertmanite (ideal formula  $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_n\text{H}_2\text{O}$ ) is generated initially, not having a well-defined crystalline structure; in a second stage, this mineral is transformed into Jarosite (ideal formula  $\text{AFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$  where A is a mono or divalent cation), mineral with a well-defined crystalline structure. These minerals have the capacity to remove some metals from the environment during their formation, however the mechanism has not yet been elucidated. The biotic precipitation of iron minerals has important implications for studies both in the basic area, for understanding the planet's microbiological diversity, and also applied in the context of Astrobiology and space exploration. Astrobiology is dedicated to scientifically studying the origin, evolution, distribution and future of life both on Earth and the possibility of it occurring in other celestial bodies. Based on this information, the present project aims to study the physiological response of the bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* against medium conditions with excess divalent copper (Cu II), divalent manganese (Mn II) and trivalent chromium (Cr III). The aim is to analyze its survival in chemotoxic environments and to verify influences on the precipitate. After understanding the metabolism, analyze possible proposals for applying this knowledge in the areas of Astrobiology.

Keywords: Bacteria - Astrobiology - Toxic Metals - Resistance –Space exploration

## Lista de Ilustrações

Quadro 1: Principais classes de organismos extremófilos. ....	20
Quadro 2: Tabela de valores de MTC segundo a literatura para a bactéria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> . ....	57
Quadro 3: Tabela de valores de MTC segundo a literatura para a bactéria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> e MTCs encontrados no presente projeto. ....	64
Quadro 4: Tabela de porcentagem de recuperação do metal tóxico pelo tipo de precipitação, biótica ou abiótica. ....	67
Quadro 5: Comparação das bandas de espectros Raman do mineral Jarosita, segundo a referência e segundo este trabalho. ....	76
Quadro 6: Comparação das bandas de espectros Raman dos mineirais Jarosita e Schwertmannita, referência e experimental. ....	81
Quadro 7 : Bandas que apresentaram tendência nas Jarositas obtidas em meio contendo um dos metais estudados. ....	89

## Lista de Figuras

Figura 1: Modelo de oxidação de Fe II em <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270. Proteínas estão indicadas com o nome do gene ou operon que as codificam, com exceção da ATPase e complexo NADH, sendo este último com o nome NDH1. ....	36
Figura 2: Modelo de oxidação de espécimes de enxofre por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> 23270. Abreviações estão contidas no texto. ....	37
Figura 3: Curva de concentração de Fe(II) e Fe(III) na solução e Fe(III) do precipitado (após dissolução) em cultura utilizando o meio T&K sem adição de nenhum metal pesado. ....	51
Figura 4: Meios de cultura e sua coloração dependendo da quantidade de metais pesados e tempo de cultura. Em A temos o meio T&K modificado inoculado sem a adição de metais pesados. Em B temos o meio T&K modificado inoculado com a adição de metais pesados. Em C temos o meio T&K modificado após período de cultivo. ....	54
Figura 5: Meios de cultura sem inóculo após período de espera nas mesmas condições em que os cultivos foram encubados. Em A temos o frasco após 6 meses e em B temos o frasco após 12 meses. ....	55
Figura 6: Amostra pela numeração por concentração dos metais tóxicos em Mol/L. ....	56
Figura 7: Gráfico de concentração de metais tóxicos, em porcentagem de mols de Fe(II), pelo tempo que se levou até chegar ao estado estacionário. ....	58
Figura 8: Gráfico do tempo em horas até chegar ao estado estacionário por concentração de Mn II em de mols por litro. ....	60
Figura 9: Gráfico do tempo em horas até chegar ao estado estacionário por concentração de Cr(III) em mols por litro. ....	61
Figura 10: Gráfico do tempo em horas até chegar ao estado estacionário por concentração de Cu(II) em mols por litro. ....	63
Figura 11: Mineral oriundo do metabolismo da bactéria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> . Em A temos o mineral secando na placa de petri e em B o mineral num microtubo de 2mL. ....	65
Figura 12: Gráfico de rendimento em miligramas(mg) pela metodologia utilizada. ...	66
Figura 13: Gráfico de quantidade em gramas de Cr III e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar. ....	68
Figura 14: Gráfico de quantidade em gramas de Cu(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar. ....	69
Figura 15 : Gráfico de quantidade em gramas de Mn(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar. ....	70
Figura 16 : Gráfico de quantidade em gramas de Cr(III) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar. ....	71
Figura 17 : Gráfico de quantidade em gramas de Cu(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar. ....	72

Figura 18 : Gráfico de quantidade em gramas de Mn(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar. ....	73
Figura 19: Espectro Raman de uma amostra de possível Jarosita. ....	75
Figura 20: Espectro Raman do precipitado biótico em comparação com o espectro da Jarosita X050106. ....	77
Figura 21: Espectro Raman do precipitado biótico em comparação com o espectro da Jarosita X050106. ....	78
Figura 22: Espectro Raman do precipitado abiótico obtido depois de 12 meses de incubação do Controle Negativo em comparação com o espectro da Jarosita X050106 e a Jarosita Mineral. ....	79
Figura 23 : Espectro Raman de uma amostra de possível Jarosita. ....	80
Figura 24: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios com concentrações crescentes de metais tóxicos. A amostra 1 corresponde a uma concentração de 6,75E-04 mol/L, amostra 11 de 9E-04 mol/L, amostra 23 de 1,5E-03 mol/L, amostra 36 de 2,4E-03 mol/L e amostra 45 de 3,23E-03 mol/L.....	83
Figura 25: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios contendo apenas Cu(II), Mn(II), Cr(III) e na Multielementar (Amostra 47). As concentrações dos metais estudados estão no MTC da cultura multielementar. ....	84
Figura 26: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Cr(III) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.....	85
Figura 27: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Cu(II) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.....	86
Figura 28: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Mn(II) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.....	87
Figura 29: Espectro Raman das amostras de Jarositas em seus respectivos MTCs: monoelementar Cu(II), monoelementar Mn(II), monoelementar Cr(III) e Multielementar (Amostra 47 em comparação com a Jarosita retirada de meio sem os metais. ....	88
Figura 30: Gráfico da Largura a Meia Altura a meia altura da banda 622 cm <sup>-1</sup> pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III). ....	90
Figura 31: Gráfico da Largura a Meia Altura a meia altura da banda 85 cm <sup>-1</sup> pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III). ....	90
Figura 32: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1158 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III).....	91

Figura 33: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 352 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).....	92
Figura 34: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 570 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II). .....	92
Figura 35: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 622 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II). .....	93
Figura 36: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1005 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II). .....	93
Figura 37: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1098 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II). .....	94
Figura 38: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1158 cm <sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II). .....	94
Figura 39: Comparação das absorvidades das diversas amostras de Jarositas e Schwertmannita minerais. ....	96
Figura 40: Curva de absorvidade das Jarositas retiradas de meio de cultura multielementar comparadas com as Jarositas sem os metais alvo. A amostra 1 corresponde a uma concentração de 6,75E-04 mol/L, amostra 15 de 1,13E-03 mol/L, amostra 22 de 1,43E-03 mol/L, amostra 29 de 1,93E-03 mol/L, amostra 34 de 2,33E-03 e amostra 45 de 3,23E-03 mol/L. ....	97
Figura 41: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Cu(II), e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.....	98
Figura 42: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Cr(III) e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.....	99
Figura 43: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Mn(II) e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.....	100
Figura 44: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares no MTC, amostra multielementar no MTC (Amostra 45) e Jarositas puras.....	101

## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1) Microrganismos extremófilos .....	18
2.2) Aplicações biotecnológicas de extremófilos.....	21
1.3.1) Geomicrobiologia.....	24
1.3.2) Astrobiologia e exploração espacial .....	28
2.3) <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	34
2.4) Considerações finais .....	43
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
4.1) Microrganismo Modelo.....	46
4.2) Condições de Cultivo .....	46
4.3) Medida de crescimento por fotometria.....	47
4.4) Recuperação do precipitado .....	48
4.5) Caracterização dos precipitados utilizando técnicas espectroscópicas.....	49
3.5.1) Espectroscopia de Absorção Atômica .....	49
3.5.2) Espectroscopia Raman.....	49
3.5.3) Espectroscopia de Reflectância UV-Vis .....	50
<b>5.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1) Medida de crescimento em cultivo em meio de ferro isento dos metais alvo	51
5.2) Cultivo em meio de cultura contendo os metais potencialmente tóxicos alvo desse estudo.....	53
5.3) Recuperação do precipitado .....	65
5.4) Espectroscopia de absorção atômica .....	66
5.5) Espectroscopia Raman.....	74
5.5.1) Análise dos espectros Raman das amostras de Jarosita com os metais alvo .....	82
5.6) Reflectância UV-Vis do precipitado .....	95
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>102</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>104</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O grupo Quimiosfera, fundado em 2014 no IQ-USP, tem se dedicado a entender aspectos químicos e biológicos da interação entre biosfera e ambiente, usando como modelo microrganismos extremófilos (aqueles resistentes a condições ambientais extremas, conforme explicado no tópico 2.1). Nesse contexto, as principais frentes de pesquisas abordadas pelo grupo são:

- 1) Análise da resposta química de microrganismos extremófilos a diferentes condições ambientais, busca de moléculas que possam ser usadas como bioassinaturas espectroscópicas para Astrobiologia e possíveis aplicações biotecnológicas;
- 2) Estudo da interação entre microrganismos quimiolitotróficos e o substrato inorgânico, entendendo sua importância nos ciclos biogeoquímicos, como gerador de bioassinaturas e para aplicações biotecnológicas;
- 3) Prospecção e caracterização de novos microrganismos para serem aplicados como modelos para Astrobiologia, Biogeoquímica e exploração espacial;

Percebe-se que apesar do grande enfoque do grupo para o entendimento básico desses microrganismos na astrobiologia, (descrito no item 1.3.2), mas uma vez que se estuda microrganismos de ambientes extremos, com metabolismos variados, a busca por aplicações biotecnológicas pode estar presente, fazendo com que pesquisa básica e aplicada andem juntas. A presente dissertação, a primeira do grupo em biotecnologia aplicada a exploração espacial, há o entendimento de alguns processos fundamentais de organismos quimiolitotróficos, porém com o viés de possíveis aplicações futuras em exploração espacial.

Como exemplos de produções científicas em cada uma das principais frentes temos:

- 1) Estudo da resposta do microrganismo poliextremófilo *Deinococcus radiodurans* a condições espaciais simuladas – Título do artigo: *Probing the response of*

*Deinococcus radiodurans* exposed to simulated space conditions (de Araujo, Rodrigues et al. 2020).

O estudo da bactéria *Deinococcus radiodurans* em simulação de condições espaciais, que indicou que o dano nas membranas celulares não são os principais causadores da inativação celular da bactéria

2) Aplicação de técnicas analíticas (eletroforese capilar) na detecção a biolixiviação de metais pela bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* em amostras simulando meteoritos – Título do artigo: *Application of capillary electrophoresis combined with conductometric and UV detection to monitor meteorite simulant bioleaching by Acidithiobacillus ferrooxidans*(Gonçalves Silva, Yamassaki de Almeida et al. 2018)

Estudo para validar e propor combinação de duas técnicas experimentais, eletroforese capilar e espectrofotometria UV, para monitorar o processo de crescimento e lixiviação da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esse estudo indicou que essas duas técnicas combinadas podem ser utilizadas para a monitoração de crescimento de microrganismos quimiolitotróficos em superfícies de meteoritos e asteroides, para exploração de metais preciosos.

3) Isolamento de leveduras de ambientes extremos no deserto do Atacama – Título: *UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology*

Leveduras isoladas de amostras ambientas do Deserto do Atacama, demonstraram ter alta resistência a radiação UV-B, UV-C e UV-ambiental, além de capacidade de crescer em concentrações salinas e baixa temperatura moderadas. Esses dados indicam que esse microrganismos tem potencial para serem possíveis organismos modelo na área da Astrobiologia (Pulschen, Rodrigues et al. 2015).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1) Microrganismos extremófilos

Microrganismos ocupam os mais variados nichos na Terra (Seckbach and Chela-Flores 2007) prosperando em locais em que a maioria dos seres vivos apresenta dificuldade, ou mesmo, não conseguem se adaptar. Muitos desses organismos sobrevivem em ambientes considerados inóspitos para a maioria das formas de vida no planeta, sendo conhecidos como organismos extremófilos. Basicamente, os extremófilos são caracterizados por resistir ou mesmo crescer em um ambiente tido como extremo. Em algumas definições, organismos que resistem a ambientes extremos são chamados de extremo-tolerantes e aqueles que têm seu ótimo de metabolismo em um ambiente extremo são chamados de extremófilos, porém comumente o termo extremófilos é encontrado se referindo a ambos os casos. Já os organismos que têm como condições ótimas fora dos padrões considerados extremos, são chamados de mesófilos. A maioria dos extremófilos é de microrganismos pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria, entretanto, também há eucariotos considerados extremófilos como leveduras (Duarte, Nóbrega et al. 2012, Pulschen, Rodrigues et al. 2015) ou os tardígrados, bastante conhecidos.

Os ambientes extremos são aqueles que, permanentemente ou sazonalmente, possuem variantes físicas (como pressão, temperatura ou radiação) e geoquímicas (como atividade de água, pH, espécies reativas de oxigênio ou potencial redox) muito diferentes das tidas como amenas para a vida, dificultando a viabilidade da maioria dos organismos. Estes locais estão distribuídos pelo planeta, como as regiões polares, vulcânicas, desérticas, fundo de oceanos, fontes hidrotermais, lagos hipersalinos, lagoas ácidas ou alcalinas e outras regiões tidas como extremas para o homem (Rothschild and Mancinelli 2001).

Como exemplo, podemos citar o Deserto do Atacama (Chile) que possui grande variação de temperatura, baixo aporte de água e de matéria orgânica, alto fluxo de radiação ultravioleta, entre outros (Paulino-Lima, Azua-Bustos et al. 2013). Outro exemplo é a Antártica, que em geral tem seu ambiente tido como extremo em função da baixa temperatura (e conseqüentemente baixa disponibilidade de água líquida), baixa disponibilidade de matéria orgânica, entre outros, apresentada em algumas regiões (Cavicchioli 2002).

O Brasil, apesar de ser conhecido um país tropical com clima predominantemente ameno, apresenta uma grande diversidade de ecossistemas. São 53, além de 600 diferentes habitats (Sayre, Bow et al. 2008, Bass, Finer et al. 2010). Alguns ecossistemas que são permanentemente ou sazonalmente extremos devido a diferentes combinações de fatores climáticos, geológicos e físico-químicos. A rica biodiversidade brasileira tem um grande potencial, todavia ainda é muito pouco explorada para esse fim (Duarte, Nóbrega et al. 2012, Genuário, Vaz et al. 2019).

Um desses ambientes, é o mangue da costa brasileira. Esses ambientes são anaeróbicos com alta variabilidade de salinidade, podendo atingir altos valores (30-37% de NaCl). Esta região, também possui matéria orgânica em alta quantidade que pode ter função inibitória em alguns microrganismos, além da baixa quantidade de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio. Neste ambiente, alguns autores (Vazquez, Holguin et al. 2000, Soto-Ramírez, Sanchez-Porro et al. 2008, Sahoo and Dhal 2009) reportaram a presença de alguns organismos halófilos, extremófilos que vivem em ambientes com alta salinidade (Duarte, Nóbrega et al. 2012).

Um outro ambiente que podemos destacar é o Cerrado, a “Savana brasileira”, que ocupa quase 25% do país. Grande parte deste bioma está sujeita à grande incidência de radiação UV. O local também apresenta baixa disponibilidade de água devido ao índice de chuvas, com períodos de seca de 5-6 meses, além de outros fatores como queimadas naturais. Outro fator chave da região é o solo, 50% é classificado como Ferralsol, ou seja, um solo pobre pois apresenta baixa quantidade de nutrientes como P, K, Ca, S, Zn, B e Cu, mas que apresenta alta concentração de óxidos de Fe e Al. Além da falta de nutrientes, o solo é ácido (pH 4,8-5,1) com alta concentração de matéria orgânica. Todas essas características somadas à alta temperatura da região, fornecem a essa a classificação de extrema (Genuário, Vaz et al. 2019).

Além do exemplo citado, podemos destacar outros biomas como a Caatinga e regiões hipersalina do entorno da lagoa Araruama (RJ), fontes termais de Caldas Novas (GO), Nhecolândia (MS) e Baía de Sepetiba (RJ) (Duarte, Nóbrega et al. 2012).

A classificação dos organismos extremófilos é feita baseada no fator físico e/ou geoquímico fora do padrão mesófilo no qual o extremófilo tolera e/ou cresce, como é possível de se observar na tabela abaixo:

Quadro 1: Principais classes de organismos extremófilos.

<b>Classe de Extremófilo</b>	<b>Fator ambiental</b>	<b>Exemplo de Ambientes</b>	<b>Exemplo de microrganismo</b>
Hipertermófilo	Altíssima Temperatura (acima 80°C)	Fontes Termiais, Regiões com atividade vulcânica	<i>Pyrolobus fumarii</i>
Termófilo	Alta temperatura (Entre 60 °C e 80°C)	Fontes termiais, Regiões Vulcânicas	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Psicrófilo	Baixa Temperatura (abaixo 15° C)	Neve, Gelo, Lagos	<i>Pseudomonas syringae</i>
Acidófilo	Acidez (abaixo de pH 4)	Solos com altas concentrações de sulfato, rios ácidos	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
Halófilo	Alta Salinidade	Lagoas Salinas, Salares	<i>Halobacterium spp.</i>
Alcalófilo	Alcalinidade (Acima de pH 8)	Lagoas Alcalinas	<i>Clostridium paradoxum</i>
Radio-Tolerante	Radiação	Solo, Reatores Nucleares	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Barófilo (Piezófilo)	Alta Pressão	Fundo de Mar e Oceano	<i>Photobacterium sp.</i>
Oligotrófico	Nutrientes Escassos	Lagos Antárticos, Fundo de Oceano, Alpes	<i>Caulobacter spp.</i>
Toxitolerante	Produtos Químicos Tóxicos / Metais Tóxicos	Sítios de Despejo de Tóxicos, Áreas Industriais	<i>Rhodococcus sp.</i>
Xerófilo	Baixa Atividade de Água	Superfícies Rochosas, Locais Hipersalinos, Fluídos Orgânicos	<i>Xeromyces bisporus</i>

Fonte: baseado em Cavicchioli, 2002 e Rothschild, 2001.

Além de algumas espécies de organismos estarem bem adaptados para um ambiente extremo específico, temos algumas espécies que são adaptadas a diferentes condições extremas, os poli-extremófilos. Por exemplo, muitas espécies de cianobactérias foram isoladas de fontes termiais de Yellowstone à 70°C, em gelo e

neve na Antártica, em desertos, lagos hipersalinos, lagoas alcalinas e em regiões com alta quantidade de metais pesados (Paerl, Pinckney et al. 2000).

O cultivo de microrganismos de ambientes extremos representa um desafio aos pesquisadores, uma vez que as condições de cultivo em laboratório podem precisar simular o ambiente natural. Muitas vezes estes extremófilos requerem condições muito particulares de crescimento que são difíceis de se simular ou ainda são desconhecidas (Duarte, Nóbrega et al. 2012). Ressaltando que estima-se que apenas 1% dos microrganismos são cultiváveis em laboratório (Tiedje, Asuming-Brempong et al. 1999), presume-se que este número para extremófilos deve ser menor ainda.

Devido aos pontos citados acima, os extremófilos são utilizados em várias áreas de estudo. Um exemplo de pesquisa básica é o demonstrado em van de Vossenberg e colaboradores (1998), que estudaram membranas lipídicas de arqueias. Um exemplo da área aplicada, como na área biomédica, é o demonstrado por Jorge e colaboradores (2016) que estudaram metabólicos de extremófilos para serem utilizados no tratamento de doenças neuro-degenerativas.

## **2.2) Aplicações biotecnológicas de extremófilos**

A biotecnologia, segundo a ONU, é definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Este termo foi definido na Conferência de Meio Ambiente e Desenvolvimento de 1992 (Weiss 1992).

De um ponto de vista histórico, a biotecnologia em seu início, devido a sua abordagem disruptiva, levou a diversas controvérsias em questões éticas, comerciais e de segurança, que geraram uma rejeição por grande parte da população, sendo associada, nos anos 80, a um risco ambiental e social. Entretanto, com o desenvolvimento da área e de políticas de regulamentação, como os instituídos pela própria ONU, a visão popular vem se modificando. A entrega de vários benefícios provindos da área, como novos tratamentos médicos e melhores processos produtivos, associados aos riscos baixos devido a regulamentação, trouxeram uma consolidação da biotecnologia como área essencial para o desenvolvimento da sociedade contemporânea (Plein 1991, Olson 2020, Szuplewska, Kulpińska et al. 2020).

O impacto da biotecnologia na vida cotidiana é inevitável. Algumas aplicações são mais conhecidas pela maioria da população, como o processo dos biocombustíveis (Peng, Fu et al. 2020). Entretanto, existem numerosas outras aplicações que não são bem conhecidas fora dos círculos científico e industrial que afetam a vida de milhares de pessoas diariamente. Como alguns exemplos: no ramo alimentício, as comidas sem lactose devido ao uso de lactase no processo de fabricação; no ramo de roupas, as celulases que produzem os jeans com aspecto de “lavados na pedra”; ainda no ramo de roupas, as proteases e lipases que atuam nos produtos de limpeza. No ramo da saúde, há os medicamentos como a insulina, que foram produzidos em maior escala graças ao uso de ferramentas biotecnológicas (Coker 2016, Schröder, Burkhardt et al. 2020).

O estudo de extremófilos é importante nesse contexto, já que os processos industriais, em sua grande maioria, apresentam um ou mais fatores físicos e/ou químicos fora da faixa considerada ideal para a maioria dos microrganismos. Dessa maneira, a utilização de biotecnologia oriunda de estudos de extremófilos apresenta, em geral, um melhor rendimento produtivo comparado com os mesófilos. Essa produtividade pode ser aplicada em uma gama de produtos comerciais, como por exemplo na agricultura, mineração, nanotecnologia e outras áreas industriais (Shrestha, Chilkoor et al. 2018, Schröder, Burkhardt et al. 2020). Por exemplo, suas enzimas, nomeadas como extremozimas, são o ponto de maior estudo para aplicação atualmente (Dumorne, Córdova et al. 2017).

Extremozimas demonstraram possuir atividade e estabilidade em temperaturas extremas, baixa atividade de água e alta pressão hidrostática, o que são características interessantes para aplicações biotecnológicas, já que muitas reações químicas nos processos industriais, estão nas condições extremas citadas acima (Sellek and Chaudhuri 1999, Coker 2016). Um fator interessante, é que, antes do estudo e aplicações de extremozimas, tentava-se modificações químicas para melhorar o desempenho de enzimas mesófilas, ou seja, aumentar o grau de resistência aos padrões ótimos da reação químicas. Em resumo, tentavam transformar enzimas mesófilas em extremófilas (Coker 2016).

Um exemplo bem conhecido de enzima derivada de extremófilos em biotecnologia é o da Taq polimerase, a enzima no cerne da reação em cadeia da polimerase (PCR) que revolucionou o cenário científico da época em que foi

descoberta e que foi isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* (Rothschild and Mancinelli 2001).

Atualmente, diversos produtos no mercado utilizam no processo de produção alguma dessas enzimas. Estima-se que mais de 3000 extremozimas já estão sendo utilizadas na indústria. Entretanto ainda existe uma enorme demanda por mais produtos oriundos desses organismos extremófilos. O aumento citado, se deve à diminuição de gasto no processo com a otimização das operações necessárias para a obtenção do produto final. Isto ocorre pois se reduz a quantidade de subprodutos de difícil tratamento no processo total. Vale ressaltar que toda essa difusão demonstra como esses produtos biotecnológicos são bem aceitos no mercado, e que empresas com selo verde têm maior valor de mercado, pois apresentam um maior branding (Dumorne, Córdova et al. 2017).

A importância do estudo de extremófilos neste contexto não é recente, como pode ser observado pela criação do projeto 'Extremophiles as Cell Factories' entre 1996-1999 pela Comissão Europeia, ocorrendo incentivos na área desde 1982, resultando na transferência de tecnologias para empresas (Zeikus, Vieille et al. 1998).

Apesar das extremozimas atualmente estarem em alta, a aplicabilidade de extremófilos não se restringe somente às suas enzimas. Aplicações utilizando as células inteiras, como as propostas de uso para a transformação de resíduos recalcitrantes de indústria em baterias via sistemas eletroquímicos têm sido mais comuns atualmente (Shrestha, Chilkoor et al. 2018). Uma aplicação interessante é o desenvolvimento do NGIB, do inglês *Next Generation Industrial Biotechnology*, que em tradução livre significa Nova Geração da Biotecnologia Industrial (Wang, Yin et al. 2014).

O NGIB, em sua essência, é uma proposta de microrganismo extremófilo geneticamente modificado que promove alguns avanços nas metodologias utilizadas na biotecnologia em escala industrial e laboratorial. Atualmente, as grandes dificuldades na biotecnologia são atribuídas a fragilidade de contaminação dos microrganismos modelos usualmente utilizados. Desta maneira, uma abordagem para esse problema seria a utilização de um organismo modelo capaz de prosperar em um meio de cultura com características químicas e físicas tidas como extremas, com o objetivo de reduzir a contaminação. O meio de cultura pode contar com diversos tipos de compostos químicos como metais tóxicos, metano, ácidos graxos e diversas outras substâncias, além de estar em condições físico-químicas extremas

visando uma seleção do crescimento. Desta maneira, os organismos extremófilos se encaixam neste contexto. O desenvolvimento de um modelo extremófilo permitiria o bioprocessamento em materiais não estéreis, podendo utilizar cerâmicas, cimento ou plástico de maneira contínua, o que levaria a uma economia de energia elétrica, água e substrato, levando também a um procedimento operacional conveniente, segundo os autores (Chen and Jiang 2018).

Outros contextos em que os extremófilos são aplicados é a Geomicrobiologia, em especial no processo de biomineração. Isso ocorre porque alguns microrganismos apresentam metabolismo e resistência necessários para atuar nessas aplicações biotecnológicas, uma vez que os ambientes em que ocorrem esses processos apresentam com frequência alta toxicidade, acidez ou falta de matéria orgânica como nutrientes (Srivastava and Srivastava 2018). Essas características os projetam também como bons organismos modelos para a Astrobiologia (Cavicchioli 2002). Esses conceitos serão apresentados nos subtópicos seguintes.

Levando em consideração os tópicos abordados acima, temos que o estudo de organismos extremófilos pode gerar grande conhecimento sobre a diversidade ecológica, além de fornecer oportunidades para aplicações em contexto biotecnológico.

### **1.3.1) Geomicrobiologia**

A Geomicrobiologia pode ser definida como o estudo do papel dos microrganismos em processos geológicos. Microrganismos desenvolvem um papel chave nas diversas atividades geológicas associadas a biosfera como biotransformações, ciclos biogeoquímicos, decomposição e formação do solo, entre outros, sendo que o ponto central do processo é a transformação química de minerais e metais. Estes organismos tem uma variedade de características que podem afetar a espécie, biodisponibilidade, toxicidade e mobilidade de um metal e a formação, dissolução e deterioração de um mineral (Gadd 2010, Gadd and Raven 2010).

A Geomicrobiologia, ou Biogeoquímica, é uma área interdisciplinar, uma vez que necessita de conhecimento em física, química e biologia para se entender a interação biológica com a estrutura geológica. Esta área começou a crescer quando pesquisadores nas áreas de geologia, mineralogia e geoquímica começaram a

perceber que os microrganismos tinham grande influência na dinâmica geológica (Warren and Haack 2001, Uroz, Calvaruso et al. 2009). Isto, junto com a descoberta que alguns minerais podem ser biogênicos, como carbonatos de cálcio, silicatos e óxidos ou sulfetos de ferro, etc (Gadd 2010).

Alguns exemplos de grupos importantes para a geomicrobiologia que estão diretamente ligados à transformações geoquímicas são os oxirredutores de enxofre e ferro, principalmente bactérias que podem degradar silicatos, carbonatos, fosfatos além de outros minerais, de forma direta ou indireta, devido ao seu metabolismo (Gadd and Raven 2010). A importância desse grupo pode ser vista na nutrição de plantas. Os microrganismos que habitam a rizosfera alteram a disponibilidade de fosfato e circulação de metais (Amundson, Richter et al. 2007). No solo, o metabolismo microbiano gera mobilização e transformação metálica, processos que estão intimamente ligados às fases iniciais de formação do solo e que influenciam todo o bioma que vai se formar naquele local (Purvis and Pawlik-Skowrońska 2008).

Como visto acima, metais e íons metálicos são componentes naturais do solo, parte deles está contida na forma mineral enquanto outra parte está biodisponível para plantas e microrganismos (Gadd 2010), como compostos organo-metálicos.

Entender como os metais são modificados pelos microrganismos é altamente importante, já que esse conhecimento pode ser aplicado nos mais diversos ramos comerciais. Os metais constituem cerca de 75% dos elementos conhecidos e são amplamente distribuídos na biosfera, além de serem vitais para a nossa sociedade. Entretanto, com o aumento da utilização dos metais pela sociedade, levou também ao descarte indevido desses materiais, transformando-o muitas vezes em contaminantes. Essas acumulações de metais em habitats aquáticos e terrestres são associadas com diversas alterações na biota e na saúde humana (Sparks 2005).

Os metais têm como fontes naturais rochas e minerais. Entretanto por ações antropogênicas, acabam sendo dispersados para outras regiões, gerando contaminações. Como exemplos de ações humanas que geram poluição temos a metalurgia, produção energética, eletrônicos, mineração resíduos de mineração e etc (Landa 2005). Popularmente, existem metais considerados poluentes (Cr, Cu, Hg, Tl e outros), enquanto outros metais são considerados essenciais para vida (Na, K, Fe, Cu, Co, Mn e outros) (Gadd 2004, Sparks 2005). Esse viés popular é errôneo, uma vez que mesmo os metais considerados essenciais para a vida podem ser tóxicos em alta quantidade assim como existem metais que podem ser essenciais ou tóxicos,

dependendo do estado de oxidação em que se encontra. Por exemplo, o Cr(III) é um micronutriente importante enquanto o Cr(VI) é bastante tóxico..

Apesar da toxicidade de alguns metais, diversos microrganismos conseguem crescer e se desenvolver em locais onde há contaminação. Estima-se que em todas as localidades tóxicas, tenha pelo menos um toxicotolerante, extremófilos que vive ou sobrevive em ambientes com compostos tóxicos, capaz de crescer nesse ambiente. Os mecanismos de resistência podem ser gerados pela mobilização e transformação química dos metais, além de mecanismos celulares como bombas de efluxo, compartimentalização celular e estruturas celulares que aprisionam ou impedem o trânsito livre dos metais (Mowll and Gadd 1984, Gadd 2004, Gadd 2005).

Muitos microrganismos que biotransformam metais e minerais têm um grande potencial no tratamento de poluição ambiental e alguns processos comerciais. Conhecimento detalhado sobre as reações envolvidas nessas transformações podem contribuir para a recuperação de áreas contaminadas (Gadd 2004, Gadd 2005).

As mudanças causadas por microrganismos em minerais e metais podem ter consequências benéficas ou maléficas para a sociedade humana. Entender a interação e as modificações causadas no sistema geoquímico, temos uma gama de possibilidades de aplicações desse conhecimento em diversas áreas da biotecnologia (Gadd 2010). Algumas dessas aplicações serão exemplificadas nos próximos parágrafos.

Uma área nova no contexto da geomicrobiologia, que demonstra a importância da pesquisa na área é a biomineralização aplicada à construção civil. O desenvolvimento da construção civil na era moderna trouxe avanços para a sociedade e, atualmente, é uma das áreas com grande valor econômico. No entanto, há um custo: estima-se que cerca de 40% do consumo de energia e 20% da emissão de gases do efeito estufa são gerados na construção civil. Por preocupação ambiental e buscando a sustentabilidade, começou-se a buscar fontes alternativas para materiais cruciais como o cimento e o concreto. Tendo isto em vista, a biomineralização surgiu como uma alternativa para se obter estes materiais, ganhando o nome de biocimentização. Estudos em laboratório demonstram que o uso de microrganismos, como *Bacillus sp.* CT5 ou *Shewanella sp.*, para a produção desses materiais gera benefícios estruturais e ecológicos. Como ecológicos, temos a redução da emissão dos gases do efeito estufa e a diminuição da energia necessária no processo de queima, por exemplo. No quesito estrutural o material apresenta menor porosidade,

demonstra uma maior resistência à força compressiva além de gerar uma maior durabilidade da estrutura. Esta tecnologia pode ser aplicada de diversas maneiras, como na produção de novas estruturas e manutenção de estruturas já existentes. Existem imensas possibilidades para essa área que ainda é nova, como otimizações de performance estrutural, econômica e sustentabilidade ambiental (Reddy 2013, Achal, Mukherjee et al. 2015).

Ainda na área de construções humanas, podemos destacar os estudos da influência dos microrganismos em construções e artefatos humanos feitas de rochas. Nesse caso, a atividade biológica em construções e artefatos pode causar danos em prédios ou esculturas antigas. A manutenção dessas estruturas construídas pelo homem visa uma questão histórica e de segurança, uma vez que alterações na composição de determinada estrutura pode afetar sua durabilidade, além da importância histórica de determinadas construções. Essa vertente visa entender como a colonização, biodeterioração e alterações de cor ocorrem, buscando assim maneiras preventivas de evitar danos e melhores metodologias de restauração. Existe uma ampla variedade de microrganismos que vêm sendo identificados que habitam estes locais, sendo a comunidade com maior influência são os quimiolitotróficos fúngicos (Gadd 2017).

Outra área que mostra a aplicabilidade dos estudos de como os microrganismos interagem com o meio geológico é a biomineração, que é uma abordagem da mineração que usa microrganismos para retirar de regolitos (camada de sedimentos resultantes da fragmentação de rochas subjacentes) matéria prima útil e de valor econômico. Essa tecnologia é a aplicação da capacidade de alguns microrganismos de extrair alguns elementos, como por exemplo ferro, cobre ou manganês, de rochas. As vantagens do processo tecnológico utilizando bactérias são compatíveis com os seguintes requerimentos de aplicação (Watling 2006):

- Investimento de capital moderado, com baixo custo de operação;
- Recuperação de metais em grau apropriado de minérios e restos de materiais contendo baixa quantidade de metais;
- Uso de poucos solventes tóxicos, se comparado a hidrometalurgia, e geração de poucos poluentes com baixo consumo energético, se comparado à pirometalurgia;
- Necessidade de equipamentos básicos e simples de serem utilizados.

O mecanismo de ação, em geral, se deve à produção de compostos inorgânicos ou ácidos que fazem com que o cátion do elemento desejado fique

solúvel. Este processo já é utilizado, e nos últimos anos começou a se aumentar a aplicação dessa metodologia em indústrias. Por exemplo, 20-25% do cobre é produzido utilizando tal método. Biomineração é uma tecnologia ecológica e que apresenta benefícios econômicos comparados com as tradicionais hidrometalurgia e pirometalurgia como a quantidade de energia elétrica e compostos químicos necessários. No caso dos compostos químicos de maneira geral, alguns processos das metalurgias tradicionais necessitam de compostos tóxicos. Além disso podemos adicionar a alta produção de subprodutos poluentes, o que não ocorre com a prática da biomineração. Apesar de todas essas vantagens, esse processo ainda apresenta muitas vezes uma baixa cinética e rendimento inferiores aos processos tradicionais, sendo esses os maiores entraves para uma ampla aplicação, uma vez que se estima que o processo biológico precise ter 20% de vantagem sobre o tradicional para ser aplicado. Adicionalmente, é necessário fazer um forte controle ecológico para que a utilização dos microrganismos estranhos àquela região não afetem gravemente o sistema ecológico já presente ali (Watling 2006, Loudon, Nicholson et al. 2017, Pathak, Morrison et al. 2017).

O desenvolvimento dessa tecnologia está em crescimento, tanto que está sendo cotada para o uso na exploração espacial (Loudon, Nicholson et al. 2017). O tema será discutido mais à frente na seção de Astrobiologia.

Tendo em vista os pontos destacados, temos que o estudo da interação dos microrganismos com sistemas geológicos nos fornecem conhecimentos que nos ajudam a entender desde questões básicas como a formação de algumas estruturas geológicas e suas dinâmicas, como nos fornece instrumentos altamente aplicáveis em diversas áreas-chave da nossa atual sociedade, como a construção civil e a manutenção de marcos históricos, além do desenvolvimento de metodologias aplicáveis como a biomineração para a geração de capital ou recuperação de locais de interesse.

### **1.3.2) Astrobiologia e exploração espacial**

A Astrobiologia é a área do conhecimento dedicada a entender origem, evolução, distribuição e futuro da vida na Terra e a possibilidade de existir fora dela (Cockell 2020).

Sua origem remete a reestruturação do programa de Exobiologia da NASA (do inglês *National Aeronautics and Space Administration* – Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço, em tradução livre), agência espacial americana, que surgiu no início da exploração espacial e com missões a outros planetas impulsionada pela corrida espacial ocorrida na Guerra Fria. Entre outros objetivos, a NASA buscava entender o efeito do ambiente espacial na vida e proteger a Terra de eventuais formas de vida existente em outros ambientes, metas que incluíam a busca por indícios de vida atual ou passada em planetas como Marte. O processo de desenvolvimento do programa de Astrobiologia teve como ponto crucial a criação do Instituto de Astrobiologia da NASA (NAI) em 1998, um dos pioneiros no tema (Blumberg 2003).

Isto ocorreu pois os cientistas da NASA entenderam que se fazia necessário a melhor compreensão da vida na Terra, avaliando suas características e limites para utilizá-la como modelo para buscar vida extraterrestre, tendo em vista que os únicos exemplos de seres vivos que se tem conhecimento são terráqueos. Por exemplo, quando se pensa na possibilidade de vida em outro planeta, uma das perguntas que surge é sobre sua origem. É necessário, ainda, conhecermos bem o cenário e as condições para o surgimento da vida na Terra, antes de podermos extrapolar o mesmo evento para outros planetas (Galante, Silva et al. 2016).

A partir desta reformulação ocorreu a expansão do seu escopo visando entender a vida na Terra por um ponto de vista mais amplo, entendendo sua conexão com o sistema planetário e com o ambiente astrofísico. Seu escopo pode ser definido com base em três perguntas fundamentais: “Como a vida surge e se desenvolve em um planeta?” “Existe vida em fora da Terra?” e “Qual é o futuro da vida na Terra e em outros lugares?” (Des Marais, Nuth III et al. 2008).

O estudo dessas questões básicas leva a essa área do conhecimento utilizar ferramentas da interdisciplinaridade e multidisciplinariedade, pois é necessário conhecimento em diversas áreas para se atingir as respostas. Como exemplo podemos citar o entendimento do clima de um exoplaneta candidato a abrigar vida, que é um fator importante para o desenvolvimento de seres vivos. Nesse estudo se faz-se necessária interação das áreas de astrofísica, geologia, química e meteorologia para se definir as condições do clima no planeta e então se avaliar a possibilidade de um organismo conseguir viver nessas condições ambientais (Galante, Silva et al. 2016).

Abordando a questão da possibilidade de vida em locais extraterrestres, os microrganismos extremófilos são excelentes modelos de estudo no campo da astrobiologia, por terem estratégias para viver em ambientes extremos, ajudam a definir os limites físicos e químicos em que a vida como conhecemos é capaz de funcionar, ampliando planetas e luas que possam ser considerados habitáveis (capazes de suportar a vida como a conhecemos). Uma vez que não se espera que esses ambientes extraterrestres sejam amenos para a vida, o estudo de organismos que vivem em ambientes extremos é fundamental (Rothschild and Mancinelli 2001, Cavicchioli 2002). Além disso, é um consenso geral que a Terra primitiva tinha condições extremas quando a vida se originou (Horneck and Rettberg 2007) e o estudo de extremófilos pode nos ajudar a entender como eram as primeiras formas de vida e como evoluíram. Nesse contexto, nosso planeta possui ambientes que são análogos a alguns locais extraterrestres, como por exemplo regiões polares, sítios geotermiais, locais áridos, lugares com baixo ou alto pH, sítios com alta pressão ou salinidade, entre outros (Duarte, Nóbrega et al. 2012).

Um exemplo interessante gerado pelo estudo dos extremófilos, é a hipótese de que a vida na Terra poderia ter sido originada por um inóculo e subsequente colonização da superfície terrestre por microrganismos extraterrestres, teoria denominada da panspermia (Morell 1996, Davies 1998). Essa hipótese se baseia nas características de Archaeas hipertermófilas e autotróficas, que suportam altas temperaturas e conseguem sintetizar compostos orgânicos, como *Methanococcus jannaschii*, poderiam suportar viagens espaciais desde que aprisionadas no interior dos meteoritos onde a temperatura muitas vezes não ultrapassa 40°C, além de fornecer a proteção à radiação Ultravioleta (UV) e com os compostos inorgânicos essenciais para suas sínteses autotróficas (Weiss, Kirschvink et al. 2000). Um empecilho para essa teoria seria o tempo de viagem do meteorito entre planetas, porém mostrou-se que alguns meteoritos chegaram à fazer esse percurso em menos de 10 anos (Weiss, Kirschvink et al. 2000) além de que alguns microrganismos podem entrar em um estado de latência, como os esporos de *Bacillus* que foram reativados após 25-45 milhões de anos (Cano and Borucki 1995). Além desses fatores, demonstrou-se que os microrganismos podem suportar as forças geradas pelo impacto de ejeção do planeta ou reentrada (Mastrapa, Glanzberg et al. 2001). Todos os pontos citados acima fazem com que a hipótese da panspermia seja plausível,

abrindo assim um campo de estudo ainda não muito bem explorado entre a interação de meteoritos e microrganismos (Cavicchioli 2002).

Alguns dos possíveis candidatos para vida em ambientes extraterrestres, e sobretudo onde a fotossíntese não é tão eficiente, são os quimiolitotróficos extremófilos, especialmente redutores de enxofre. Traços de enxofre foram encontrados em Europa, uma das luas de Júpiter, detectada pela sonda Galileo, sendo de fonte endógena, muito possivelmente pela atividade vulcânica da lua Io (Seckbach and Chela-Flores 2007). Além disso existe um potencial oceano abaixo da superfície congelada de Europa, conforme detectado pela sonda Cassini, e uma temperatura possivelmente capaz de sustentar a vida que conhecemos. Essas características de Europa levam aos quimiolitotróficos redutores de enxofre, serem bons candidatos a organismos que poderiam viver nesse local (Seckbach and Chela-Flores 2007, Altair, de Avellar et al. 2018).

Os estudos de microrganismos, entretanto, não servem apenas para modelo de vida em ambientes extraterrestre. Estes seres podem ser utilizados em diversos processos tecnológicos, como acontece aqui na Terra, que estão no cerne de desafios para operações em plataformas orbitais e postos avançados em outros planetas (Horneck, Klaus et al. 2010, Moissl-Eichinger, Cockell et al. 2016). Como exemplo, microrganismos podem ser utilizados para executar ou ajudar em uma ampla gama de tarefas complexas como extração de minerais de rochas extraterrestres, produção de alimento e oxigênio para um sistema de suporte a vida, reciclagem de lixo, produção de biopolímeros e promover o crescimento de plantas modificando as condições do solo (Cockell 2010).

A importância de se conseguir recursos oriundos do próprio ambiente espacial, seja de asteroides e meteoroides, seja do próprio planeta que se irá explorar, em postos avançados, é a melhor maneira a longo prazo para a manutenção desta instalação, pois reduz a massa, energia e custo de transporte de materiais indispensáveis além de criar uma autossuficiência (Montague, McArthur IV et al. 2012).

Uma atividade bem discutida é o uso da biomineração, que, se puder ser aplicada em solo extraterrestre, fornece a possibilidade de se utilizar os regolitos encontrados em Marte ou outro corpo, como fontes de componentes para a manutenção humana e de recursos. Regolitos como os basaltos encontrados em Marte, contêm cátions bioessenciais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^{+}$  e  $\text{Na}^{+}$ , além de

micronutrientes como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Raafat, Burnett et al. 2013). Asteroides também são conhecidos por conterem recursos úteis, como ferro, níquel e alumínio ou mesmo elementos extremamente raros na Terra, como platina, ródio e irídio e isótopos não encontrados na Terra como o  $^3\text{He}$  que são interessantes para a aplicação de biomineração. Interações microbianas podem ser aplicadas também visando controlar e prevenir a movimentação de regolitos e ser utilizada como precursor para a formação do solo (Loudon, Nicholson et al. 2017). Diversos estudos (González-Toril, Martínez-Frías et al. 2005, Gronstal, Pearson et al. 2009, Gonçalves Silva, Yamassaki de Almeida et al. 2018), têm indicado a possibilidade de crescimento de microrganismos em meteoritos.

A identificação desses regolitos é passo crucial para o avanço da exploração espacial e, visando este objetivo, a NASA e a ESA veem desenvolvendo diversos equipamentos portáteis e miniaturizados de medida de minerais, como equipamentos de fluorescência de raios X, de difração de raios X, de espectroscopia de emissão atômica induzida por laser (Ex: LIBS), espectrômetros no infravermelho e Raman. Por exemplo, um espectrômetro Raman miniaturizado está sendo preparado para ser colocado como instrumentação analítica nos próximos robôs de exploração espacial em Marte, visando identificar minerais dessas matrizes rochosas extraterrestres e também para se procurar matéria orgânica, sinais de vida ou de resquícios de vida, as chamadas bioassinaturas (Das and Hendry 2011).

A técnica de espectroscopia Raman fornece informações sobre os modos vibracionais de uma molécula e, indiretamente, sobre a estrutura molecular. Dependendo do sistema, pode fornecer também estimativa da cristalinidade, informações básicas de simetria estrutural e indícios de mudança de composição elementar. O uso dessa técnica experimental tem grande potencial no ramo da astrobiologia, pela gama de informações fornecidas em cada análise, tem boa sensibilidade na identificação de compostos puros ou misturas, podendo identificar compostos chave como minerais de interesse para exploração ou biomarcadores. Outra vantagem é que não necessita de preparação de amostras (Pérez and Martinez-Frias 2006, Villar and Edwards 2006).

Pelo lado financeiro, apesar de parecer uma aplicação longínqua e ainda não existir nenhum dado econômico sobre a exploração espacial usando biomineração, o movimento do mercado econômico sobre o contexto espacial está em alta. Muitas especulações são veiculadas na mídia além de algumas empresas e agências

governamentais tomando a frente para desenvolver tecnologia nesse nicho de mercado que ainda está nos primeiros passos.

Um exemplo que demonstra o interesse por parte de empresas privadas na exploração espacial, é que 3 empresas inicialmente começaram a reunir recursos e tecnologias visando uma futura empreitada. As empresas são SpaceX, Boeing e Blue Origin, que possuem programas próprios para chegar até Marte. As empresas citadas são as primeiras empresas privadas que começaram a reunir recursos e tecnologias visando uma futura exploração espacial (Payão 2017). Depois dessas iniciativas, outras organizações começaram a ter interesse ou foram criadas, como é o caso da *Breakthrough Prize Foundation*, uma organização fundada pelo bilionário russo Yuri Milner. A ideia da instituição é chegar até Encélado, uma das luas Saturno. Esse interesse surgiu após o sucesso da missão Cassini que estudou esta lua e detectou um oceano de água em Encélado (Farinaccio 2017).

Adicionalmente, conhecer o metabolismo dos extremófilos e as implicações geradas no ambiente, geram a possibilidade saber como procurar sinais de vida nesses ambientes, através das chamadas bioassinaturas (Parnell, Cullen et al. 2007). Bioassinaturas ou Biomarcadores, são metabólitos ou outras substâncias químicas de natureza química orgânica ou inorgânica que podem identificar um tipo particular de organismo vivo bem como fósseis moleculares derivados da decomposição de um organismo (Summons, Albrecht et al. 2008). Essa hipótese levando-se em conta também outros fatores para a vida como temperatura, pressão e etc.

O ponto central para uma molécula ser considerada um biomarcador é não ter sido gerada por uma fonte abiótica. Para se avaliar sua origem utilizam-se medidas como isomeria, fracionamento isotópico, entre outros. No entanto, ainda não existe um protocolo padrão para se avaliar a origem de uma molécula. Como esta área exige muita precisão, utilizam-se uma abordagem multitécnicas em paralelo com outras estratégias científicas visando o entendimento da molécula e o ambiente geológico em foi encontrada. Apesar de diversos estudos na área, incluindo análises metabolômicas para a identificação de compostos químicos com potencial, apenas se propõem biomarcadores, não existindo um único bem estabelecido na literatura (Cady, Farmer et al. 2003, Seyler, Kujawinski et al. 2020).

Tendo em vista as considerações acima, é possível ver que o estudo do metabolismo de organismos extremófilos no contexto da astrobiologia fornece modelos de organismos para busca de vida extraterrestre. Olhando para um viés mais

aplicável, temos a proposta de uso destes organismos no contexto de exploração espacial, tanto para manter uma base humana fora da Terra quanto para a obtenção de recursos economicamente interessantes, como metais.

### **2.3) *Acidithiobacillus ferrooxidans***

O microrganismo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, antigamente nomeado como *Thiobacillus ferrooxidans*, é uma bactéria gram negativa da classe  $\gamma$ -proteobacteria, acidófila, toxicotolerante, fixadora de nitrogênio, autotrófica (fixadora de carbono) e que não apresenta processo de esporulação. Morfologicamente apresenta forma de bacilo, 0,5 - 0,6  $\mu\text{m}$  de largura e 1,0 – 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, um flagelo que lhe fornece motilidade e em geral apresenta-se individualmente ou em pares, dificilmente em cadeias. Comumente apresenta em suas culturas EPS (do inglês *Extracellular Polymeric Substances* em tradução livre Substância Extracelular Polimérica), geralmente lipopolisacarídeos, que têm função de adesão ao substrato, entre outras. Seu ótimo de crescimento é 30°C e pH = 2, sendo que esses valores podem variar conforme a cepa (Gehrke, Hallmann et al. 2001, Daoud and Karamanev 2006, Valdés, Pedroso et al. 2008).

Está bactéria é comumente encontrada em diversos ambientes naturais onde existe grande quantidade de compostos de enxofre e muitas vezes onde há ferro, como, por exemplo, áreas de mineração, drenagem ácida de minas, habitats marinhos, lagos ácidos e centros de tratamento de resíduos. Estudos ecológicos são dificultados pelos métodos de cultivo que não conseguem fornecer dados, tanto qualitativos quanto quantitativos, que permitem selecionar isolados e identificar cepas. Isto é bem evidente pelo seu difícil cultivo em meios sólidos, onde seu metabolismo autotrófico e produção de ácido sulfúrico atrapalham qualquer tipo de visualização eficiente e manutenção do meio (Bergamo, Novo et al. 2004).

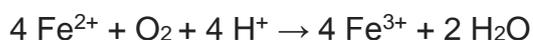
Alguns estudos reportam que em análises biomoleculares, culturas que se acreditavam ter apenas um isolado havia uma mistura de cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* com características filogenéticas diferentes (Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009). Diferentes cepas têm diferenças relevantes, como por exemplo resistência a metais tóxicos, o que pode influenciar a viabilização de propostas de aplicação biotecnológica (Cabrera, Gomez et al. 2005).

Esta bactéria, além de conseguir viver em ambientes com características extremas (como por exemplo o baixo aporte de matéria orgânica), ganha destaque por ser quimiolitotrófica, ou seja, usa a energia química de compostos inorgânicos presentes na litosfera ou dissolvidos na água, tornando-os interessantes para diferentes estudos, sendo um dos modelos mais estudados na literatura (Madigan, Martinko et al. 2016).

Este quimiolitotrófico obtém ATP a partir da oxidação de cátions  $\text{Fe}^{2+}$  ou de espécimes com S (na forma de sulfeto,  $\text{S}^{2-}$ , ou enxofre elementar,  $\text{S}^0$ ) para a forma mais oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$ ) com a liberação de elétrons, assim disponibilizando potencial redutor para a redução de oxigênio molecular. A transferência desses elétrons fornece a energia necessária para a fosforilação oxidativa de forma a permitir a produção do ATP a partir do ADP e de poder redutor via NADH (Lundgren and Silver 1980, Appia-Ayme, Quatrini et al. 2006).

Desses esses dois casos, o enxofre é mais energético, pois enquanto o processo envolvendo ferro fornece apenas 1 elétron, de  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , o enxofre pode partir do estados -2 (ex:  $\text{S}^{2-}$ ) ou 0 (ex: S) e ser oxidado até +6 (ex:  $\text{SO}_4^{2-}$ ), de forma que a oxidação de sulfeto para sulfato pode gerar 8 elétrons e de enxofre elementar para sulfato 6 elétrons (Madigan, Martinko et al. 2016).

A oxidação do íon ferroso segue a seguinte reação bioquímica global em condições aeróbicas, simplificada (Daoud and Karamanev 2006):

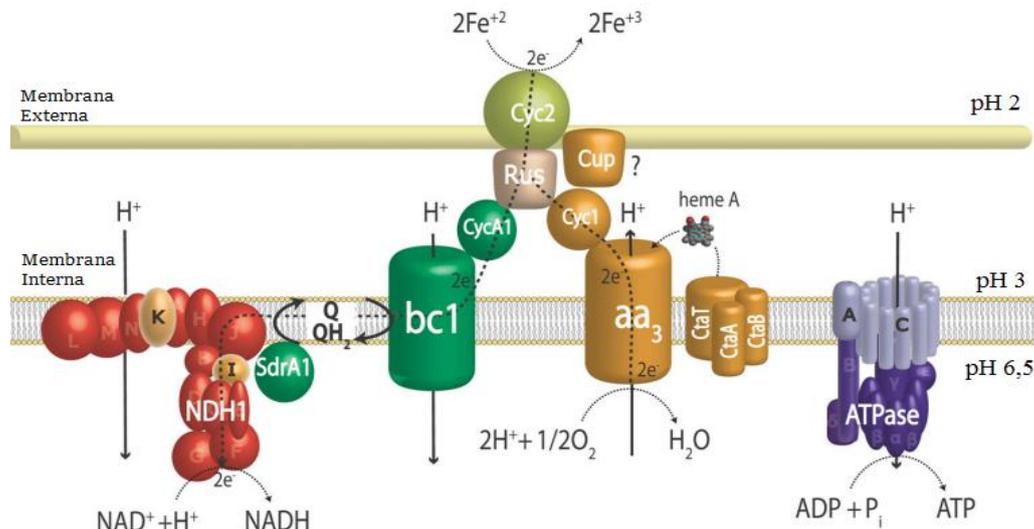


Modelos que explicam como ocorre bioquimicamente o processo de oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  e espécimes de enxofre até a obtenção de ATP ou NADH, têm sido propostos, sendo que a cascata responsável pelo primeiro está mais bem descrita e a do segundo é ainda menos conhecida (Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009, Madigan, Martinko et al. 2016).

Atualmente, o modelo da cascata de oxidação que é gerada pela oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  melhor aceita, pode gerar ATP ou NADH ao seu final. Sendo que a cascata que leva à produção de NADH é contra o gradiente de potencial redox uma vez que a dupla  $\text{Fe(II)/Fe(III)}$  apresenta potencial redox 0,7 V e a dupla  $\text{NAD(P)/NAD(P)H}$  apresenta potencial -0,3 V. Propõe-se que essa cascata utiliza energia da força

elétron/próton motriz para ocorrer. Este modelo pode ser visualizado na figura 1, a seguir:

Figura 1: Modelo de oxidação de Fe II em *A. ferrooxidans* ATCC23270. Proteínas estão indicadas com o nome do gene ou operon que as codificam, com exceção da ATPase e complexo NADH, sendo este último com o nome NDH1.



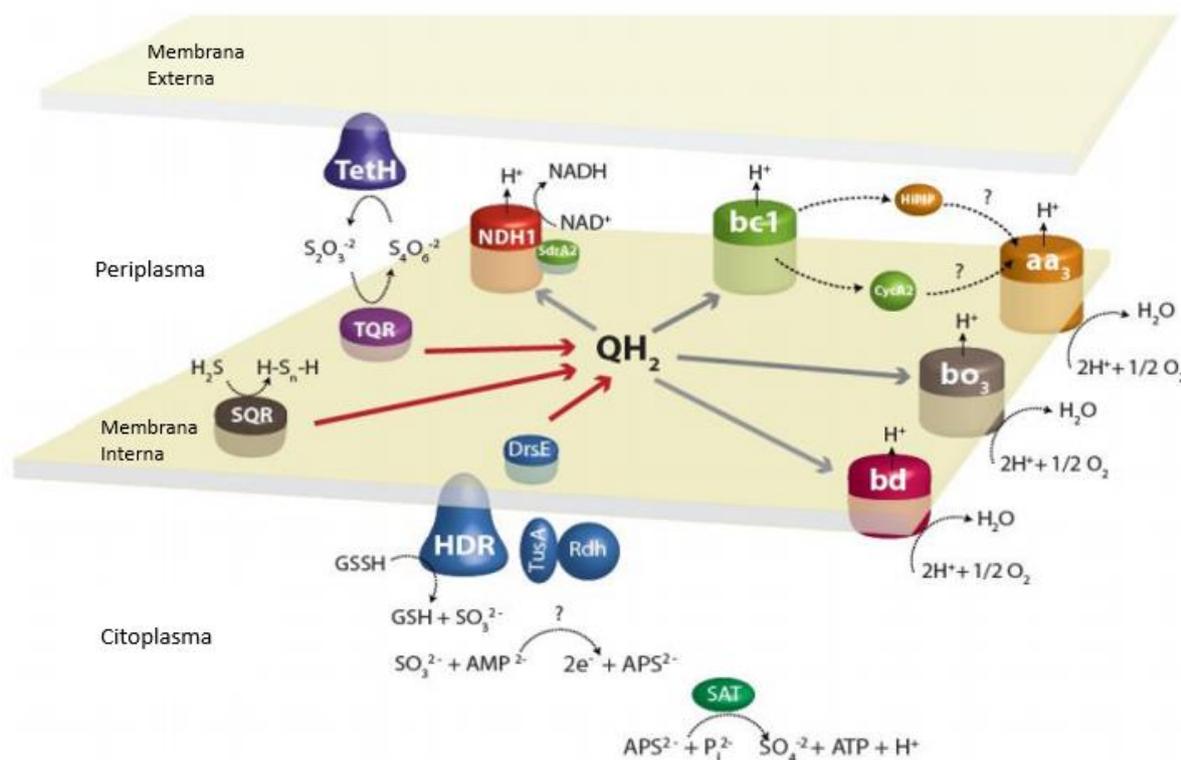
Fonte: Modificada a partir de Quatrini et al., 2009; Liu et al., 2011.

A cascata se inicia com a oxidação do Fe<sup>2+</sup> pela proteína Citocromo C codificada e representada por Cyc2, em seguida os elétrons vão para Rusticianina codificada e representada por Rus. Esse ponto é a bifurcação do sistema, a regulação de qual será o caminho a ser seguido pelo elétron é feita pelo balanço de disponibilidade de NADH e ATP na célula, ainda não bem descrito. Na cascata que leva a geração de ATP, o elétron é transferido para Citocromo C<sub>4</sub> codificado e representado por Cyc1 que reduz a proteína terminal da membrana citoplasmática Citocromo oxidase tipo aa<sub>3</sub>, representada como aa<sub>3</sub>, que leva o elétron ao acceptor final O<sub>2</sub> com o bombeamento de um próton H<sup>+</sup> para o periplasma. Por fim o ATP é sintetizado via a translocação do próton para o citoplasma. A via que leva à produção de NADH começa com a transferência do elétron para Diheme Citocromo C<sub>4</sub> codificada e representada por cycA1, que reduz o complexo Citocromo bc<sub>1</sub> (Complexo III, ubiquinol-citocromo c redutase) codificada por bc1. Por fim, este complexo transfere via quinol (QH<sub>2</sub>) para o complexo de NADH que promove a redução do NAD<sup>+</sup>. Nestas duas últimas etapas ocorre o bombeamento de H<sup>+</sup> para o citoplasma,

e especula-se isto seja responsável pela transferência do elétron contra o potencial redox (Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009, Madigan, Martinko et al. 2016).

Vale ressaltar, apesar da diferença de pH no citoplasma (pH = 6,5) e do periplasma (pH = 3), essa “força próton motriz natural” não desencadeia a produção de ATP, não se sabe ainda como é inibida produção de ATP por esse possível sistema (Madigan, Martinko et al. 2016).

Figura 2: Modelo de oxidação de espécimes de enxofre por *Acidithiobacillus ferrooxidans* 23270. Abreviações estão contidas no texto.



Fonte: Quatrini et al., 2009 modificada

O modelo de cascata que utiliza espécimes de enxofre em *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ilustrado na figura 2, ainda não é muito bem elucidado. O modelo que se propõe tem como ponto central Quinolona, representada por  $QH_2$ , que recebe os elétrons provenientes de proteínas da membrana citoplasmática que oxidam os diferentes espécimes de enxofre. Os complexos proteicos que oxidam espécimes de enxofre propostas no modelo são 3. A proteína Sulfeto Quinona Redutase, representada por SQR, oxida  $H_2S$  enquanto que o Tiosulfato Quinona Redutase, representada por TQR, oxida tiosulfato, o produto dessa oxidação é transformado novamente em tiosulfato via proteína Tetrionato Redutase, representada por TetH

e que está ancorada na membrana externa. No caso da Heterodisulfeto redutase (HDR), ocorre a oxidação da Glutathione obtido pela conversão de enxofre insolúvel, através da cascata de Enxofre Transferase (DsrE, TusA e Rhd). Ponto interessante da oxidação do enxofre inorgânico, é que o produto gerado pela HDR passa por uma reação que leva a formação de Adenosina-5'-fosfosulfato (APS), ainda não se sabe a enzima responsável pela reação, que é utilizada como substrato da ATP sulfúrilase (SAT), gerando ATP ao fim. Após QH<sub>2</sub> receber os elétrons, os transfere diretamente para complexos oxidases terminais *bd* ou *bo*<sub>3</sub> ou indiretamente para *aa*<sub>3</sub> via o complexo Citocromo *bc*<sub>1</sub> (Complexo III, ubiquinol-citocromo c redutase). Ocorre também a transferência de elétron do QH<sub>2</sub> para o complexo NAD1 que realiza a produção de NADH. Esses complexos estão na membrana citoplasmática e promovem a bombeamento de um íon H<sup>+</sup> para o periplasma levando a formação da força próton motriz, que é fundamental para o funcionamento da ATPase (Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009).

Devido ao seu metabolismo oxidante do íon ferroso e Fe-sulfetos, são formados minerais de Fe<sup>3+</sup> hidroxissulfatos. Sendo que, em condições ambientais e em culturas de laboratórios são encontrados a Schwertmannita (fórmula idealizada Fe<sub>8</sub>O<sub>8</sub>(OH)<sub>6</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>H<sub>2</sub>O) e minerais do grupo da Jarosita (fórmula idealizada AFe<sub>3</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>). Na fórmula idealizada da Jarosita, podemos observar o sítio "A", que comumente em soluções de biolixiviação e meio líquido para microrganismos oxidantes de ferro, é ocupada por um íon monovalente K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>, mas outros cátions monovalente, ou cátions divalentes podem ser incorporados na matriz da Jarosita (Jones, Bigham et al. 2014).

No aspecto histórico, apesar dos dois minerais sempre estarem associados, foram descritos pela primeira vez em locais diferentes e por pesquisadores diferentes. No caso da Jarosita, sua descoberta ocorreu em 1852 em ravinas na costa sul montanhosa da Espanha no distrito de Jaroso, tempos depois o mineral ganhou o seu nome em homenagem ao local de sua descoberta (Buckby, Black et al. 2003). Já a Schwertmannita, foi encontrada durante a caracterização de precipitados coletados de uma mina de drenagem ácida em Ohio, Estados Unidos. O nome desse mineral é em homenagem ao Prof. Schwertmann que contribuiu para o conhecimento químico de óxidos de ferro (MURAD 1994).

Pouco cristalina e laranja, a Schwertmannita, e a Jarosita, amarela e bem cristalina, são encontradas em conjunto na maioria das vezes, tanto em minas de

drenagem ácida, quanto em ambientes naturais, gerados ou não por ação biológica (Wang, Bigham et al. 2006). O que altera qual fase é dominante nos precipitados depende do pH e a concentração dos cátions monovalentes. No caso da acidez do meio, temos que em pH variando de 2,8 e 4,5 prevalece a Schwertmannita enquanto que em valores mais baixos a dominância é da Jarosita (Wang, Bigham et al. 2006).

No caso de formação biológica desses minerais, a Schwertmannita, metaestável, atua como fase sólida precursora da formação da Jarosita. A transformação é dependente das características do meio em que se encontram. Como, por exemplo, a mudança de Schwertmannita para  $\text{NH}_4^+/\text{H}_3\text{O}^+$  Jarosita ocorre em temperatura de 36 a 45°C, tempo de incubação de 19 a 40 dias, concentração de amônio de 11,4 a 111,4 mM e meio ácido com pH por volta de 2 (Wang, Bigham et al. 2006).

Tradicionalmente se distingue esses minerais de forma qualitativa pela coloração (Jones, Bigham et al. 2014), algo que acontece comumente com amostras desses minerais de origem abiótica ambiental. As cores de minerais provêm informações úteis como origem e permitem suas classificações (Ramos, Inda et al. 2020). Assim como as amostras de solo, os precipitados obtidos das culturas de *A. ferrooxidans* são classificadas segundo o sistema de cores Munsell, no qual a Schwertmannita apresenta coloração alaranjada de tonalidade 8YR e a Jarosita apresenta coloração amarelada de tonalidade 1-4 Y (Munsell 1905, Jones, Bigham et al. 2014).

O método de Coloração de Munsell é uma metodologia de classificação das cores conforme sua tonalidade, saturação e brilho (Munsell 1905). Esse método é aplicado em diversos contextos como as cores de tintas, arqueologia e na mineralogia, sendo esse último o nosso interesse. A aplicação do sistema colorimétrico de Munsell é tão difundido para classificação mineralógica, que o sistema ganhou um próprio nome MSCC, sigla de Munsell Soil Color Charts, ou Mapa de Cores Munsell de Solos (Milotta, Furnari et al. 2020). No contexto atual, alguns pesquisadores da área, como Mancini e seus colaboradores, estão buscando maneira de automatizar, via inteligência artificial e banco de dados, o sistema classificação Munsell correlacionado com características elementais dos solos utilizados (Mancini, Weindorf et al. 2020). Dentro desse mesmo contexto de utilizar técnicas de Data Science, temos Milotta F e colaboradores, buscando criar um sistema focado em realizar a datação de peças arqueológicas (Milotta, Furnari et al. 2020).

Os minerais oriundos da precipitação gerada pela *Acidithiobacillus ferrooxidans* são utilizados em algumas aplicações tecnológicas, podemos citar o uso da Schwertmannita como pigmento industrial enquanto a Jarosita é usada como sequestrante de ferro na hidrometalurgia (Wang, Bigham et al. 2006).

Estudos recentes indicam que a Jarosita, é especialmente precipitada devido ao metabolismo da *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ainda não se conhece totalmente o mecanismo de precipitação, nem mesmo se a precipitação ocorre de maneira direta ou indireta devido ao metabolismo bacteriano. Estudos indicam que durante o processo de formação desses precipitados, ocorre o sequestro e/ou incorporação de alguns cátions em sua estrutura, incluindo metais potencialmente tóxicos para organismos vivos. O mecanismo sequestro desses cátions também é muito pouco conhecido, não sendo possível afirmar se ocorre por adsorção ou incorporação na cadeia (Min, Li et al. 2017). A última hipótese sobre esse mecanismo, é que ocorre imobilização desses metais via camada de passivação que se forma concomitantemente a formação do precipitado nas culturas do microrganismo (Piervandi, Darban et al. 2020). A camada de passivação é uma película de compostos químicos que reduzem o potencial eletroquímico de determinada superfície.

Esta característica pode ter aplicação biotecnológica, sendo a biomineração um dos exemplos. Outro fator interessante, é que a presença desses minerais podem indicar a existência e/ou ao menos a pré-existência de água (Frost, Wills et al. 2006), o que é relevante no contexto de ciências planetárias e busca de vida em outros planetas, como Marte.

O estudo da *Acidithiobacillus ferrooxidans* apresenta também um grande viés biotecnológico, pois seu metabolismo utiliza ciclos de oxirredução de metais, que pode ser aplicado em processos de remediação em locais contendo contaminação por metais e industrialmente na biomineração (Gao, Liu et al. 2020). Na natureza esse microrganismo exerce um papel fundamental no ciclo biogeoquímico dos metais. Produtos gerados pelo seu metabolismo, como o  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , são componentes essenciais para o processo de mobilização dos metais no solo, como por exemplo o arsênio (Valdés, Pedroso et al. 2008). Entretanto, a produção descontrolada de ácido sulfúrico, sobretudo em minas abandonadas, onde  $\text{Fe}_2\text{S}_2$  é exposto ao ar, pode causar o fenômeno conhecido como drenagem ácida de minas, causando grande erosão no solo.

Esse organismo é dominante no uso de biohidrometalurgia no processo de biolixiviação ou biomineração, mais descrito abaixo. Além de ser utilizada em atividades de desulfurização de gases ácidos, tratamento de drenagem ácida de minas e desulfurização de carvão.

No contexto da biohidrometalurgia, a aplicação ocorre especialmente pela capacidade de dissolução de sulfetos metálicos ( $Me_xS_y$ , onde  $Me^{y+}$  é um íon metálico). Este processo possivelmente ocorre por uma via indireta causada pela oxidação do  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$  pela bactéria. Para metais de carga +2, o  $Fe^{3+}$  gerado lixivia esse metal, representado por Me, através da seguinte reação química, de maneira simplificada (Jensen and Webb 1995):



Um dos casos de utilização mais conhecida é no processo de extração do cobre. Como citado anteriormente, 20-25% mundialmente é produzido via biolixiviação utilizando uma cepa específica de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Pathak, Morrison et al. 2017).

O cobre apresenta toxicidade celular, gerando danos na membrana celular e na estrutura do DNA em organismos de maneira geral, além de impactar na atividade de determinadas enzimas (Dopson and Holmes 2014). Estudos das cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 e ATCC 53993, indicaram genes relacionados à resistência ao cobre. Na primeira cepa, foram identificados *cop genes*, que codificam para ATPases do tipo-P relacionadas ao transporte do metal (Navarro, Orellana et al. 2009). Já na segunda cepa, foram descritos todas as possíveis ilhas genômicas ATPases e Cus system de resistência (Orell, Navarro et al. 2010).

Além da resistência a cobre, a *A ferrooxidans*, apresenta resistência a determinados outros metais tóxicos, como cádmio, zinco, cromo, manganês e níquel (Cabrera, Gomez et al. 2005). Um dos mecanismos de resistência a esses metais pode estar associada a presença de *polyP genes*, que codificam para polifosfatases inorgânicas. Estudos indicam que essas moléculas apresentam importante papel na adaptação fisiológica de bactérias a mudanças de ambientes e estresse (Orell, Navarro et al. 2012). Outro mecanismo indicado é relacionado aos produtos dos *genes afe*, especificamente, aqueles da família NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*) (Zhang, Wu et al. 2013).

Voltando às aplicações industriais de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, podemos citar sua utilização para a eliminação de gás sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), subproduto de muitos sistemas modernos de biogás. Sulfeto de hidrogênio é um composto químico altamente tóxico e usualmente removido por sistemas de depuradores ou mecanismos semelhantes ao processo de Clauss (Nemati, Harrison et al. 1998). O processo na primeira etapa envolve a utilização de uma solução de  $Fe_2(SO_4)_3$  que reage com  $H_2S$  gerando como produto  $S$ ,  $H_2SO_4$  e  $FeSO_4$ . *Acidithiobacillus ferrooxidans* atua na segunda etapa oxidando o íon ferroso gerado. Desta maneira o ferro retorna a sua forma mais oxidada que pode novamente reagir com  $H_2S$ , assim voltar o ciclo. (Nemati, Harrison et al. 1998)

Nas últimas décadas, diversos estudos de biolixiviação de metais utilizando cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* vêm sendo realizados. Nos anos 1990, foi realizado estudo da biolixiviação de metais potencialmente tóxicos de lodo de esgoto, que têm se mostrado eficientes e custo efetivos comparados com métodos físicos e químicos, sendo que *Acidithiobacillus ferrooxidans* foi um dos microrganismos mais significativamente utilizados para esses estudos (Tyagi and Couillard 1987, Couillard and Chartier 1991, Sreekrishnan and Tyagi 1996). No anos 2000, alguns estudos demonstram uma possível aplicação do processo de biolixiviação no tratamento de lama industrial para a recuperação de Cromo (Shen, Tyagi et al. 2003, Fang and Zhou 2006, Fang and Zhou 2007, Zheng, Zhou et al. 2009, Min, Li et al. 2017).

Já nessa última década, o estudo está sendo direcionado a recuperação de metais de valor econômico de componentes eletrônicos como placas de circuitos elétricos, peças de computadores ou celulares, lâmpadas fluorescentes entre outros. Esse tipo de estudo é muito importante para o futuro, já que a quantidade de lixo eletrônico tem aumentado exponencialmente com os avanços tecnológicos, principalmente no ramo da comunicação (Arshadi and Yaghmaei 2020, Priya and Hait 2020).

Entretanto, a viabilização do uso da bactéria em meio contendo matéria orgânica é prejudicada, uma vez que estes componentes promovem a inibição do seu crescimento, principalmente ácidos orgânicos. Uma alternativa que está sendo colocada é a utilização de co-culturas com bactérias do gênero *Acidiphilium*, que usam matéria orgânica como fonte de carbono, desta maneira contornando o problema e aumentando a eficiência do processo (Cabrera, Gomez et al. 2005, Liu,

Yin et al. 2011, Priya and Hait 2020). Outro ponto importante, durante o nosso trabalho, tentamos realizar a cultura em meio de cultura sólido, entretanto o pH ácido do meio o torna frágil e quebradiço, se tornando inviável realizar experimentos.

## 2.4) Considerações finais

Analisando todas as características colocadas anteriormente, podemos notar que estudos com a bactéria extremófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* têm grande potencial, podendo gerar novas aplicações tecnológicas no ramo da geomicrobiologia e podendo ser aplicada em áreas como biomineração e exploração espacial.

Esse potencial, de forma enxuta, se deve ao ciclo redox dos metais Fe e S que geram mudanças significativas no ambiente em que a bactéria se encontra, podendo ser o processo de lixiviação de algum metal ou a sua coprecipitação. Além disso, temos a sua toxicotolerância que pode ser explorada em diversos contextos, mas principalmente em biorremediação.

Essa característica é interessante para o campo da astrobiologia, pois nos fornece dados que podem ajudar a propor um modelo de vida que consiga sobreviver em um ambiente extraterrestre baseado no metabolismo de metais como fonte de energia, como por exemplo meteoritos e alguns planetas em que a luz solar é insuficiente para abastecer a fotossíntese, além de não haver disponibilidade de matéria orgânica. Os precipitados gerados pela bactéria, Jarosita e Hematita foram recentemente detectados na superfície do planeta Marte, o que abre a possibilidade da existência de um organismo com metabolismo semelhante (Amils, González-Toril et al. 2007), caso fontes abióticas possam ser descartadas. Outro ponto relevante, estudos indicam que soluções ricas em  $Fe^{+3}$  fornecem proteção contra radiação UV, dessa maneira, íons de ferro se tornam elementos interessantes para a vida, pois muitos ambientes extraterrestres apresentam alta incidência desse tipo de radiação (Gomez and Amils 2002, Gómez, Aguilera et al. 2007). Além disso o estudo dessa bactéria oferece a oportunidade de possibilidades para entender metabolismos alternativos no passado da Terra, como no período Arqueano (Valdés, Pedroso et al. 2008), e mesmo em outros corpos celestes, como Europa (Altair, de Avellar et al. 2018). Abordando um outro viés, pode se explorar o contexto de biomineração espacial, uma vez que a obtenção de alguns metais de fontes não terrestre, uma

bactéria que consiga realizar essa função é altamente interessante para o estabelecimento de uma base espacial, lunar ou marciana, e mesmo como fonte de recurso para o nosso planeta.

No presente trabalho, a resposta fisiológica da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* cepa brasileira LR (Garcia Junior 1991), foi analisada, de maneira geral, frente aos ambientes com excesso dos metais Cu(I), Mn(II) e Cr(III). Uma vez que essa cepa brasileira ainda não possui estudos na literatura analisando sua toxicotolerância e efeitos no precipitado causados por esses metais tóxicos. Tal estudo é importante pois cada cepa pode apresentar diferentes características (Cabrera, Gomez et al. 2005) e esta cepa se mostra interessante uma vez que foi isolada de uma mina de urânio (Garcia Junior 1991). Minas de urânio, em geral apresentam pH baixo, altas concentrações de sulfato, presença de outros metais potencialmente tóxicos e de radiação (Arnold, Baumann et al. 2011).

Pelo ponto de vista da astrobiologia e da exploração espacial, esses metais são ainda pouco estudados, mas podem estar presentes em asteroides, meteoritos e em outros planetas ou luas, de forma que a caracterização de sua toxicidade bem como a resposta metabólica em meios com esses metais é de grande importância para modelos de vida extraterrestre e biomineração.

Nesse contexto, o presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa do grupo, envolvendo outros estudantes, de usar a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* como modelo para geomicrobiologia na astrobiologia e na exploração espacial, entendendo sua interação com meteoritos de ferro e com minerais presentes em outros planetas, efeito da presença de outros metais em conjunto com o ferro, utilização dos minerais formados para geração de produtos (exemplo: solo para plantio de alimentos) entre outros.

### 3.OBJETIVOS

Esse projeto tem como objetivo geral caracterizar a atividade da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, cepa LR, em ambientes contendo metais potencialmente tóxicos e que podem estar presentes junto com o ferro, seja em culturas com soluções monoelementares ou multielementares. Nesse contexto, esse projeto tem como objetivos específicos:

- Avaliar toxicotolerância da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* em meios de cultura com excesso de Cu(II), Mn(II) e Cr(III);
- Análise do crescimento do microrganismo nos meios contendo os metais tóxicos;
- Análise da resposta fisiológica para aplicação em ambientes extremos de toxicidade por esses metais, no contexto da astrobiologia e da biomineração para exploração espacial;
- Análise da composição dos precipitados obtidos nas diferentes culturas utilizando os métodos de espectroscopia de Absorção Atômica, de Reflectância UV-Vis e espectroscopia Raman.

## 4.MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1) Microrganismo Modelo

O microrganismo utilizado nesse estudo é a bactéria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans*, cepa LR cedida ao grupo pela professora Dra. Denise Bevilaqua (Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP – Araraquara), sendo que esta cepa, LR (Lagoa Real - Bahia), foi isolada de lixiviado ácido de minas de urânio como descrito por Garcia (1991).

### 4.2) Condições de Cultivo

O cultivo do microrganismo foi realizado em meio mineral T&K modificado por Bergamo e colaboradores(2004) para *A. ferrooxidans*, cepa LR (Garcia Junior 1991). Este meio líquido é composto por duas soluções, A e B, que foram misturadas na proporção 4:1, respectivamente, em pH = 1,8, acidificado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A primeira, Solução A é composta de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,625 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,625 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,625 g/L) e autoclavada a 120°C por 15 minutos enquanto a Solução B, apenas sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; (167 g/L)), filtrada com membrana de acetato de celulose 0,22 µm (Tuovinen and Kelly 1973). O meio inoculado foi mantido sob agitação de 170 rpm a 30° C em erlenmeyers de 40mL. O repique ocorreu quando a coloração do meio atingia 8YR com alíquota em 2% (volume / volume).

O repique ocorre nesta coloração, pois quando ocorre o consumo do Fe<sup>2+</sup> pela bactéria, coloração azulada, ocorre a formação de Fe<sup>3+</sup>, que apresenta a coloração 8YR, também indicada por vermelho tijolo. A medida da coloração foi realizada pelo uso do aplicativo Color Mine v1.08, que faz uso da câmera do celular para indicar a coloração do material analisado.

Para cada metal foi feita uma solução inicial de 0,1M, sendo utilizados sais de sulfato (CuSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> e Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>). A quantidade adicionada dessas soluções foi baseada no valor em mols de Fe<sup>2+</sup> no meio, sendo que estudos realizados dentro do próprio grupo indicam que a forma mais eficiente de se atingir concentrações mais altas desses cátions metálicos adicionados à solução de ferro é mantendo a

concentração do ferro e adicionando de outros demais cátions lentamente, em concentração crescente de uma cultura para outra, para que a bactéria ajuste seu metabolismo e acostume com esses elementos.

Com a evolução dos resultados foi necessária a utilização de meio T&K cobre e manganês, que consistem no meio de cultura descrito no parágrafo anterior com a adição do sal do metal de interesse na concentração de 2M.

Cultivos foram realizadas 2 tipos de cultura com contaminantes: monoelementar e multielementar. Contendo os 3 metais alvo (multielementar) e com a adição de apenas 1 dos 3 metais alvo (multielementar). Além do controle negativo, sem adição de microrganismos, para avaliar a esterilidade do meio e do material utilizado.

#### **4.3) Medida de crescimento por fotometria**

Por ser um organismo que precipita mineral durante seu metabolismo, a análise do crescimento da cultura não pode ser feita por medida de densidade óptica. Houve a tentativa de crescimento em meio sólido, entretanto não se obteve êxito na tentativa. Métodos de medida moleculares que estavam à disposição não eram efetivos devido a condição extremófilas do meio de cultura. Dessa forma, para estimar a taxa de crescimento da *Acidithiobacillus ferrooxidans*, usou-se um método colorimétrico (espectroscopia no UV-VIS, equipamento Thermo Scientific™ NanoDrop 2000c) baseado na complexação do íon Fe(III) com solução de tiocinato de potássio acidificada com ácido sulfúrico (coloração vermelha intensa), enquanto que o íon Fe(II) foi complexado com solução de fenantrolina e tamponado com acetato de sódio (solução amarela alaranjada), como descrito por Mendham e colaboradores (2000). Após efetuada a curva de calibração, foi possível quantificar o teor de Fe(II) e Fe(III) na solução, inferindo o crescimento do organismo. Para a quantificação da fase mineral, uma alíquota do experimento foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o precipitado foi lavado com igual volume de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O processo foi repetido e o precipitado final foi solubilizado com igual volume de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> e o Fe(III) complexado com tiocianato e medido como descrito acima. Este experimento foi realizado em colaboração com o mestre e doutorando no mesmo grupo Gabriel Gonçalves Silva.

O cultivo foi realizado em triplicata em frascos de 50 mL contendo 20 mL de cultura. Alíquotas de 300 uL foram retiradas inicialmente de 3 em 3 horas até o limite de detecção do Fe(II). Após esse período as alíquotas foram espaçadas para 8 em 8 horas. A medida em UV-Vis do complexo de Fe(III) /Tiocianato foi feita em 470 nm enquanto o complexo Fe(II) /Fenantrolina foi feita em 520 nm.

Os dados foram tratados utilizando Microsoft Excel 2016 MSO, em que os valores de concentração de Fe(III) do controle negativo são diretamente subtraídos do valor do teste em cada ponto, desta maneira, retirando assim o viés de oxidação natural que ocorre. Os gráficos foram criados utilizando o programa OriginPro 8.6.0 (32bit).

Esta metodologia está descrita no seguinte artigo publicado pelo grupo “Application of capillary electrophoresis combined with conductometric and UV detection to monitor meteorite simulant bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*”(Gonçalves Silva, Yamassaki de Almeida et al. 2018).

#### **4.4) Recuperação do precipitado**

Para a recuperação dos metais foram testadas duas metodologias, referidas nesse trabalho com metodologias A e B, desenvolvidas no decorrer do projeto já que a literatura não há uma metodologia consistente para tal processo. Os cultivos foram submetidos às metodologias propostas por 21 dias de incubação à 30°C e depois armazenadas em geladeiras por 7 dias.

A metodologia A se inicia com a realização da raspagem do mineral depositado na parede do frasco, seguido da centrifugação de todo o meio de cultura e retirada do sobrenadante. Ao fim suspendeu-se o precipitado em água destilada e essa suspensão foi colocada em placa de Petri aberta para secagem *in natura*, temperatura ambiente, por 7 dias.

Para a segunda, metodologia B, realizou-se a raspagem do mineral depositado na parede do frasco e deixou-se o mineral decantar na própria vidraria em que a bactéria foi cultivada. Em seguida retirou-se o meio de cultura e lava-se com água destilada 3 vezes, ao fim suspendeu-se o precipitado em água destilada e essa suspensão foi colocada em placa de Petri aberta para secagem *in natura* por 7 dias.

## 4.5) Caracterização dos precipitados utilizando técnicas espectroscópicas

Para a caracterização dos precipitados gerados pelas culturas realizadas nas etapas anteriores foram realizadas as técnicas de espectroscopia de Absorção Atômica (AAS, da sigla em inglês para 'atomic absorption spectroscopy'), espectroscopia Raman e espectroscopia de reflectância no ultravioleta e visível (UV-VIS).

### 4.5.1) Espectroscopia de Absorção Atômica

Empregou-se um espectrômetro de absorção atômica com chama Vario 6 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com lâmpada de correção de fundo de deutério e lâmpadas de cátodo oco, uma específica para cada um dos metais, como fonte de radiação. Para medir cobre, o equipamento é operado em 324,8 nm, para manganês, em 279,5 nm e para crômio, em 357,9 nm. Os demais parâmetros instrumentais foram ajustados de acordo com recomendações do fabricante (Fluxo ar ( $L h^{-1}$ )/acetileno ( $L h^{-1}$ ): 400/50; Fenda: 1,2 nm; iHCl: 3 mA).

As amostras, inicialmente sólidas, foram dissolvidas utilizando HCl P.A.10%, pois o equipamento opera apenas com amostras líquidas.

### 4.5.2) Espectroscopia Raman

Para análises de espectroscopia Raman foi utilizado o instrumento Bruker RFS-100/S, equipado com detector de Germânio resfriado com nitrogênio líquido e laser de ND3+/YAG com comprimento de onda de 1064 nm. Espectros foram obtidos com resolução espectral de  $4 cm^{-1}$ . Os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectrometria de Molecular (LEM) no IQ-USP. Para o processamento dos espectros, utilizou-se o programa Fityk versão 0.9.8 (Wojdyr 2010). Foi realizado a normalização utilizando distribuição Lorentziana (Tanabe and Hiraishi 1980) e cálculo da largura a meia altura da banda.

Está técnica foi utilizada pela praticidade aliada à rapidez além da necessidade mínima de preparo de amostra, sendo uma das técnicas que está sendo miniaturizada para ser enviada a Marte. Uma vez que água e gases em geral quase não são ativos em Raman, essa técnica pode ser aplicada em amostras aquosas sem grandes prejuízos, diferentemente de espectroscopia FTIR. Facilidade de manuseio,

portabilidade e interpretação de dados são três grandes vantagens no contexto de exploração espacial (Das and Hendry 2011).

#### **4.5.3) Espectroscopia de Reflectância UV-Vis**

Avaliação do espectro de reflectância difusa na região do ultravioleta e visível do precipitado, realizada utilizando o espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-vis Bio equipado com uma sonda de reflectância difusa Barrelineo™ (Harrick Scientific Products, Inc.). Esta técnica foi realizada no Laboratório de Química de Pigmentos Naturais, coordenado pelo Prof. Dr. Erick L. Bastos, IQ-USP. Essa técnica foi escolhida inicialmente por sua praticidade, portabilidade e facilidade de medida, sendo de grande importância na astrobiologia e na exploração espacial.

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

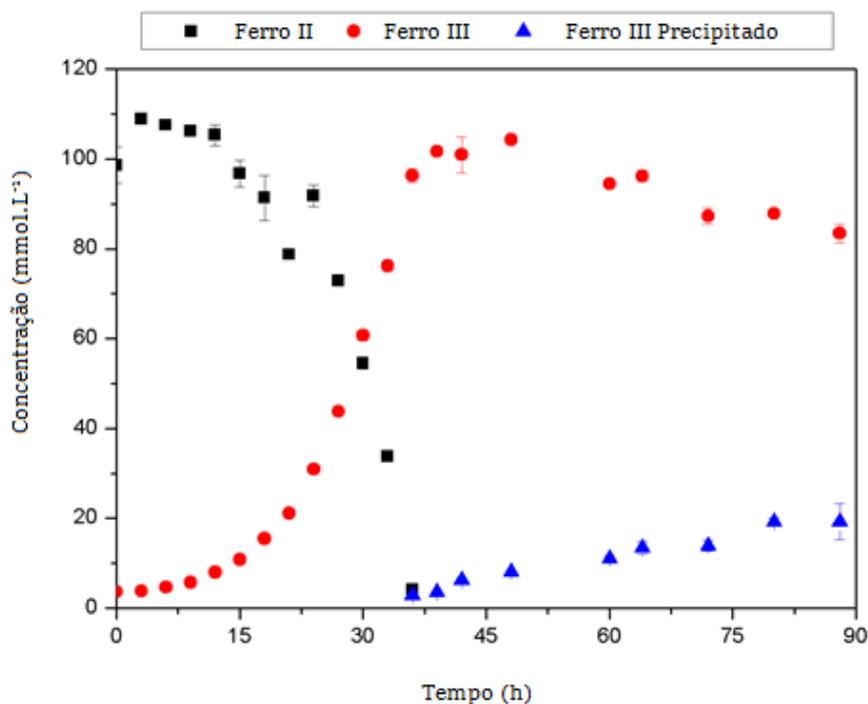
### 5.1) Medida de crescimento em cultivo em meio de ferro isento dos metais alvo

Nesse primeiro estudo, o meio usado continha apenas ferro e não os metais alvo desse estudo: Cu(II), Mn(II) e Cr(III).

Inicialmente, foi realizada a curva de padrão de crescimento da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, cepa LR, em meio T&K modificado sem adição de metais tóxicos em sua composição utilizando o método de complexação descrito em Medham e Colaboradores (2016) com análise espectrofotométrica em UV-Vis (Gonçalves Silva, Yamassaki de Almeida et al. 2018).

O gráfico da curva da taxa de crescimento está apresentado na figura 3:

Figura 3: Curva de concentração de Fe(II) e Fe(III) na solução e Fe(III) do precipitado (após dissolução) em cultura utilizando o meio T&K sem adição de nenhum metal pesado.



Fonte: (Gonçalves Silva, Yamassaki de Almeida et al. 2018)

Como descrito na literatura (Cabrera, Gomez et al. 2005, Daoud and Karamanev 2006, Quatrini, Appia-Ayme et al. 2006, Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009), a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxida Fe(II) para a obtenção de energia levando a formação de Fe(III), e por efeito do metabolismo bacteriano, ocorre a formação de precipitado, Schwertmannita que no primeiro momento que se transforma em Jarosita, exatamente o que foi observado no experimento. Inicialmente observou-se uma grande concentração de Fe(II), oriunda do meio de cultura, que com o decorrer do cultivo foi diminuindo, enquanto houve o aumento da concentração de Fe(III) (esta, inicialmente é baixa porém não nula, uma vez há uma quantidade mínima que é adicionada no momento do inóculo). Isto indica que a bactéria estava realizando a oxidação de Fe(II), que foi totalmente consumido em por volta de 36 horas, após o qual este íon não foi mais detectado. Se analisarmos o padrão das curvas obtidas, podemos observar que apresentam o padrão exponencial, típico de curvas de crescimento bacterianas (Madigan, Martinko et al. 2016), desta maneira, havendo uma correspondência entre as duas curvas, no qual podemos traçar um paralelo entre a produção de Fe(III) com o crescimento do microrganismo.

Após 36 horas de cultivo, temos o aparecimento de precipitado detectável pelo método analítico e visualmente perceptível após 48 horas de cultivo; segundo informações da literatura (Cabrera, Gomez et al. 2005, Daoud and Karamanev 2006, Quatrini, Appia-Ayme et al. 2006, Quatrini, Appia-Ayme et al. 2009) e por análise visual da coloração, pode-se inferir que se trata da Schwertmannita. Concomitantemente com o aumento da quantidade de precipitado ocorre a diminuição do Fe(III) solubilizado no sistema, indicando a precipitação desse íon para a possível formação da Schwertmannita. Estimou-se, fazendo um paralelo com o padrão típico de curva de crescimento bacteriano, que nesse período o cultivo estava em fase estacionária.

Em relação aos controles, nenhum deles apresentou grande mudança na coloração do meio ou uma precipitação considerável Fe(III), sendo que os dados obtidos a partir deles serviram para validar a esterilidade do material utilizado e adequação das curvas retirando o viés natural da oxidação do Fe(II), mesmo que seja valores baixos.

Os dados neste tópico apresentam concordância com a literatura estabelecida sobre a bactéria, como o tempo de cultivo, que está dentro do tempo (48hs) indicado

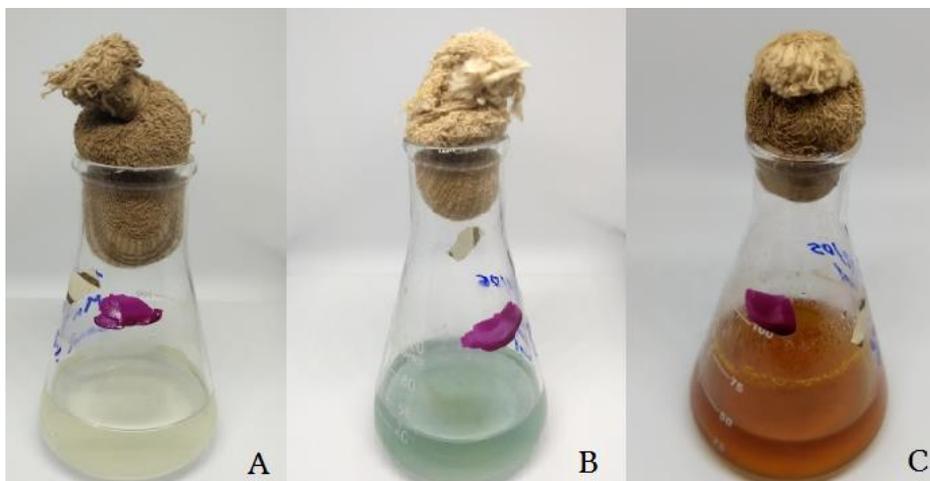
na literatura para o crescimento da *A. ferrooxidans* (Devasia and Natarajan 2010, Zhang, Zhang et al. 2020), validando o método. A validação deste método é importante uma vez que possibilita o melhor entendimento do crescimento da *A. ferrooxidans*, o que pode ser utilizado em diversas aplicações em estudos posteriores.

## **5.2) Cultivo em meio de cultura contendo os metais potencialmente tóxicos alvo desse estudo**

Inicialmente, foi realizado o experimento submetendo a *Acidithiobacillus ferrooxidans* em meio multielementar, com o conjunto dos metais alvo (Cu II, Mn II e Cr III). O primeiro cultivo teve a concentração total desses metais de 0,56% do teor (em mol) de Fe(II) em solução, o que corresponde a cerca de  $1,35 \times 10^{-3}$  mol/L de cada metal para cada repique aumentou-se gradativamente a concentração até se atingir o valor da concentração máxima tolerada (MTC do inglês *Maximum Tolerated Concentration*), limite de concentração de determinada substância que inibe o crescimento de um determinado organismo.

Para esse experimento, usou-se como indicativo de crescimento da bactéria a mudança de coloração do próprio meio de cultura, exemplificado na figura 4. A coloração inicial é transparente ou azul-esverdeada, está última devido as presenças dos íons Cr(III) e Cu(II), mudando para alaranjado quando a maioria do Fe(II) for convertida a Fe(III), indicando que ocorreu o crescimento bacteriano. Esta coloração alaranjada, seguindo o padrão de Munsell de notação de cores é 8YR. Com o decorrer do cultivo, ocorre a formação do precipitado, que inicialmente apresenta mesma coloração, independente da coloração inicial. O tempo de crescimento não foi considerado nesse experimento.

Figura 4: Meios de cultura e sua coloração dependendo da quantidade de metais pesados e tempo de cultura. Em A temos o meio T&K modificado inoculado sem a adição de metais pesados. Em B temos o meio T&K modificado inoculado com a adição de metais pesados. Em C temos o meio T&K modificado após período de cultivo.

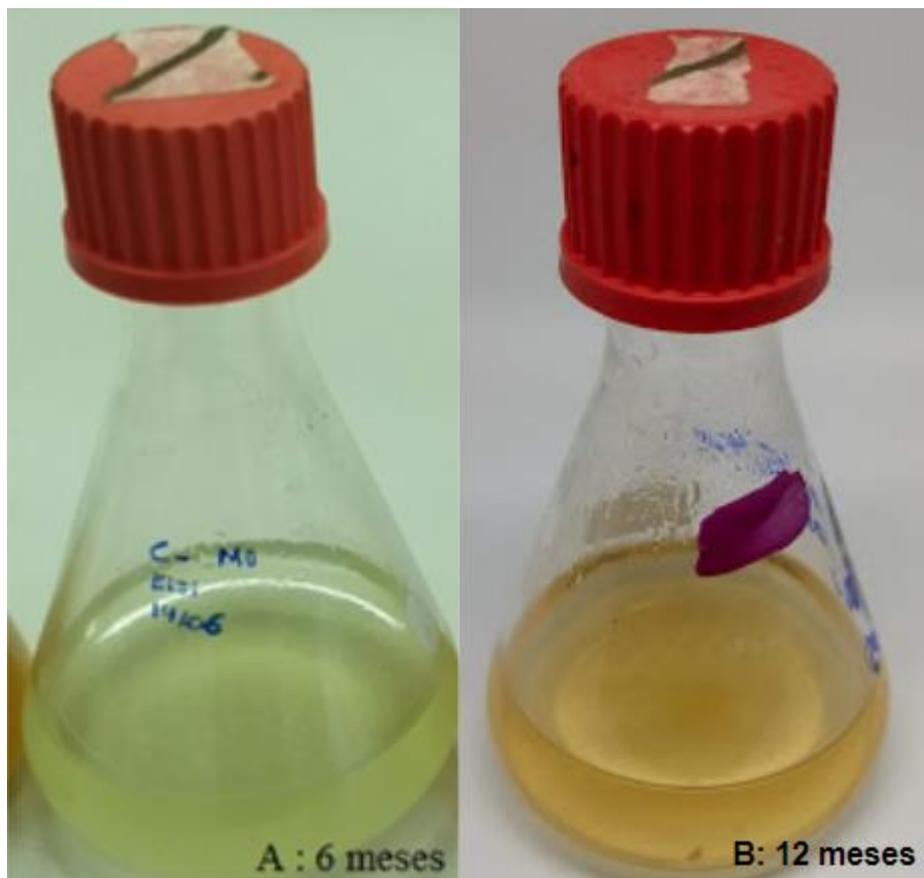


Fonte: o autor.

Em relação aos controles negativos do experimento, foram realizados a cada repique um controle correspondente. Além disso, um frasco contendo apenas meio de cultura foi deixado nas mesmas condições dos cultivos, com o intuito de verificar se após um período de incubação, o Fe(II) contido no meio seria totalmente consumido e se ocorreria a formação de precipitado, como ocorre no meio de cultura com o *A. ferrooxidans*. O objetivo era verificar em quanto tempo o Fe(II) seria oxidado sem a presença do inóculo bacteriano. Nas primeiras semanas, não foram observadas mudanças, o meio de cultura em nenhum momento apresentou coloração 8 YR referente a formação de Fe(III). O frasco foi mantido na estufa e após os 3 primeiros meses, não sendo perceptível a mudança de coloração. Somente após 4 meses, foi possível verificar uma mudança na coloração, passando a ficar cada vez mais amarelada e após longo período de incubação, 12 meses, o meio atingiu a coloração 1 YR, correspondente a Jarosita, mesmo sem ter passado pela coloração 8YR.

A coloração do meio pode ser observada na figura 5.

Figura 5: Meios de cultura sem inóculo após período de espera nas mesmas condições em que os cultivos foram encubados. Em A temos o frasco após 6 meses e em B temos o frasco após 12 meses.



Fonte: o autor.

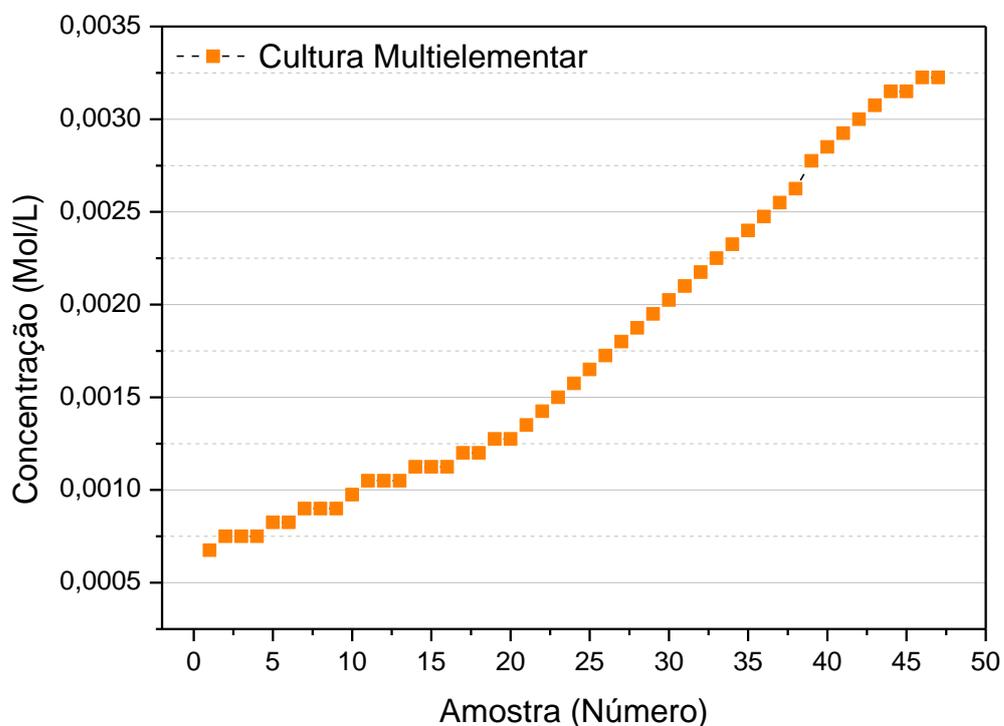
Este resultado indica que ocorreram poucas alterações em períodos de até 12 meses de incubação. Como o meio controle sem microrganismo não atingiu a coloração 8YR de quando há a formação Fe(III), pode-se concluir esta coloração é resultado de ação do microrganismo.

A partir desse resultado e da conclusão do experimento de estabelecimento da curva padrão de crescimento bacteriano com análise de espectroscopia UV-Vis, estabeleceu que avaliação de crescimento positivo para o cultivo com metais tóxicos seria quando o meio atingisse a coloração 8YR, ou seja, a bactéria consumiu o Fe(II) ocorrendo a formação de Fe(III). Pelo experimento para construção da curva padrão de crescimento, a coloração indica que a cultura atingiu seu estado estacionário de crescimento.

O resultado do experimento afim de se identificar qual é o MTC da *Acidithiobacillus ferrooxidans* para meios multielementares contendo Mn(II), Cu(II) e

Cr(III) foi de  $3,225 \times 10^{-3}$  mol/L de cada sal, para esta cepa. Foram um total de 47 cultivos com cada um deles rendendo precipitado para futura análise. Vale ressaltar que a cada inóculo ocorreu um aumento na concentração dos contaminantes, como é possível visualizar, através da figura 6.

Figura 6: Amostra pela numeração por concentração dos metais tóxicos em Mol/L.



Fonte: o autor.

No Quadro 2 indica os valores de toxicotolerância ao Mn(II), Cu(II) e Cr (III). Esses dados são para concentrações individuais, não existindo literatura para tolerância em conjunto de metais tóxicos.

Quadro 2: Tabela de valores de MTC segundo a literatura para a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Metal Tóxico	MTC(g/L)	MTC(mmol/L)	Referência
Multielementar Mn(II), Cu(II) e Cr(III)	Mn (II) – 0,2 Cu (II) – 0,16 Cr (III) – 0,335	3,225 / 6,45	Presente Projeto
Cr(III)	0,52	10	(Sisti, Allegretti et al. 1998)
	0,78	15	(Wong, Silver et al. 1982)
	0,4	7,69	(Cabrera, Gomez et al. 2005)
	3,9	75	(Baillet, Magnin et al. 1998)
Mn(II)	27,5	500	(Wong, Silver et al. 1982)
	29	520	(Zhang, Wu et al. 2013)
Cu(II)	0,6-10	9 - 157	(Leduc, Ferroni et al. 1997)
	19	300	(Boyer, Magnin et al. 1998)
	16	252	(Garcia and Da Silva 1991)
	10	157	(Das, Modak et al. 1997)
	4	63,15	(Cabrera, Gomez et al. 2005)
	5	78	(Brahmaprakash, Devasia et al. 1988)

Fonte: Baseado em Cabrera et al(2005a)

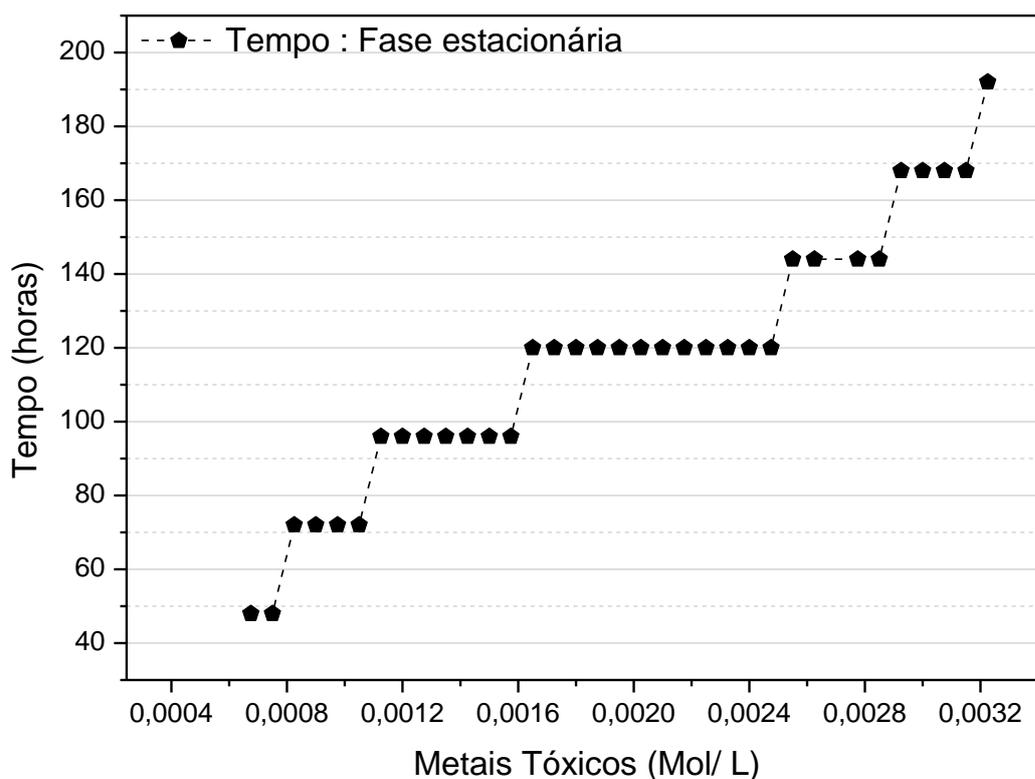
Comparando o MTC obtido 3,225 mmol/L, no caso existe 6,45 mmol/L de Cr III uma vez que o sal utilizado tem 2 mols de cromo por mol do composto, com os valores de referência na literatura, temos que houve muito menor toxicotolerância da cepa. Este resultado pode ser considerado esperado, uma vez que os valores da literatura indicam apenas a resistência a um dos metais de cada vez e não ao conjunto dos três metais no meio. No caso do Cr(III), temos que o MTC não é tão menor quanto o valor da literatura (Wong, Silver et al. 1982, Baillet, Magnin et al. 1998, Sisti, Allegretti et al. 1998) o que pode indicar que este íon seja o maior responsável pela inibição do crescimento bacteriano e que o efeito do tóxico deste metal tenha sido potencializado na presença dos outros dois. No caso do Mn(II) e Cu(II), existem diferenças significativamente grandes no MTC, pelo menos uma ordem de grandeza no caso do cobre e duas ordens de grandeza no manganês, indicando que possivelmente não

tiveram maior efeito sobre a pausa de crescimento da bactéria. Esta afirmação está de acordo com a literatura (Wong, Silver et al. 1982, Cabrera, Gomez et al. 2005) que a toxicidade de Mn(II) e Cu(II) é menor que a de Cr(III).

Este resultado fornece os limites de locais nos quais essa bactéria pode ser usada em aplicação biotecnológicas, assim como nos permite pensar em ambientes extraterrestres de interesse que tenham esses metais: diversos meteoróides, asteroides e regolitos podem possuir esses elementos (Amils, González-Toril et al. 2007, Gronstal, Pearson et al. 2009).

Conforme os cultivos foram sendo realizados também se realizou a medida de crescimento da bactéria até o estado estacionário de oxidação do ferro, por meio da coloração do meio, 8YR. A figura 7 mostra o aumento do tempo para a chegada ao estado estacionário de cada cultivo em meio multielementar, sendo que a medida de crescimento foi realizada a cada 24 horas.

Figura 7: Gráfico de concentração de metais tóxicos, em porcentagem de mols de Fe(II), pelo tempo que se levou até chegar ao estado estacionário.



Fonte: o autor.

Podemos ver pelo gráfico da figura 7 que com o aumento da concentração de metais no meio de cultura, ocorre um aumento gradativo de horas que o cultivo leva para alcançar o estado estacionário. Estes dados estão de acordo com a literatura, ocorre o aumento do tempo da cultura para se atingir o estado estacionário, Cabrera e colaboradores (2005) encontram valores por volta de 56 horas no MTC para Cu(II) e Cr(III), Wong e colaboradores (1982) encontram valor de 42 horas para Mn(II) enquanto que nos resultados do presente trabalho temos 194 horas, uma diferença considerável. Assim percebe-se que os efeitos somados dos metais tóxicos levam o microrganismo a ter um crescimento mais lento, comparado a culturas monoelementares. Provavelmente o retardo no crescimento se deve ao fato do microrganismo ter que expressar genes associados à sua proteção e resistência, o que demanda um maior tempo e recursos pelo microrganismo. Não foi encontrado na literatura explicações mais detalhadas para esse efeito.

Depois dessa etapa de crescimento em uma cultura multielementar, foram realizadas culturas monoelementares. A seguir, mostraremos os resultados desses experimentos para cada um dos metais tóxicos testados.

Iniciaremos a priori indicando qual foram os resultados das culturas monoelementares de Mn(II). Foram um total de 37 culturas realizadas durante o período. A figura 8 mostra o gráfico referente ao Mn(II), na próxima página.

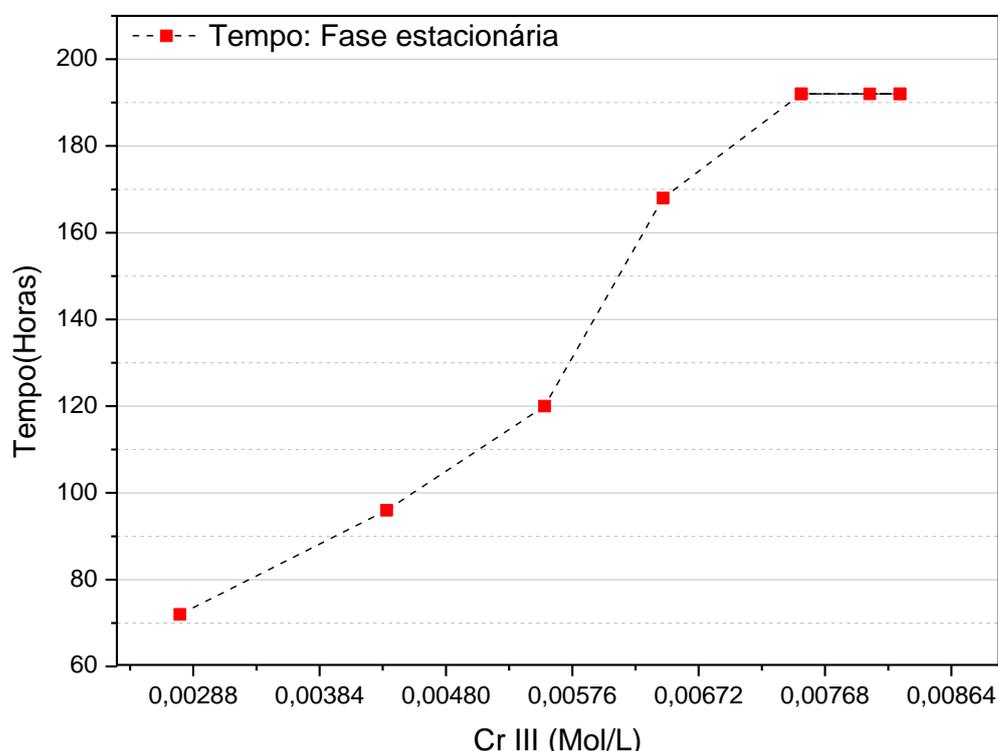


MTC de cultura multielementar. Esse dado, apesar de não apresentar nenhum relato na literatura, pode ser interessante para futuras pesquisas.

Esse resultado na cultura monoelementar de Mn(II) se faz interessante pois demonstra a possibilidade de utilização da cepa LR em condições nas quais exista uma grande concentração do íon, expandindo as possibilidades de aplicações biotecnológicas. Em especial, na astrobiologia e na exploração espacial, se encontra na literatura (Moore and Brown 1962, Fitzgerald, Lamborg et al. 2014) indicativos de uma grande variedade de meteoritos com concentrações abaixo do MTC, o que viabiliza o uso dessa cepa levando-se em conta apenas essa variante.

Abaixo gráfico de referente ao Cr(III):

Figura 9: Gráfico do tempo em horas até chegar ao estado estacionário por concentração de Cr(III) em mols por litro.



Fonte: o autor.

Pela figura 9 e os dados obtidos, podemos observar que o MTC encontrado foi de 8,02 mMol/L. Este valor é superior apenas ao relatado por Cabrera e colaboradores (2005), de 7,69 mMol/L, enquanto é inferior aos demais (Wong, Silver et al. 1982, Baillet, Magnin et al. 1998, Sisti, Allegretti et al. 1998). Comparando com a cultura multielementar, 6,45 mmol/L, temos o MTC de ambas é próximo, o que reforça a

hipótese que o dano celular causado pelo Cr(III) tenha sido o maior responsável pela inibição do crescimento bacteriano na cultura multielementar.

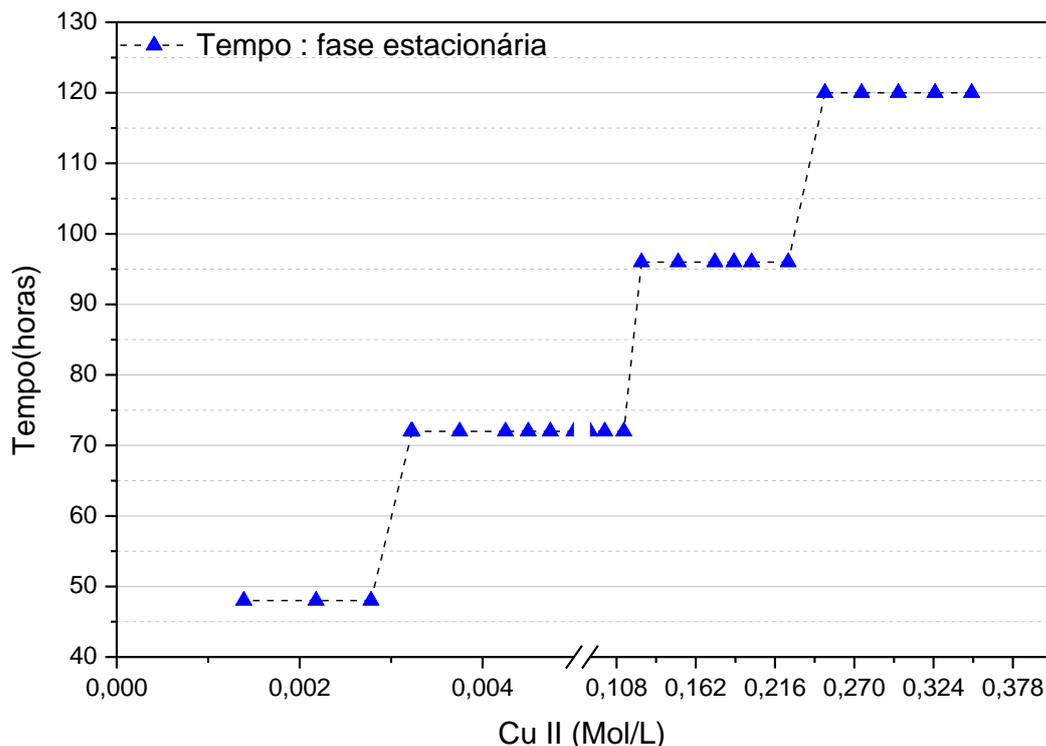
Se formos, analisar o tempo para atingir a fase estacionário no cultivo na mesma concentração do MTC da cultura multielementar, temos que na cultura monoelementar de Cr(III), a bactéria tem um crescimento acima do considerado ideal, 48 horas (Devasia and Natarajan 2010, Zhang, Zhang et al. 2020), quase similar ao multielementar, o que reforça a hipótese do parágrafo anterior.

Observando o tempo de crescimento do microrganismo, verificamos que mesmo com baixos aumentos na concentração, impactavam de maneira significativa o crescimento bacteriano. Esse comportamento é diferente do observado no Mn(II), acima, e Cu(II), abaixo. Esse dado está de acordo com a literatura (Wong, Silver et al. 1982, Cabrera, Gomez et al. 2005) que indica que o Cr(III) é mais citotóxico que o Cu(II) e o Mn(II). No MTC, observamos que o tempo até que o Fe(III) fosse consumido foi similar ao observado nas culturas de Mn(II) e Multielementar.

Esse resultado na cultura monoelementar de Cr(III) pode significar que essa cepa não é a mais indicada para se utilizar em aplicações nas quais exista uma grande concentração do íon.

Na figura 10 é mostrado o gráfico de referente ao Cu(II).

Figura 10: Gráfico do tempo em horas até chegar ao estado estacionário por concentração de Cu(II) em mols por litro.



Fonte: o autor.

Pela figura 9, é possível observar que o MTC encontrado foi de 0,35 mol/L. Esse valor é superior aos MTC indicados na literatura (Das, Modak et al. 1997, Leduc, Ferroni et al. 1997, Boyer, Magnin et al. 1998, Cabrera, Gomez et al. 2005). Comparando com a cultura multielementar, 3,225 mmol/L, temos uma diferença de 2 ordens de grandeza. Analisando o tempo para atingir a fase estacionária no cultivo na mesma concentração do MTC da cultura multielementar, é possível observar que na cultura monoelementar de Cu(II), a bactéria tem um crescimento dentro do considerado ideal, 48 horas (Devasia and Natarajan 2010, Zhang, Zhang et al. 2020). Assim, na cultura multielementar, o Cu(II) não foi o principal causador da inibição do crescimento.

Observando o tempo de crescimento do microrganismo, verificamos que a partir de 0,003 Mol/L do metal tóxico, a bactéria começa a ter uma menor velocidade de crescimento. No MTC, observamos que o tempo até que o Fe(III) fosse consumido, chegou até 120 horas (5 dias) de cultura, bem acima da literatura (Wong, Silver et al. 1982, Zhang, Wu et al. 2013), mas um menor tempo que o observado no MTC de cultura multielementar, Cr(III) e Mn(II).

Esse resultado na cultura monoelementar de Cu(II) indica a possibilidade de utilização da cepa LR em condições nas quais exista uma grande concentração deste íon, expandindo as possibilidades de aplicações biotecnológicas. Vale ressaltar a importância que a biomineração vem assumindo para atender à demanda mundial de cobre (Pathak, Morrison et al. 2017).

A seguir, temos a tabela 3 contendo os MTCs para culturas monoelementares comparando com todos os valores da literatura utilizados.

Quadro 3: Tabela de valores de MTC segundo a literatura para a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* e MTCs encontrados no presente projeto.

Metal Tóxico	MTC(g/L)	MTC(mmol/L)	Referência
Cr(III)	0,52	10	(Sisti, Allegretti et al. 1998)
	0,78	15	(Wong, Silver et al. 1982)
	3,9	75	(Baillet, Magnin et al. 1998)
	0,4	7,69	(Cabrera, Gomez et al. 2005)
	0,417	8,25	Presente Projeto
Mn(II)	27,5	500	(Wong, Silver et al. 1982)
	29	520	(Zhang, Wu et al. 2013)
	82.4	1500	Presente Projeto
Cu(II)	0,6-10	9 - 157	(Leduc, Ferroni et al. 1997)
	19	300	(Boyer, Magnin et al. 1998)
	16	252	(Garcia and Da Silva 1991)
	10	157	(Das, Modak et al. 1997)
	4	63,15	(Cabrera, Gomez et al. 2005)
	22	350	Presente Projeto

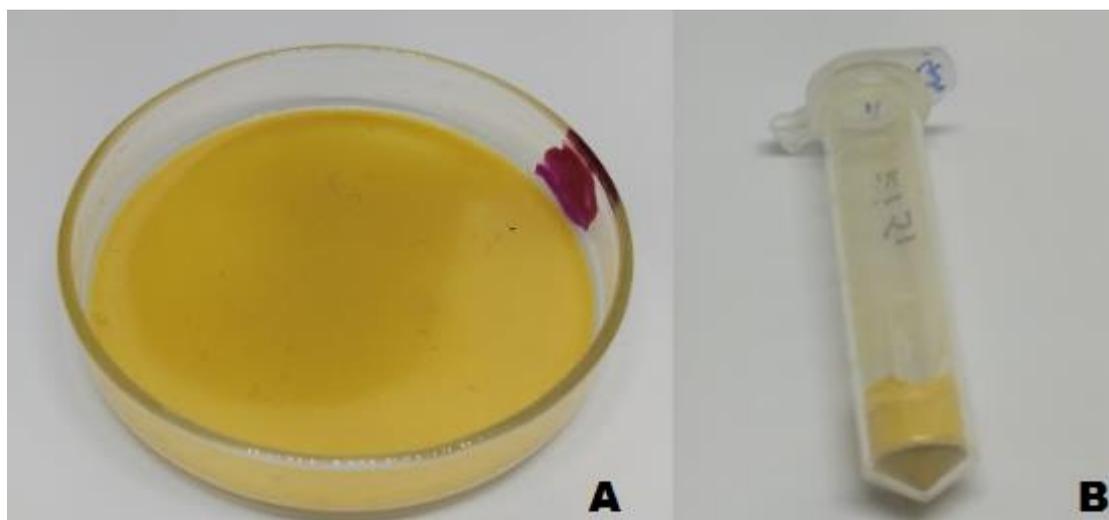
Fonte: Baseado em Cabrera et al(2005a)

Em resumo, observamos que a cepa LR apresenta baixa resistência ao Cr(III), quando comparada à literatura, não sendo indicada para a utilização em aplicações biotecnológicas com altas concentrações desse íon. Já para Mn(II) e Cu(II), temos MTC maiores que os encontrados na literatura, dessa maneira, temos uma nova perspectiva para possíveis aplicações biotecnológicas em condições que anteriormente a concentração desses íons eram um impeditivo.

### 5.3) Recuperação do precipitado

A fim de se verificar qual entre as duas metodologias, A e B, é mais eficiente para se utilizar como padrão no projeto e no laboratório, foram avaliadas duas características importantes: grau de umidade e rendimento. O primeiro, procura analisar de modo qualitativo o grau de semelhança que o mineral extraído tem com o natural uma vez que as amostras naturais dos precipitados possuem baixo grau de umidade tendo um aspecto seco. Obter um precipitado, figura 11, com aspecto físico semelhante ao natural também facilita os procedimentos de preparo de amostras para os ensaios espectroscópicos. O rendimento visa avaliar a quantidade de mineral recuperado em gramas, ou seja, verificar qual consegue extrair uma maior quantidade do mineral da cultura contendo o *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Os testes foram realizados em quadruplicada.

Figura 11: Mineral oriundo do metabolismo da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Em A temos o mineral secando na placa de petri e em B o mineral num microtubo de 2mL.



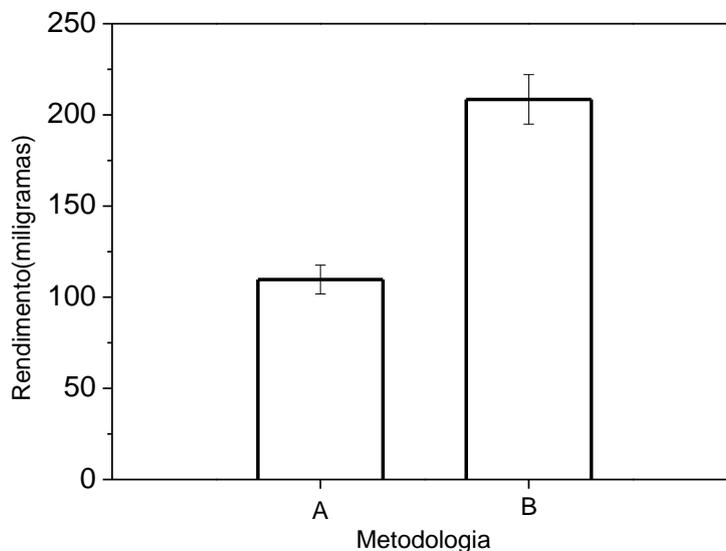
Fonte: o autor.

O precipitado gerado pela metodologia A apresenta visualmente aspecto viscoso e argiloso e mesmo com maior tempo de secagem, não apresenta mudança desse aspecto. Foi feita uma lavagem extra com água destilada antes de se realizar à secagem, mas não houve mudança.

O precipitado oriundo da metodologia B, por sua vez, apresentou aspecto seco, cristalino e muita vez em pó.

O resultado para a avaliação de rendimento está apresentado na figura 12.

Figura 12: Gráfico de rendimento em miligramas(mg) pela metodologia utilizada.



Fonte: o autor.

O rendimento da metodologia A foi de  $110 \pm 8$  mg de amostra, enquanto a metodologia B rendeu  $208 \pm 13$  mg.

Comparando-se os resultados temos que o segundo método é mais eficiente pois em questão do aspecto físico as amostras resultantes da primeira metodologia necessitariam de maior processamento para a utilização nos experimentos seguintes, uma vez que os equipamentos têm melhor eficiência em amostra seca. Em rendimento também temos uma superioridade do segundo método.

Sendo assim, o segundo método foi definido como padrão para a obtenção dos minerais. Esta metodologia foi utilizada para retirar os precipitados de todas as culturas realizadas, tanto de culturas contendo conjunto de metais quanto cada um individualmente além da cultura sem metal.

#### 5.4) Espectroscopia de absorção atômica

A técnica de espectroscopia de absorção atômica foi utilizada com o objetivo de mensurar quanto de metal tóxico foi recuperado nos precipitados dos cultivos, além

de entender se diferentes concentrações dos metais tóxicos afetariam a quantidade recuperada.

Inicialmente, mostraremos o experimento que testa se a recuperação de metais tóxicos na Jarosita ocorre majoritariamente por adsorção superficial, inserindo esse mineral diretamente no meio de cultura, ou se ocorre co-precipitação biótica dos metais tóxicos. Realizamos esse teste, pois como o mecanismo não está estabelecido, existem diversas hipóteses de como a Jarosita sequestra os metais, sendo uma delas o método de adsorção superficial dos íons no mineral (Zhu, Gan et al. 2013).

No quadro abaixo, temos os resultados para o experimento proposto:

Quadro 4: Tabela de porcentagem de recuperação do metal tóxico pelo tipo de precipitação, biótica ou abiótica.

Metal Tóxico	Tipo de Interação	Recuperação
Cr(III)	Adsorção Superficial	0,01%
	Co-precipitação	2,43%
Mn(II)	Adsorção Superficial	0,03%
	Co-precipitação	2,09%
Cu(II)	Adsorção Superficial	0,01%
	Co-precipitação	6,15%

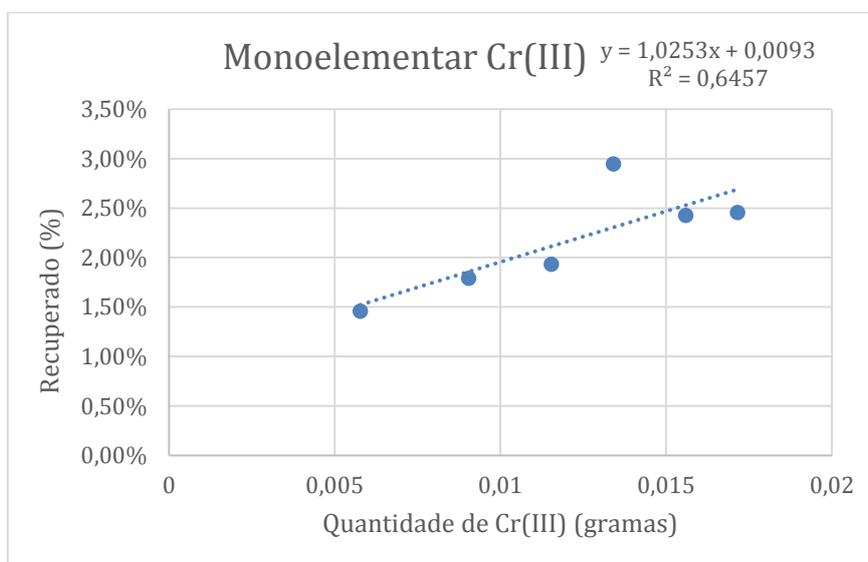
Fonte: o autor.

Pelos dados apresentados na tabela, podemos verificar que os valores de recuperação da Jarosita via cultura contendo a bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans* são consideravelmente maiores do que os encontrados via adsorção superficial, duas ordens de grandeza. Esse resultado pode indicar que a hipótese de o sequestro dos metais tóxico ser majoritariamente via adsorção superficial na matriz mineral, não está correta, a contribuição dessa interação é muito baixa. Então, com base nos dados acima, podemos concluir que co-precipitações via biótica com a cepa LR apresentam maior sequestro de metais tóxicos. Entretanto, necessitamos de mais dados para comprovar essa suposição.

Esse resultado está de acordo com as principais hipóteses encontradas na literatura (Valdés, Pedroso et al. 2008, Min, Li et al. 2017, Piervandi, Darban et al. 2020).

Ao analisar os dados obtidos, verificamos que não existe um padrão para os valores recuperação dos metais tóxicos, tanto em culturas monoelementares quanto em culturas multielementares. Desta maneira, vamos apresentar os dados em gráficos para indicar as tendências observadas em cada uma das culturas até seus valores de MTC. Iniciaremos mostrando os resultados das culturas monoelementares, especificamente o resultado para Cr(III), na figura 13.

Figura 13: Gráfico de quantidade em gramas de Cr III e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar.



Fonte: o autor.

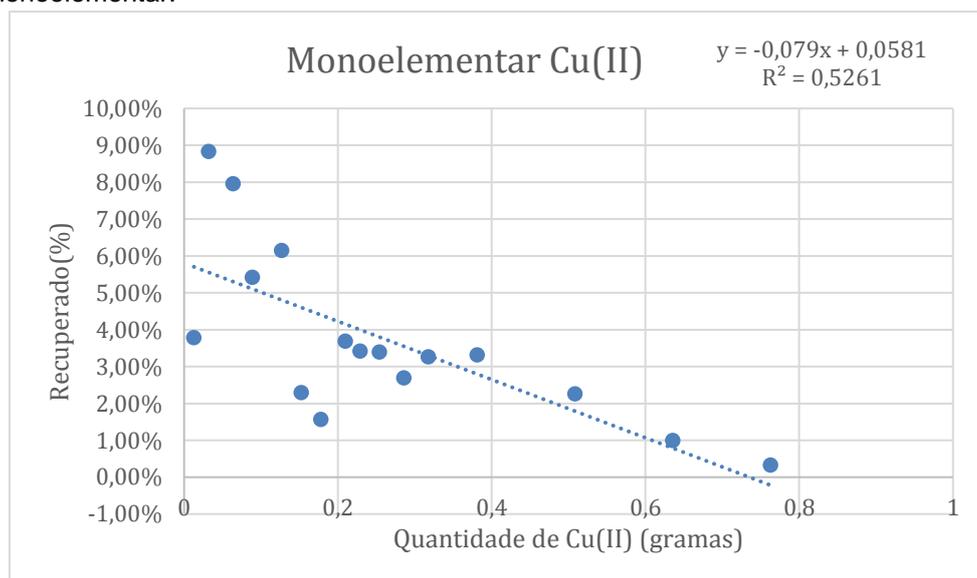
Pelo gráfico acima, como indicado anteriormente, apesar de termos poucos pontos experimentais, apresenta-se uma tendência de uma maior recuperação de Cr(III) quanto maior a quantidade de Cr(III) ofertado no meio. Comparando o resultado obtido com os dados da literatura, observamos que mesmo o valor no MTC, recuperação de 2,49%, difere em uma ordem de grandeza dos 75% do grupo de Piervandi (2020), podendo indicar que as cepas utilizadas por Piervandi e seus colaboradores, apresentam melhor desempenho na imobilização de Cr(III). Esse dado reforça que a ação da *Acidithiobacillus ferrooxidans* é essencial para o sequestro dos

metais estudados, uma vez que se o metabolismo bacteriano não tivesse efeito, os valores de imobilização seriam semelhantes.

Vale ressaltar que o experimento indicado (Piervandi, Darban et al. 2020), foi a metodologia com maior semelhança encontrado na literatura, entretanto o tempo de cultivo foi de 8 dias a mais.

A seguir, na figura 14, temos o gráfico referente as culturas monoelementares de Cu(II).

Figura 14: Gráfico de quantidade em gramas de Cu(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar.

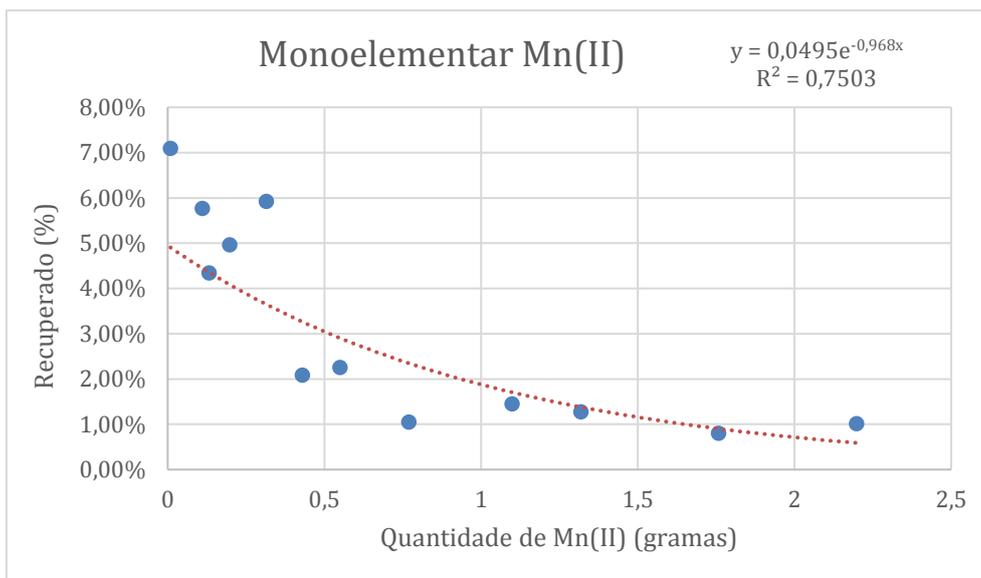


Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, como indicado anteriormente, apesar da maior dispersão nos pontos experimentais, observa-se uma tendência de haver uma menor recuperação de Cu(II) conforme há um aumento do metal ofertado no meio. Comparando o resultado obtido com os dados da literatura, observamos que o valor de recuperação está uma ordem de grandeza dos 68% do grupo de Piervandi (2020), mesmo se compararmos o melhor resultado de recuperação da cepa LR que utilizamos. Desta maneira, podemos indicar que as cepas utilizadas por Piervandi e seus colaboradores, apresentam melhor desempenho na imobilização de Cu(II), semelhante ao que foi encontrado em Cr(III).

A seguir, na figura 15, temos o gráfico referente as culturas monoelementares de Mn(II).

Figura 15 : Gráfico de quantidade em gramas de Mn(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura monoelementar.



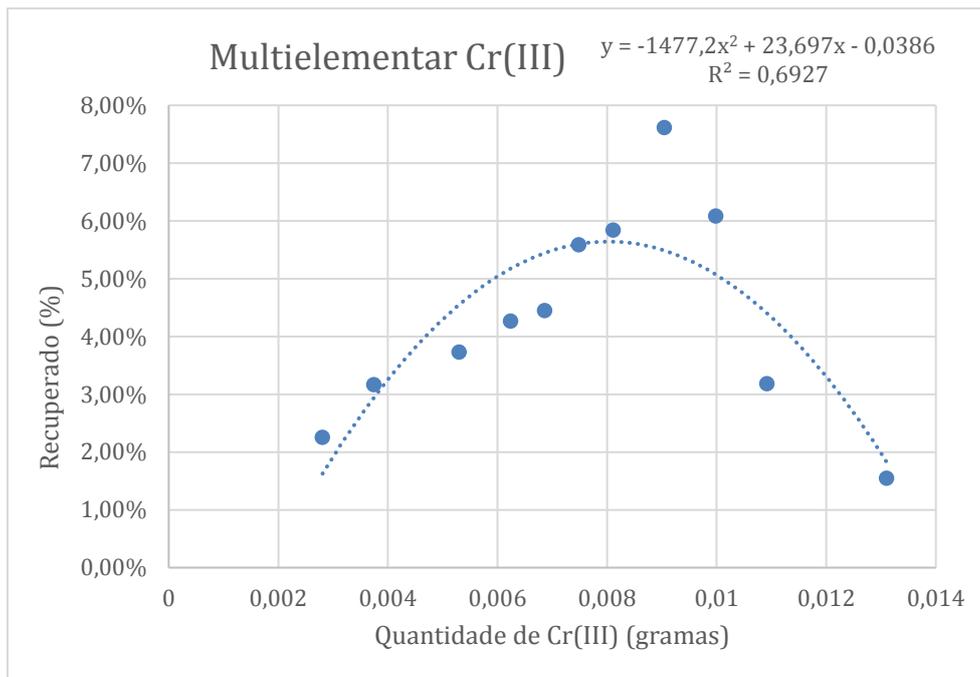
Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, de forma similar ao Cu, há uma tendência a uma menor recuperação de Mn(II) conforme aumenta-se a oferta do metal no meio, até que se atinja um valor de estabilidade. Comparando o resultado obtido com os dados da literatura, observamos que o valor de recuperação está uma ordem de grandeza dos 69% do grupo de Piervandi (2020), mesmo se compararmos o melhor resultado de recuperação da cepa LR que utilizamos. Desta maneira, podemos indicar que as cepas utilizadas por Piervandi e seus colaboradores, apresentam melhor desempenho na imobilização de Mn(II), semelhante ao que foi encontrado em Cr(III) e Cu(II).

Pelos dados obtidos nas monoculturas, podemos concluir de maneira geral que a cepa LR, apresenta pior eficiência na recuperação dos metais Mn(II), Cr(III) e Cu(II), comparado com os dados da literatura. Outra conclusão importante vem dos diferentes valores entre a literatura e os do presente projeto, que corroboram para indicar a relevância da ação do microrganismo na imobilização dos destes metais. Mais estudos são necessários para que se entenda a diferença dessas cepas e explicar os resultados observados.

A seguir, na figura 16, mostraremos os resultados de cada um dos metais estudados nas culturas multielementares. Iniciamos mostrando os resultados de Cr(III), logo abaixo:

Figura 16 : Gráfico de quantidade em gramas de Cr(III) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar.

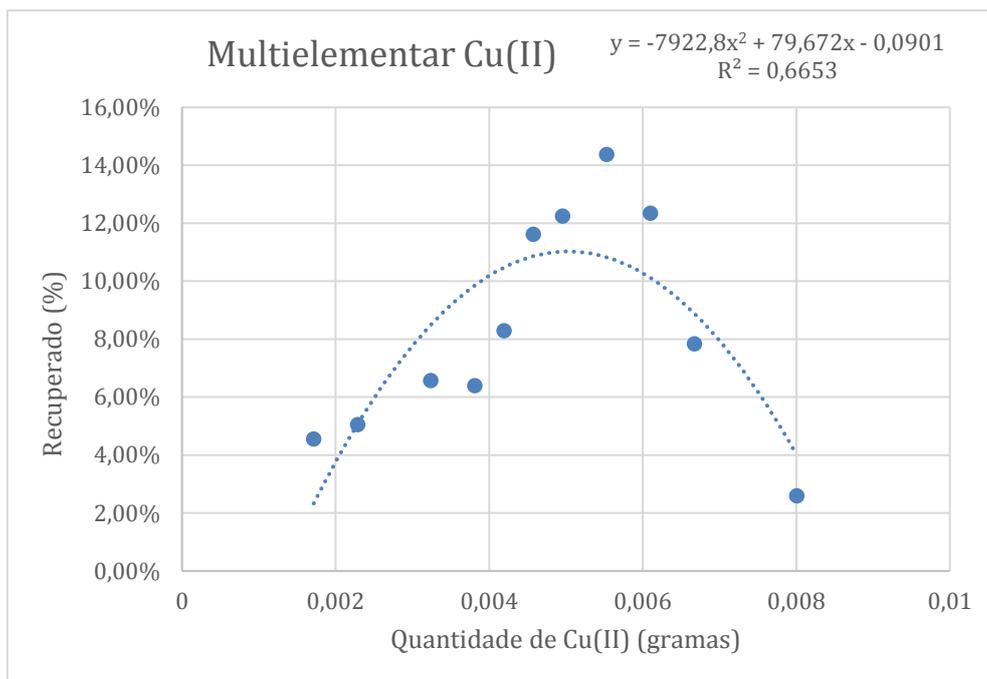


Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, como indicado anteriormente, não existe uma média clara no valor de recuperação de Cr(III), entretanto, podemos verificar que existe uma tendência de comportamento, onde inicialmente ocorre um aumento da porcentagem de recuperação com subsequente queda com o aumento da concentração do íon no meio. Os valores observados são maiores do que o observado em culturas monoelementares. Outro ponto, é que a tendência observada, é diferente da cultura monoelementar. Essas afirmações, indicam que diferentes composições do meio podem afetar diretamente o comportamento de recuperação de metais tóxicos. Comparando o resultado obtido com os dados da literatura, observamos o mesmo que foi observado nas culturas multielementares, o valor de recuperação está uma ordem de grandeza dos 69% do grupo de Piervandi (2020), mesmo se compararmos o melhor resultado de recuperação.

A seguir, na figura 17, temos o gráfico referente as culturas monoelementares de Cu(II).

Figura 17 : Gráfico de quantidade em gramas de Cu(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar.

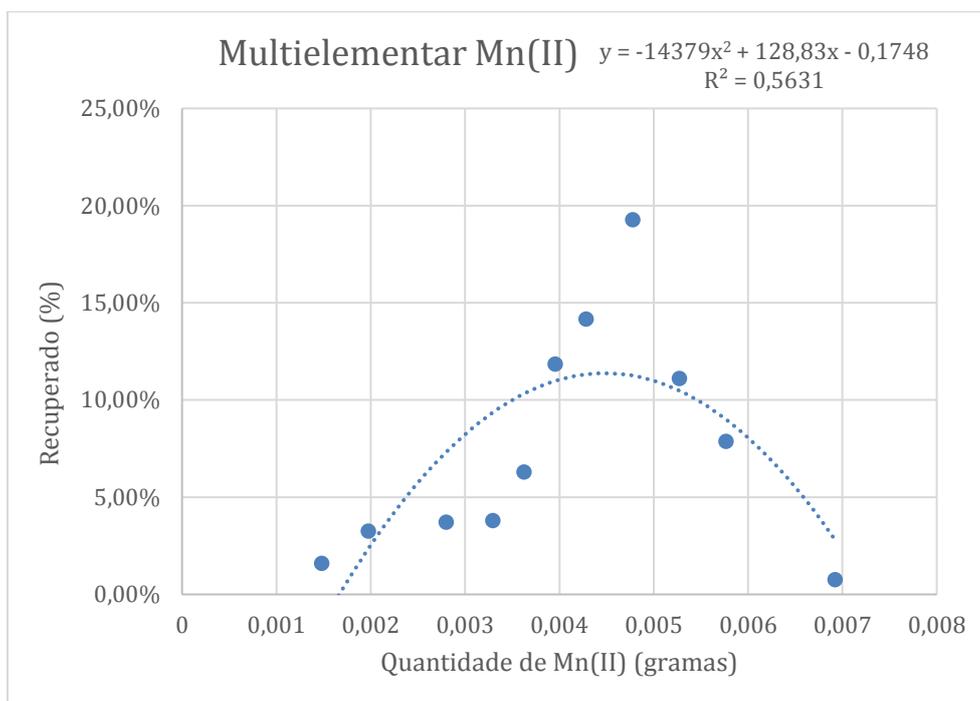


Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, como indicado anteriormente, não existe uma média clara no valor de recuperação de Cu(II), entretanto, podemos verificar que existe uma tendência de comportamento semelhante ao observado em Cr(III), com diferença nos valores de recuperação. Foi observado também como na comparação anterior, que a porcentagem de recuperação foi maior, entretanto ainda é menor que o valor indicado na literatura.

Esse mesmo comportamento foi observado para Mn(II), na cultura de multielementar, mostrado na figura 18.

Figura 18 : Gráfico de quantidade em gramas de Mn(II) e quantidade recuperada em porcentagem em cultura multielementar.



Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, como indicado anteriormente, ocorreu o mesmo comportamento que o observado em Cu(II) e Cr(III), com maior recuperação do metal. Esse dado indica que as culturas multielementares são uma maneira de obter uma maior porcentagem de recuperação dos minerais. Outro fator interessante é a correspondência entre os pontos de cada um dos gráficos dos metais nas culturas multielementares, o que indica que possivelmente o processo de co-precipitação ocorre de por mecanismo semelhante para todos os metais, o que reforçaria a hipótese de Piervandi e seu colaboradores (2020), que sugerem a formação de uma camada de passivação como modo de co-precipitação.

Em resumo, observamos que ocorre uma variação da porcentagem de recuperação conforme o meio de cultura utilizado, sendo que a cepa LR apresenta um menor valor que o encontrado na literatura. Mais estudos podem ser feitos para melhorar esse percentual. No contexto de exploração espacial, como foi dito, maior rendimento e processo mais otimizado é sempre desejado, mas não se pode descartar essa cepa, que pode ser útil para alguns procedimentos. Ainda assim, seria interessante buscar uma cepa ou microrganismo que apresente um maior rendimento.

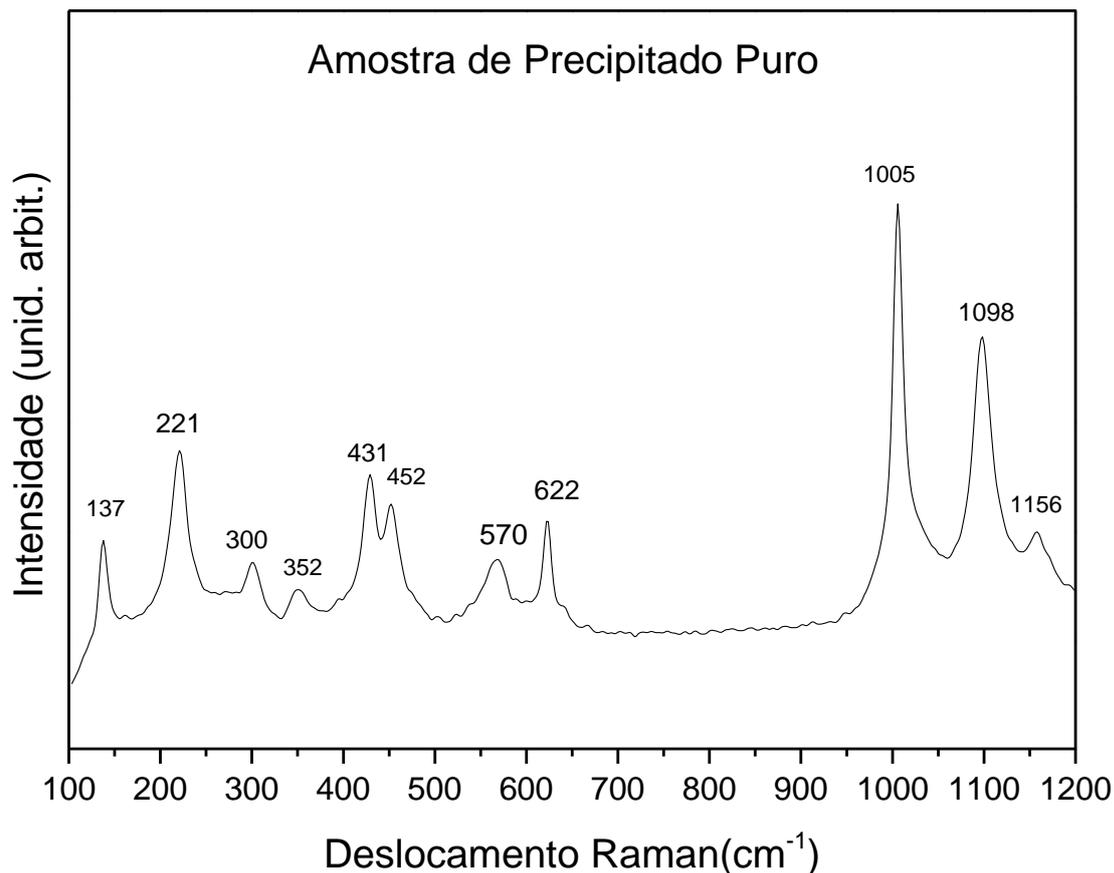
Adicionalmente, obtivemos dados que descartam a possibilidade de adsorção superficial como principal método de sequestro da Jarosita e corroboram para que a hipótese de que ocorre coprecipitação via formação de camada de passivação.

### **5.5) Espectroscopia Raman**

A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada com o intuito de se caracterizar o precipitado dos cultivos, pois, como dito anteriormente, esta técnica fornece informações da estrutura molecular e, dependendo do sistema, pode fornecer também estimativa da cristalinidade e fornecer indícios de mudança estrutural com diferentes metodologias de síntese, podendo ser verificada até impurezas no mineral e misturas de minerais (Das and Hendry 2011). No estudo, o enfoque foi na identificação do mineral e em entender comparativamente as alterações estruturais, observando-se se ocorreu algum deslocamento nas bandas do espectro deste mineral gerado pela inclusão da estrutura dos metais estudados contidos no meio de cultura.

Primeiramente usou-se essa técnica para se confirmar que o precipitado nos cultivos eram Jarosita, uma vez que apenas dados da coloração podem gerar equívocos. A amostra de possível Jarosita foi obtida a partir de um cultivo sem os metais alvo, no tempo sugerido pela literatura (Wang, Bigham et al. 2006). A figura 19 mostra o espectro Raman da amostra relatada na literatura como possivelmente Jarosita.

Figura 19: Espectro Raman de uma amostra obtida e caracterizada como Jarosita.



Fonte: o autor.

Pelo espectro é possível identificar as principais bandas, localizadas em 127, 221, 300, 352, 431, 452, 570, 622, 1005, 1098 e 1156  $\text{cm}^{-1}$ . Esses valores estão de acordo com a literatura (Filippi, Machovič et al. 2009, Das and Hendry 2011) para a Jarosita Sódica (Na-Jarosita), apenas com pequenas diferenças no valor máximo de algumas bandas, que pode ser explicado pelo sinal de fundo do espectro ou ainda porque as amostras de Jarosita de referência são de fontes abióticas. No Quadro 5 abaixo temos os valores obtidos no precipitado comparado com os padrões na literatura:

Quadro 5: Comparação das bandas de espectros Raman do mineral Jarosita, segundo a referência e segundo este trabalho.

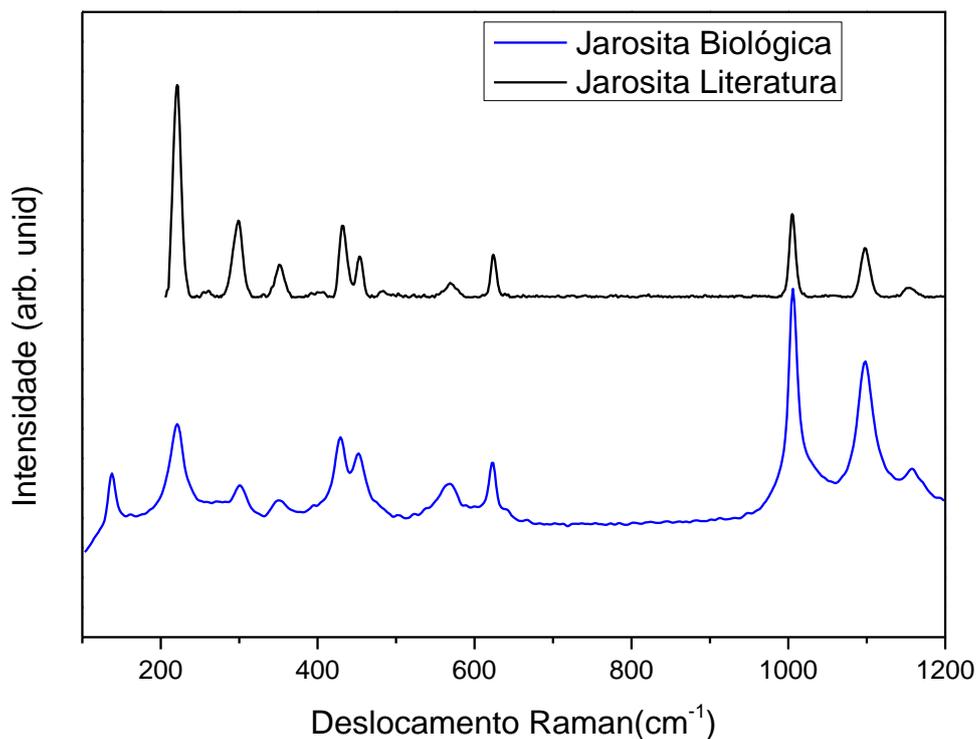
Fonte	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Referência
Precipitado biogênico obtido pela A. <i>ferrooxidans</i>	127, 221, 300, 352, 431, 452, 570, 622, 1005, 1098 e 1156	Presente Trabalho
Na-Jarosita	134, 221, 288, 356, 436, 555, 618, 1008 e 1105	(Das and Hendry 2011)
Na-Jarosita	138, 222, 298, 354, 432, 451, 574, 624, 641, 1006, 1103, 1153	(Filippi, Machovič et al. 2009)

Fonte: o autor.

Das e Hendry (2011) consideram duas bandas a menos no espectro comparado com Filippi e colaboradores(2009), que atribuem 12 bandas, enquanto que no espectro Raman obtido da amostra se observam claramente 11 bandas. Essa diferença é devido a faixa do espectro obtida que foi mais ampla que as utilizadas na literatura, desta maneira, temos as mesmas bandas características da Jarosita. Análises de difração de raios X já realizadas pelo grupo (dados não mostrados nessa dissertação) confirmam os resultados obtidos por espectroscopia Raman.

Afim de se obter mais um dado para a confirmação do mineral precipitado, comparou o espectro que foi obtido do precipitado com um espectro padrão retirado da plataforma RUFF (Lafuente, Downs et al. 2015), mais especificamente *Jarosite X050106* (Murphy, Smith et al. 2009). A comparação pode ser vista na figura 20.

Figura 20: Espectro Raman do precipitado biótico em comparação com o espectro da Jarosita X050106.

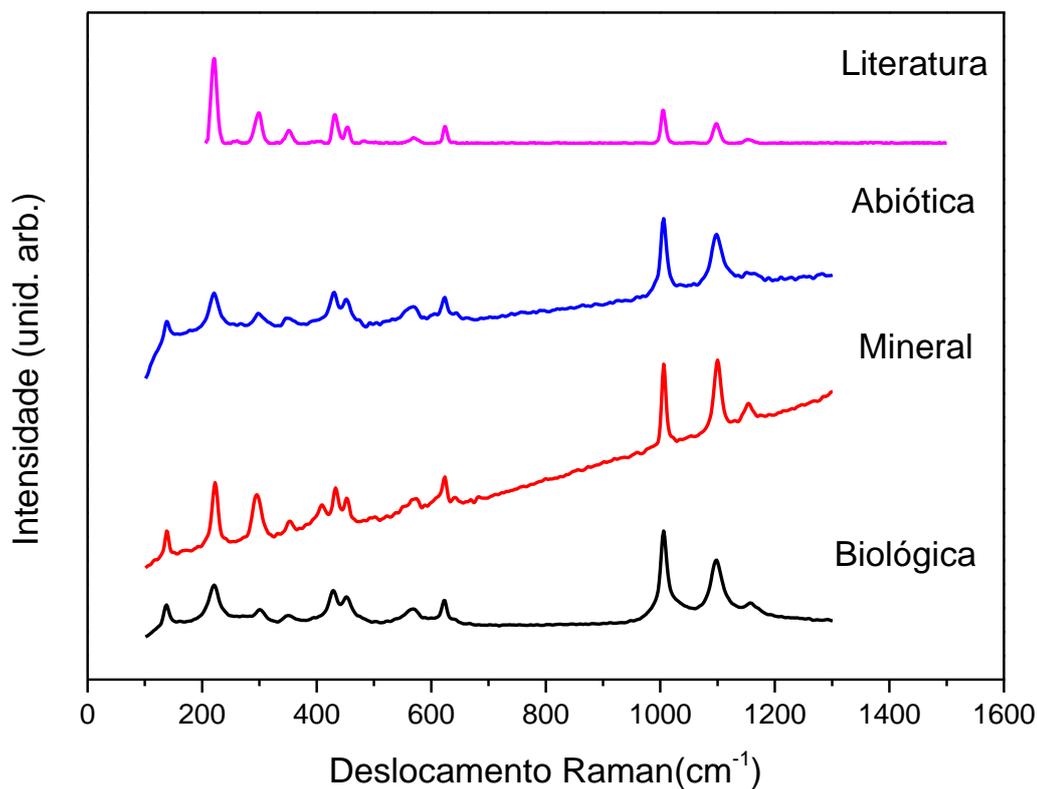


Fonte: o autor.

Podemos visualizar na figura 20 que os espectros são semelhantes, tendo as mesmas bandas observadas tanto no espectro da Jarosita encontrada na literatura como no espectro do precipitado biogênico.

Por fim, realizou-se a comparação com os espectros obtidos da Jarosita Mineral, Jarosita de precipitação abiótica e novamente a Jarosita X050106 (referência da literatura), mostrado na figura 21.

Figura 21: Espectro Raman do precipitado biótico em comparação com o espectro da Jarosita X050106.

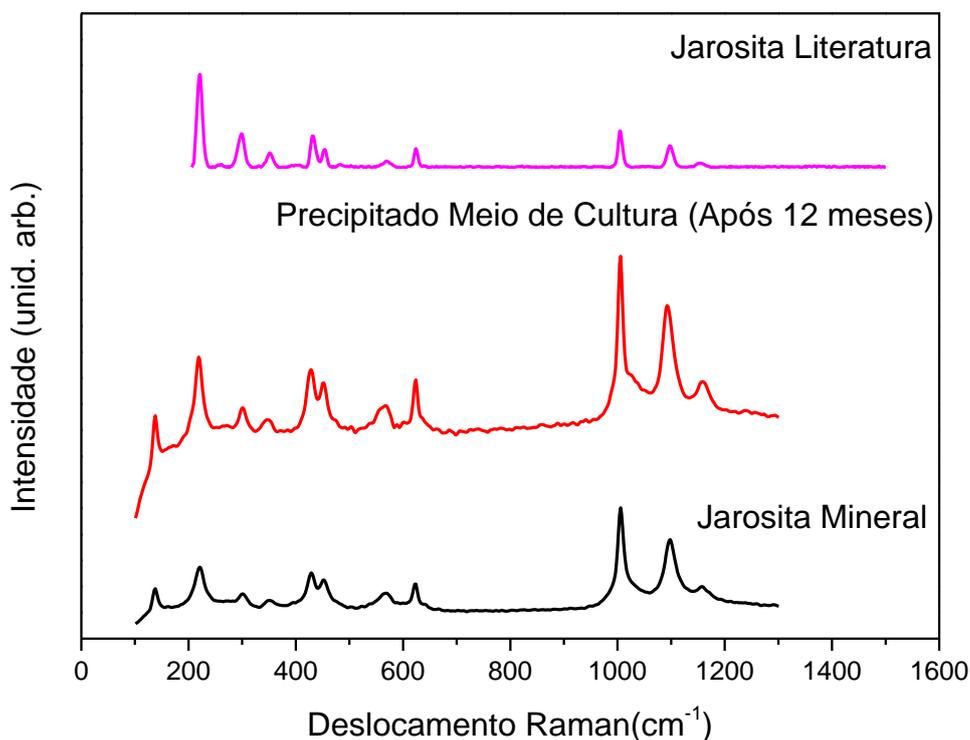


Fonte: o autor.

Podemos observar pelo gráfico acima que existe correlação entre as bandas características para Jarosita nos 4 espectros, apesar da Jarosita Mineral apresentar outras bandas que podem ser de contaminantes da matriz. Desta maneira, é possível afirmar que os precipitados obtidos são realmente Jarosita. Esta confirmação também corrobora a utilização do sistema de cores de Munsell para a Jarosita.

Em seguida, buscamos identificar o precipitado gerado no controle negativo, gerado após 12 meses de incubação, conforme mostrado na figura 22.

Figura 22: Espectro Raman do precipitado abiótico obtido depois de 12 meses de incubação do Controle Negativo em comparação com o espectro da Jarosita X050106 e a Jarosita Mineral.



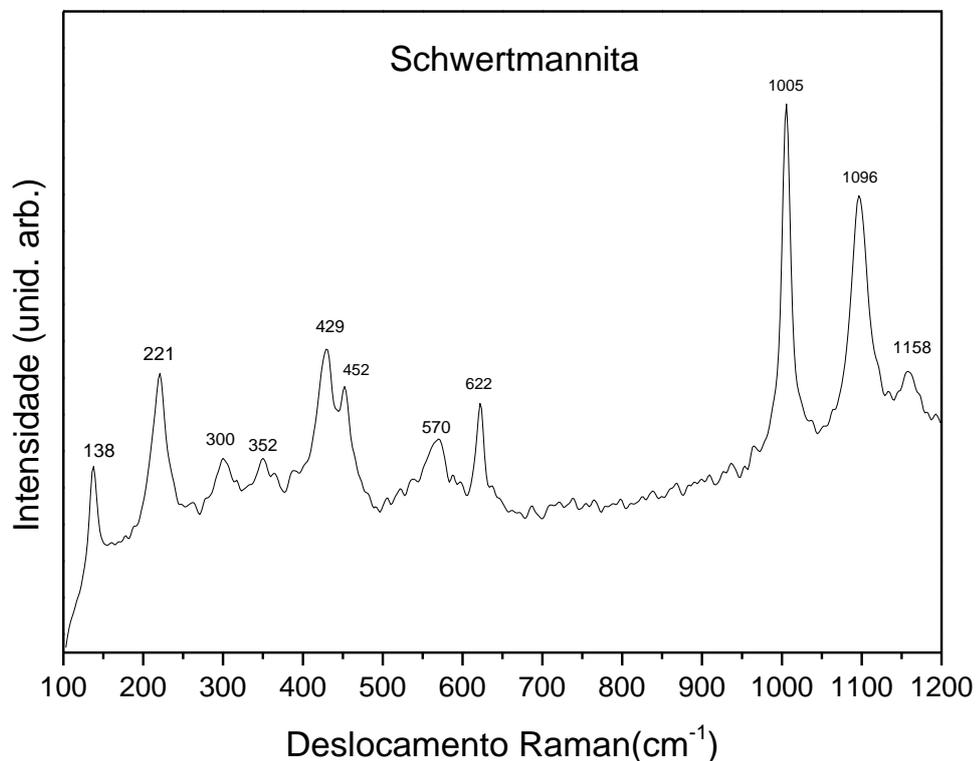
Fonte: o autor.

Podemos observar pelos dados obtidos que o precipitado formado no controle abiótico foi Jarosita, pois ao observamos as bandas dos espectros, observamos que ocorre correspondência entre todas as bandas obtidas. Desta maneira, temos que, no controle abiótico após 12 meses, ocorre a formação de Jarosita, mesmo sem a presença da *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

A seguir, com o objetivo de se verificar a formação de Schwertmannita pelo cultivo em meio isento dos metais alvo, realizou-se a retirada do precipitado do meio de cultura com 7 dias de cultivo, a coloração do meio era 8YR. O precipitado obtido

tinha a mesma coloração e foi submetido à técnica, espectro pode ser verificado na figura 23.

Figura 23 : Espectro Raman de uma amostra de possível Jarosita.



Fonte: o autor.

Podemos verificar que as bandas obtidas no espectro Raman são semelhantes aqueles encontrados no espectro da Jarosita. No Quadro 6 mostra a comparação dos valores de máximo das bandas da amostra de possível Schwertmannita e a encontrada na literatura:

Quadro 6: Comparação das bandas de espectros Raman dos mineirais Jarosita e Schwertmannita, referência e experimental.

Fonte	Bandas (cm <sup>-1</sup> )	Referência
Possível Schwertmannita	138, 221, 300, 352, 429, 452, 570, 622, 1005, 1096 e 1158	Presente Trabalho
Schwertmannita	294, 318, 350, 421, 544, 580, 715, 981 e 1120	(Mazzetti and Thistlethwaite 2002)
Na-Jarosita	138, 222, 298, 354, 432, 451, 574, 624, 641, 1006, 1103, 1153	(Filippi, Machovič et al. 2009)

Fonte: o autor.

É possível ver que ocorre uma grande discrepância dos valores da amostra de possível Schwertmannita com os valores de referência da Schwertmannita, enquanto ocorre correspondência com os valores de Jarosita. Isto indica que a amostra é Jarosita com uma coloração 8YR. Apesar da retirada do precipitado ainda com coloração dita na literatura (Wang, Bigham et al. 2006) como Schwertmannita, a análise Raman revelou que se trata de Jarosita. A coloração pode ser efeito da estrutura não estar completamente organizada uma vez que quando a coloração está amarelada a Jarosita está mais bem estruturada (Das and Hendry 2011, Jones, Bigham et al. 2014). Este resultado indica que uma análise simples por coloração de Munsell é falha para distinguir a Schwertmannita, o contrário que observamos no caso da Jarosita, necessitando de uma análise mais específica para se identificar o material.

Além disso, este resultado leva a questionar alguns pontos importantes. Em primeiro lugar, quanto tempo a Schwertmannita se mantém estável no cultivo antes de se transformar em Jarosita? Este questionamento deve ser analisado fazendo testes em precipitados retirados em diferentes tempos de cultivo, todos eles menores que 7 dias que foi o tempo utilizado para a retirada da suposta Schwertmannita. Em segundo lugar, se o tratamento utilizado para a obtenção do precipitado pode interferir no processo de transformação da Schwertmannita em Jarosita? Existe ainda a possibilidade de não ocorrer a formação de Schwertmannita por esta cepa, entretanto há um grande número de relatos na literatura (Cabrera, Gomez et al. 2005, Appia-

Ayme, Quatrini et al. 2006, Valdés, Pedroso et al. 2008) que corroboram essa formação. Uma possível explicação é que o tempo deixado, no presente trabalho, até a retirada e análise do precipitado tenha sido muito grande. Optou-se por esse período de tempo devido às medidas de coloração, que se mostraram inadequadas para esse mineral.

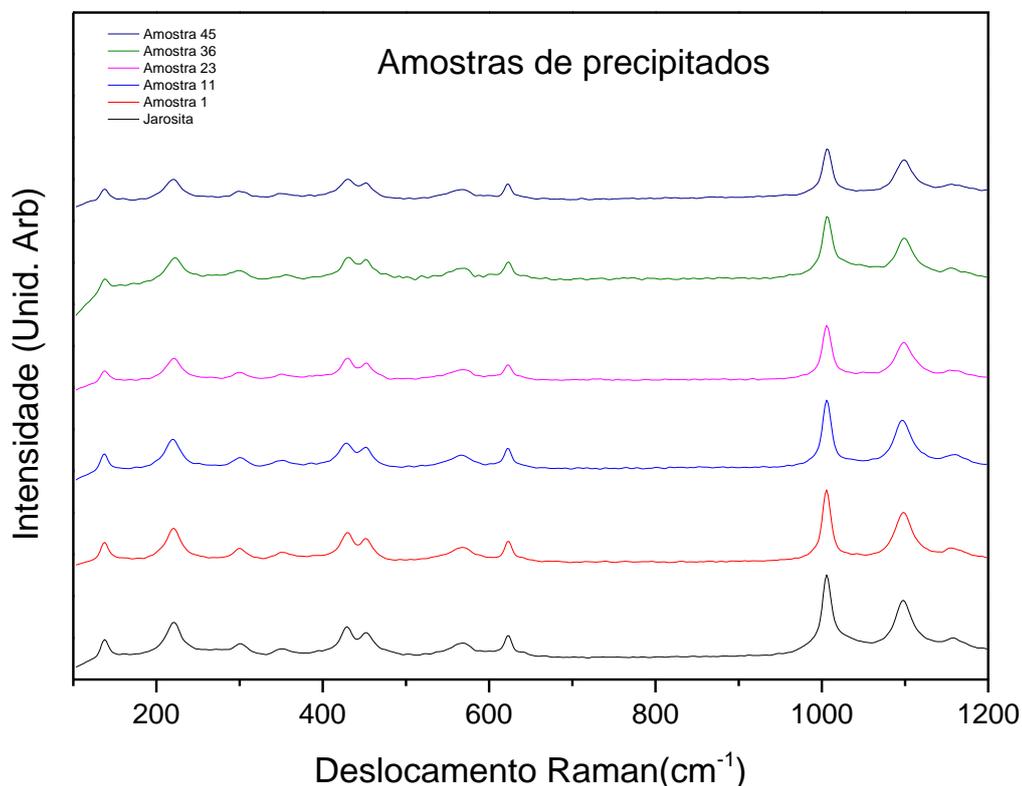
### **5.5.1) Análise dos espectros Raman das amostras de Jarosita com os metais alvo**

A seguir foram analisados os espectros Raman dos precipitados obtidos das culturas contendo os metais estudados, tanto nos meios multielementares quanto monoelementares.

Com o objetivo de se verificar se esses metais de alguma forma alteraram o espectro da Jarosita precipitada, comparou-se os espectros Raman com o espectro padrão da Jarosita biológica anteriormente.

Começaremos indicando os resultados obtidos para culturas multielementares. Como foram obtidos um total de 47 espectros, foram escolhidos os espectros de apenas alguns pontos, para serem mostrados. As amostras com numeração maior tem maior concentração do conjunto dos 3 metais tóxicos. A figura 24 mostra o espectro Raman dos precipitados gerados por cultivos contendo metais tóxicos.

Figura 24: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios com concentrações crescentes de metais tóxicos. A amostra 1 corresponde a uma concentração de  $6,75E-04$  mol/L, amostra 11 de  $9E-04$  mol/L, amostra 23 de  $1,5E-03$  mol/L, amostra 36 de  $2,4E-03$  mol/L e amostra 45 de  $3,23E-03$  mol/L.



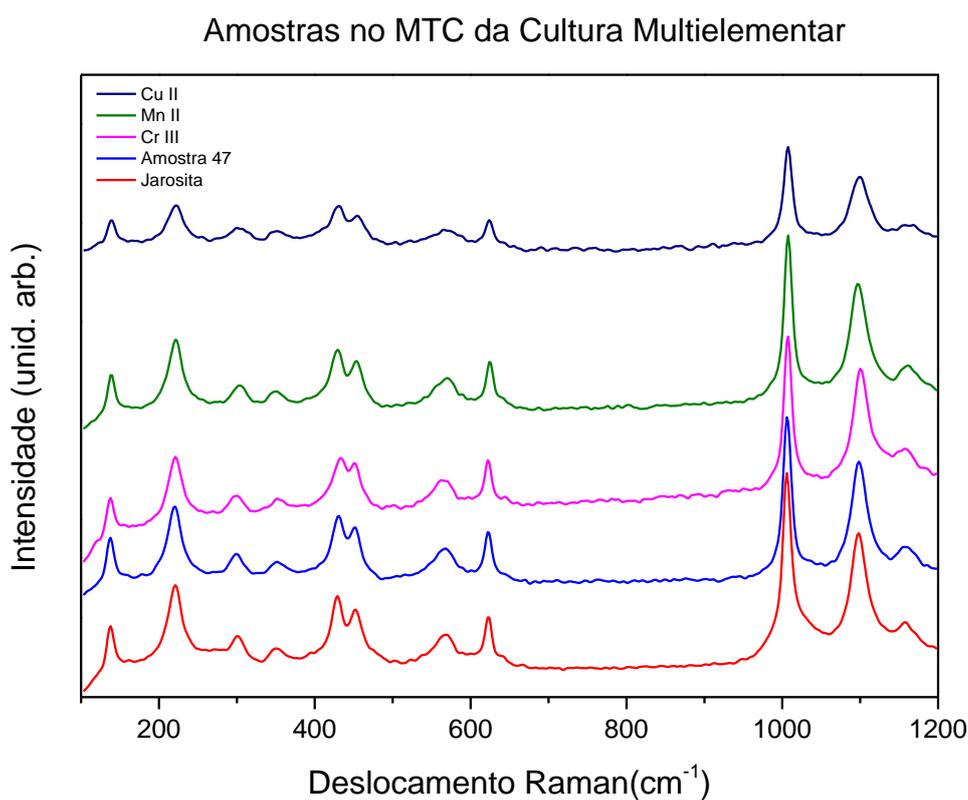
Fonte: o autor.

Nos dados acima é possível verificar que o padrão espectroscópico, com as 11 bandas, se repete em todas as amostras, não sendo observada nenhuma diferença significativa nos espectros obtidos em relação a posição das bandas e a largura, observando-se apenas uma pequena diferença em relação a intensidade relativa. Apesar da literatura (Min, Li et al. 2017) reportar que o precipitado sequestra, de maneira ainda não compreendida, alguns cátions, não é perceptível alteração utilizando espectroscopia Raman em precipitado retirado de meio de cultura multielementar. Uma possível explicação para a falta de sinal pode ser a baixa quantidade de metais tóxicos no meio de cultura, o que não geraria uma assinatura espectroscópica reconhecível. Entretanto isso não pode ser verificado uma vez que a bactéria atingiu seu MTC e não é possível mais culturas para se explorar essa

hipótese. Dados de difração de raios X obtidos pelo grupo mostram diferenças na estrutura cristalina desses minerais e serão exploradas em futuros trabalhos.

Visando comparar o efeito isolado de cada um dos metais tóxicos no MTC da cultura multielementar, foram retirados precipitados formados a partir de meios de cultura monoelementares, Cu(II), Mn(II) e Cr(III), na concentração de MTC do cultivo Multielementar. Essa comparação pode ser verificada na figura 25.

Figura 25: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios contendo apenas Cu(II), Mn(II), Cr(III) e na Multielementar (Amostra 47). As concentrações dos metais estudados estão no MTC da cultura multielementar.

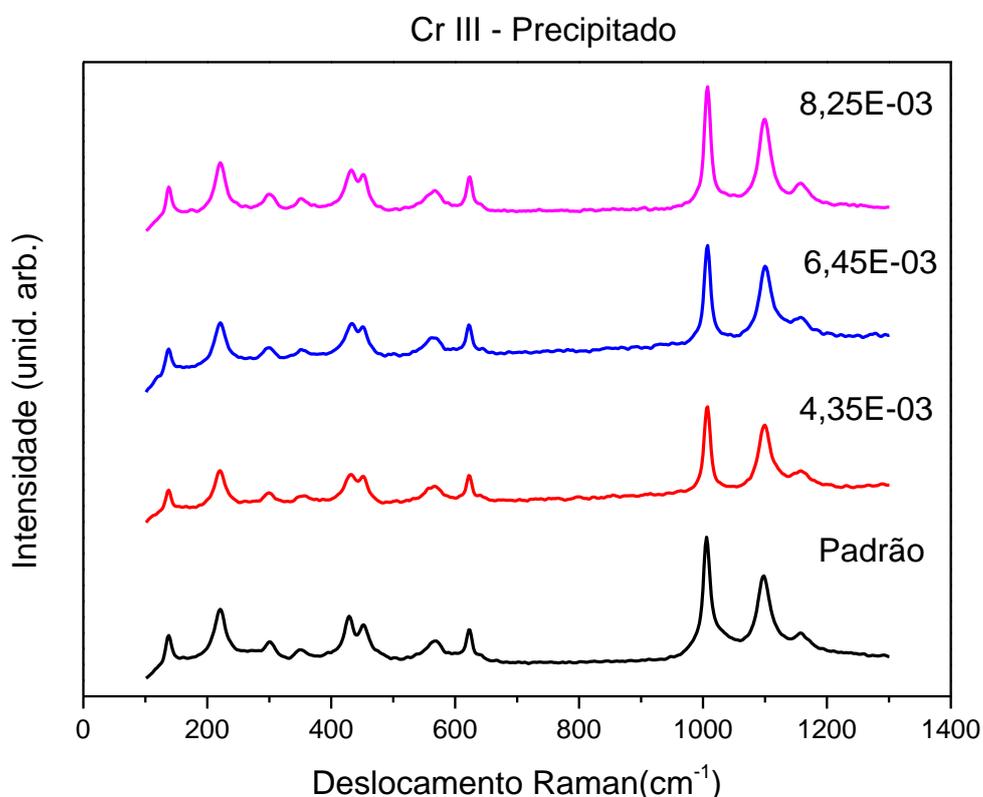


Fonte: o autor.

Comparando os espectros mostrados acima, temos que o padrão e posição de bandas se mantém, entretanto pode-se notar que existe alargamento de algumas bandas no espectro da amostra com Cu(II), perceptível na banda  $580 \text{ cm}^{-1}$ . Nas demais amostras com apenas um dos metais, não é perceptível de forma tão clara essa mudança. Mais abaixo discutiremos a possibilidade exposta nesse parágrafo, quando analisamos a largura das bandas obtidas.

Iniciando os resultados referentes as culturas monoelementares, abaixo apresentamos o gráfico referente aos espectros das culturas de Cr(III), mostrados na figura 26.

Figura 26: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Cr(III) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.

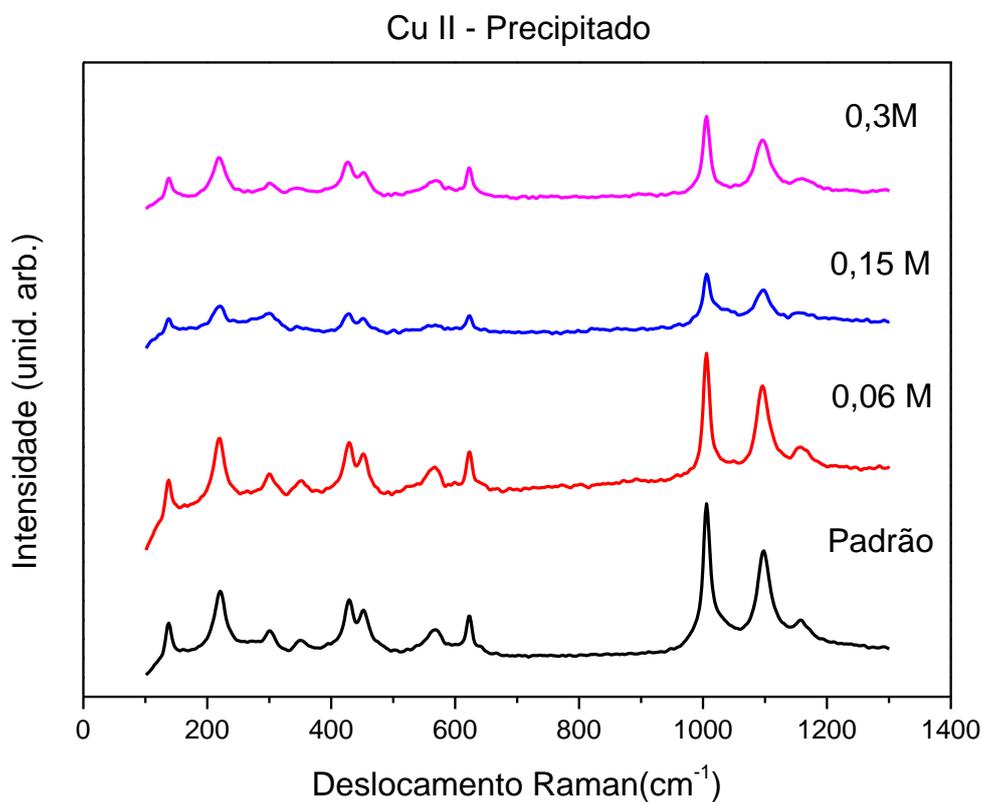


Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima podemos verificar que nas culturas monoelementares de Cr III, o padrão das bandas dos espectros, classificam os precipitados como Jarosita. Podemos notar apenas no MTC da cultura é possível verificar um indício de surgimento de uma banda na posição 173, o que pode ser um indicativo para a contaminação com Cr(III). Entretanto, no caso específico da cultura com a cepa LR, não foi possível verificar se em culturas em maiores concentrações, pois a cultura já está no seu MTC. Analisando os gráficos, não é notável a priori a presença de uma tendência de alteração da largura das bandas.

A seguir a figura 27 mostra os espectros das culturas contendo Cu(II).

Figura 27: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Cu(II) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.



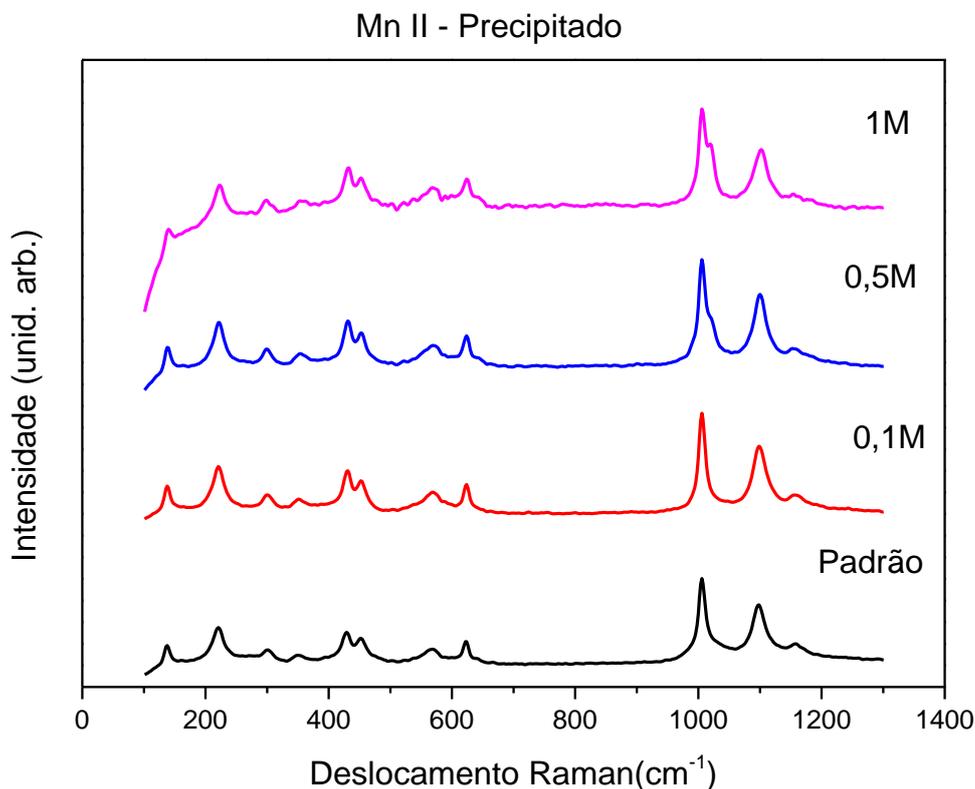
Fonte: o autor.

Pela figura acima, podemos verificar que nas culturas monoelementares de Cu(II), o padrão das bandas dos espectros classificam os precipitados como Jarosita.

Podemos notar também que temos indícios de ocorrerem variações na largura média das bandas ou na intensidade do sinal. Entretanto, analisando os dados, não verificamos um padrão significativo ou tendência para corroborar com essa hipótese.

Na figura 28 são mostrados os espectros das culturas de Mn(II).

Figura 28: Espectro Raman das amostras de Jarositas retiradas de meios monoelementares Mn(II) em comparação com a Jarosita retirada de meio sem metais tóxicos.

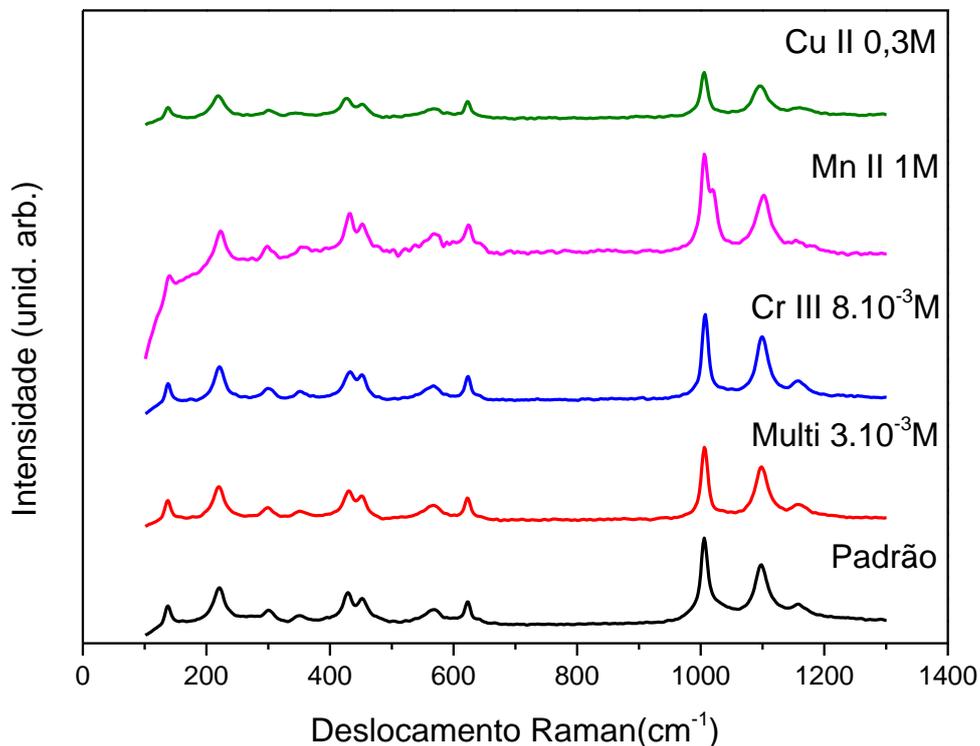


Fonte: o autor.

Pelo gráfico acima, podemos verificar que nas culturas monoelementares de Mn(II), o padrão das bandas dos espectros, classificam os precipitados como Jarosita. Podemos notar que a partir de concentrações de 0,5M, é possível verificar o surgimento de uma banda na posição  $1024 \text{ cm}^{-1}$ , o que pode ser um indicativo para a contaminação com Mn(II). Analisando os gráficos, é possível verificar algumas alterações na largura média da banda (, que serão analisadas mais a frente.

Por fim, temos o gráfico referente aos espectros das culturas em seus respectivos MTCs.

Figura 29: Espectro Raman das amostras de Jarositas em seus respectivos MTCs: monoelementar Cu(II), monoelementar Mn(II), monoelementar Cr(III) e Multielementar (Amostra 47 em comparação com a Jarosita retirada de meio sem os metais).



Fonte: o autor.

Comparando os espectros das culturas em seus respectivos MTCs, podemos verificar que o número de bandas se mantém igual com variação na intensidade, principalmente nas culturas monoelementares de Cu(II), e a aparição de uma banda no espectro do precipitado de Mn(II), ponto que pode ajudar na identificação da contaminação do mineral por esse metal tóxico. Desta maneira, podemos concluir pela análise dos gráficos que independente da composição dos metais estudados, os precipitados gerados em seu final são Jarosita, como indicado na literatura (Cabrera, Gomez et al. 2005, Valdés, Pedroso et al. 2008).

Ao fim das análises dos perfis gráficos dos espectros, nos deparamos com alguns indícios e a hipótese de que com aumento da concentração dos metais tóxicos ocorre uma mudança na largura das bandas. Desta maneira, foi calculada a Largura a Meia Altura (LMA, ou *Full Width at Half Maximum* – FWHM, em inglês) em cada uma das 11 bandas assinaturas da Jarosita de todas as amostras, monoelementares e no multielementar, com o intuito de verificar se há alguma tendência.

Após essas análises (alguns dos resultados não foram mostrados), foi possível verificar que a LMA das bandas Raman das Jarositas com preparo mono e multielementar com Cu(II) não apresentam tendência de alargamento ou estreitamento nas bandas. Para os outros dois metais estudados, algumas tendências em algumas bandas puderam ser identificadas e serão mostradas e discutidas a seguir, conforme tabela 7.

Quadro 7 : Bandas que apresentaram tendência nas Jarositas obtidas em meio contendo um dos metais estudados.

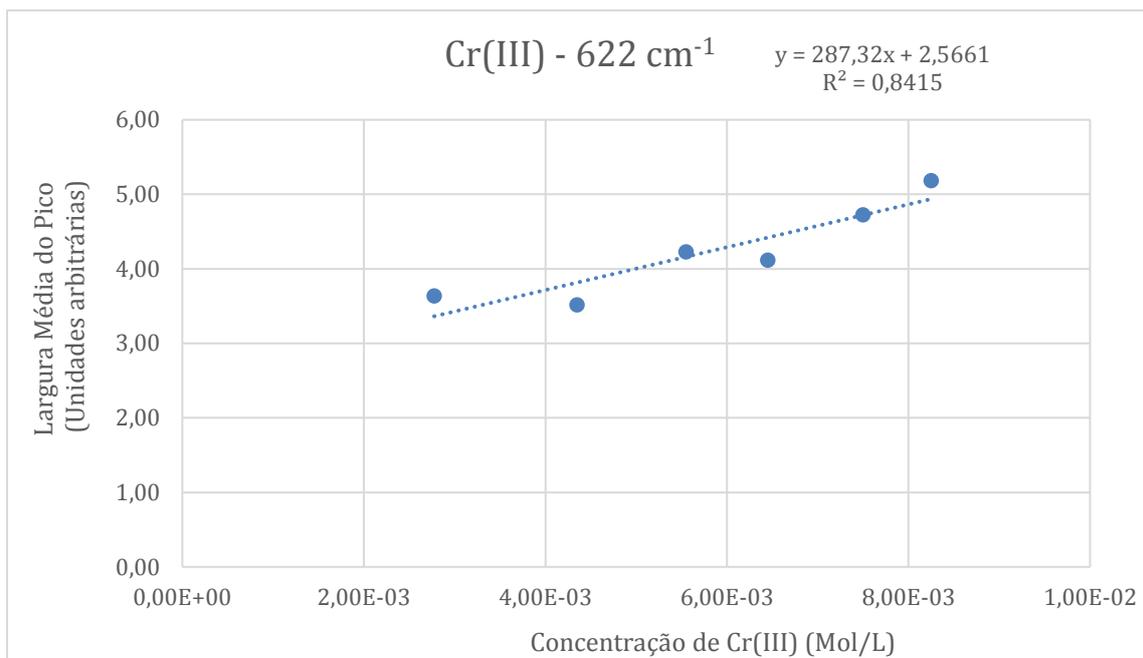
Metal	Banda (cm <sup>-1</sup> )
Cr(III)	85, 622 e 1158
Mn(II)	352, 570, 622, 1005, 1098 e 1158

Fonte: o autor.

Pelos dados da tabela 7 podemos identificar que a variação da LMA é mais evidente nas culturas contendo Mn(II), possivelmente porque o MTC da *Acidithiobacillus ferrooxidans* é maior para esse metal em comparação com Cr(III). Mas efeitos do próprio metal na estrutura e de sua carga não podem ser desconsiderados.

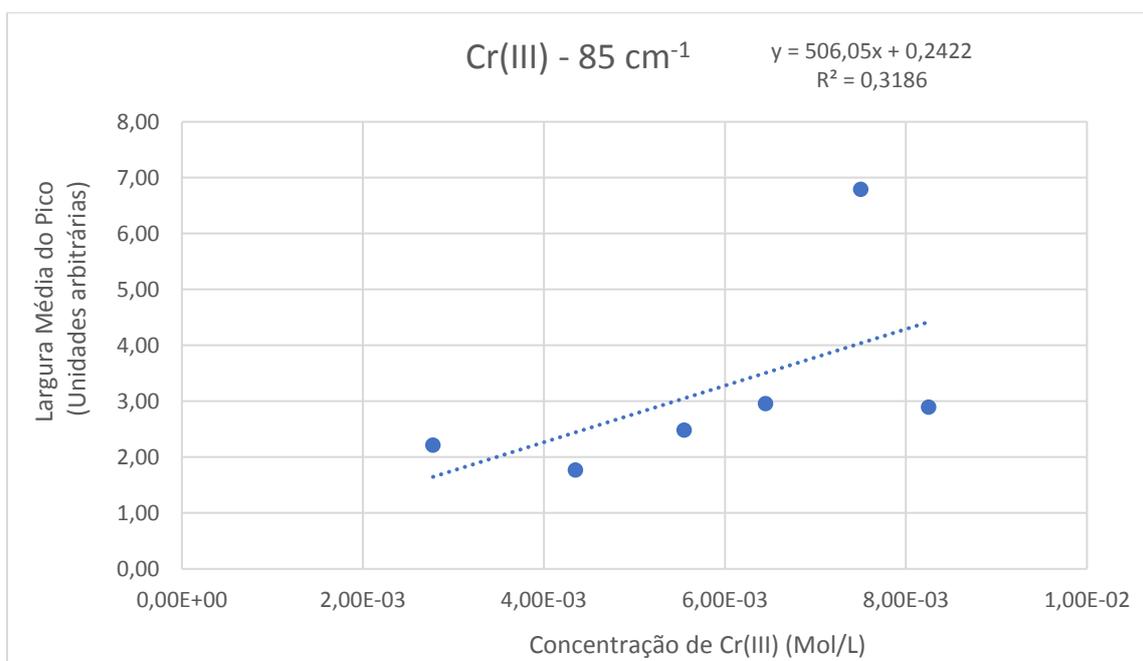
As figuras 30 a 32 ilustram as tendências encontradas nas bandas dos espectros dos precipitados oriundos de culturas monoelementares de Cr(III).

Figura 30: Gráfico da Largura a Meia Altura a meia altura da banda  $622\text{ cm}^{-1}$  pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III).



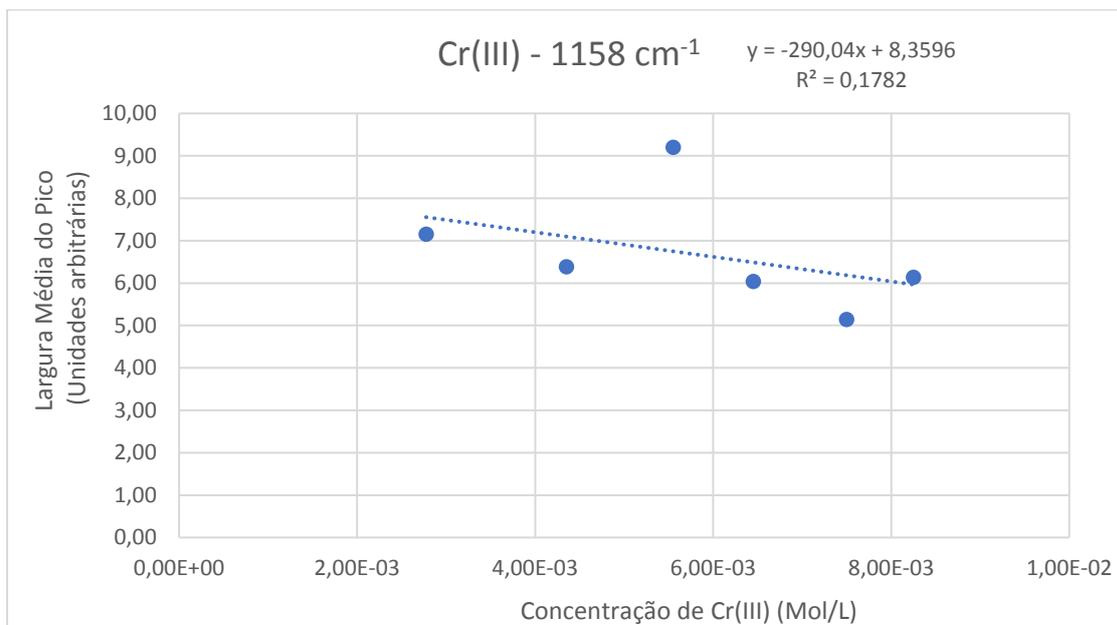
Fonte: o autor.

Figura 31: Gráfico da Largura a Meia Altura a meia altura da banda  $85\text{ cm}^{-1}$  pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III).



Fonte: o autor.

Figura 32: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1158 cm<sup>-1</sup> em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Cr(III) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Cr(III).

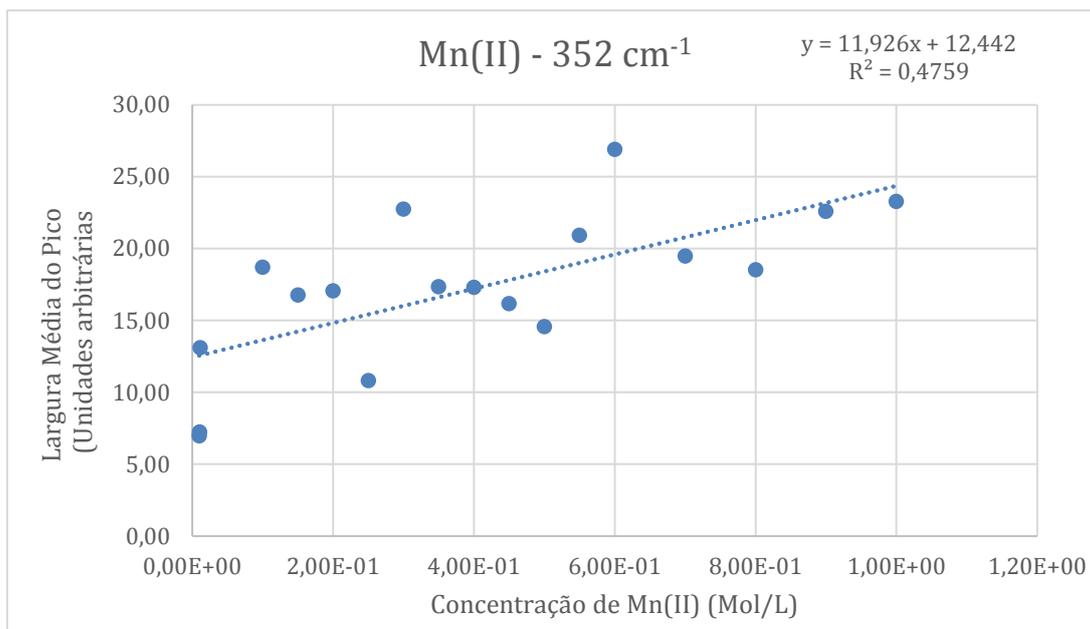


Fonte: o autor.

Apesar de apresentarmos apenas 6 pontos, devido a baixa resistência do microrganismo a Cr(III), podemos ver que existe um indicativo de tendência nas bandas indicadas. O que pode ser um estudo interessante para cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ou outros microrganismos, que apresentam maior resistência.

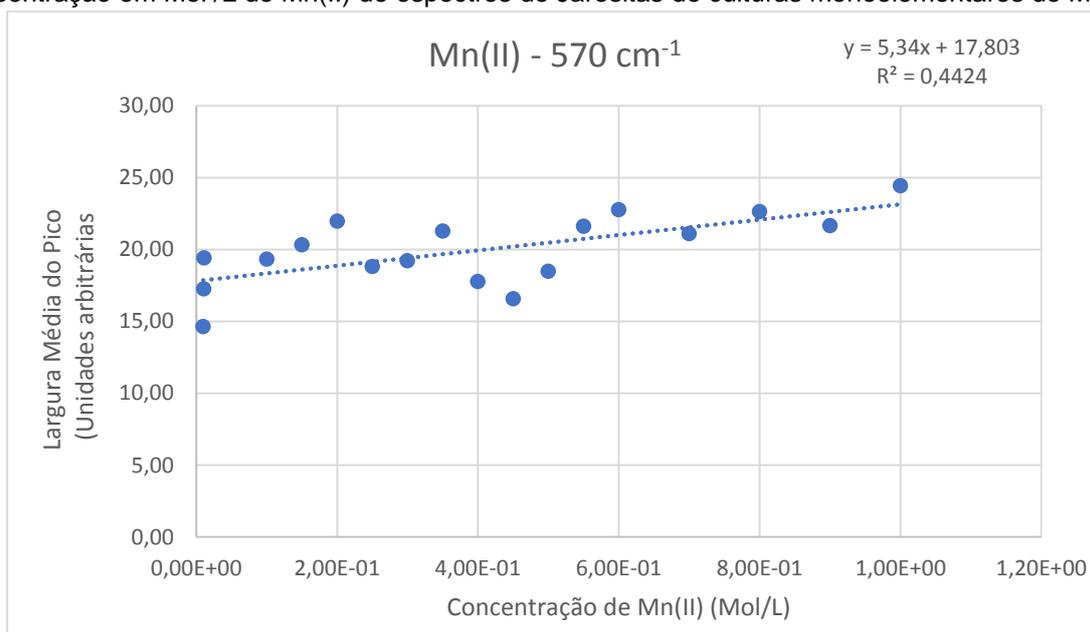
As figuras 33 a 38 ilustram as tendências encontradas nas bandas dos espectros dos precipitados oriundos de culturas monoelementares de Mn(II).

Figura 33: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda  $352\text{ cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



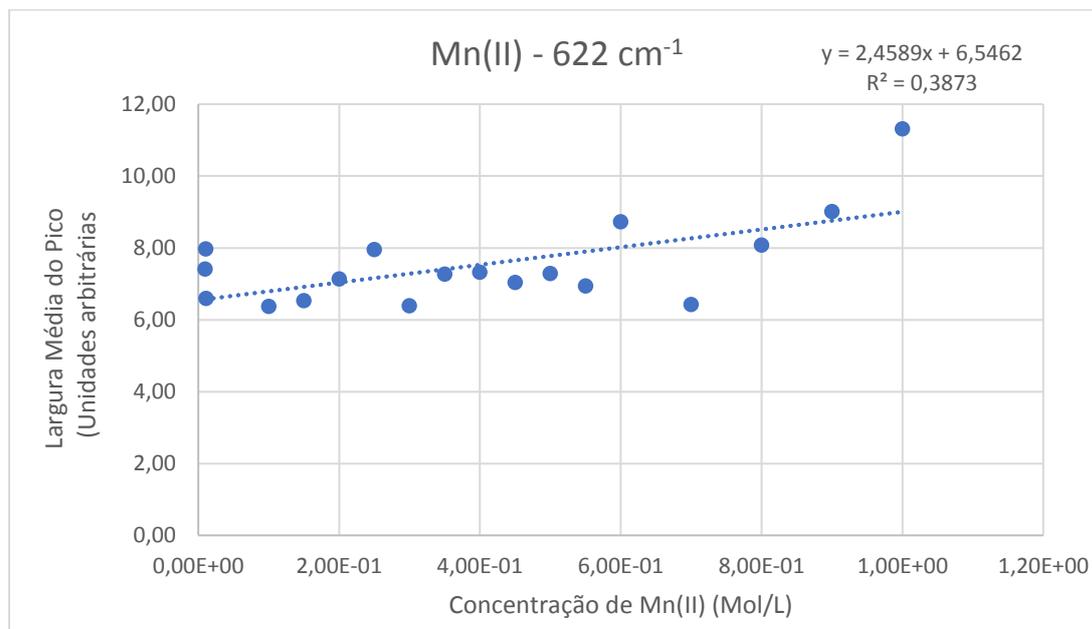
Fonte: o autor.

Figura 34: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda  $570\text{ cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



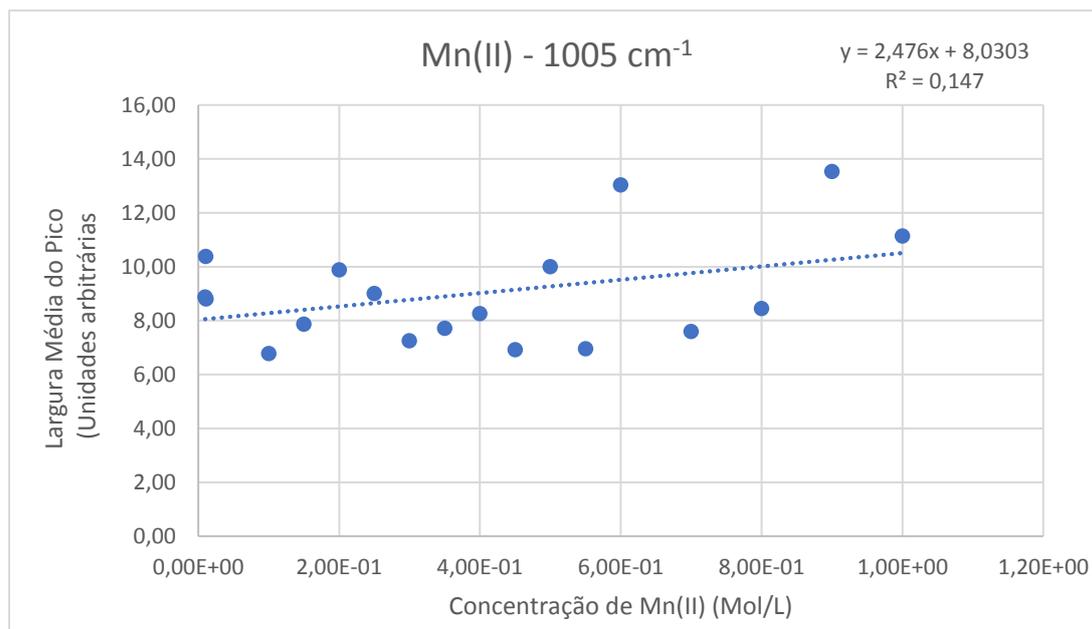
Fonte: o autor.

Figura 35: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda  $622\text{ cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



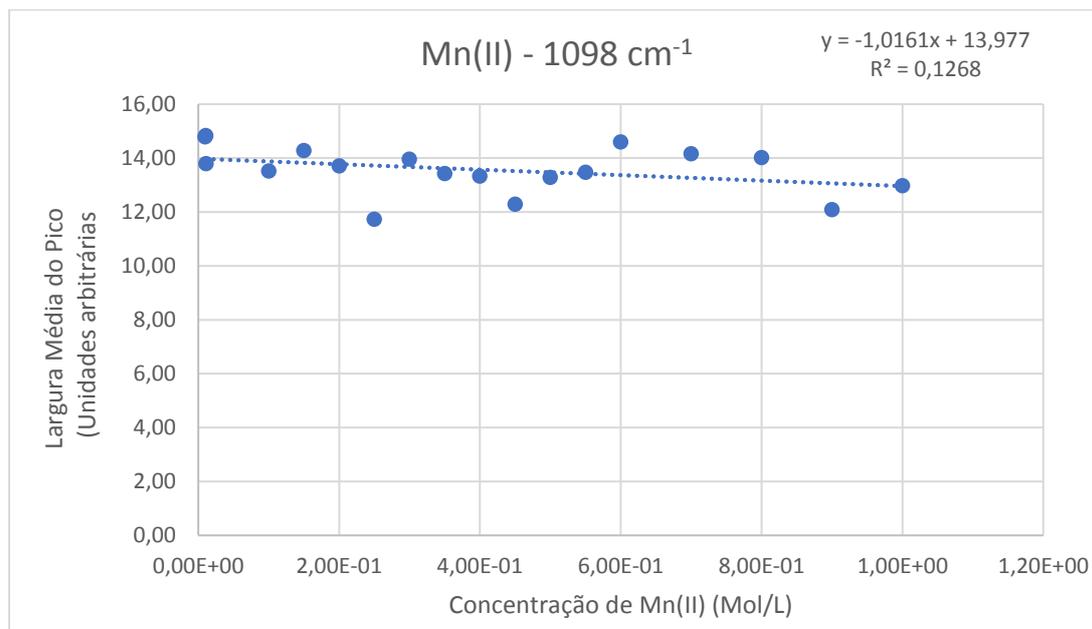
Fonte: o autor.

Figura 36: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda  $1005\text{ cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



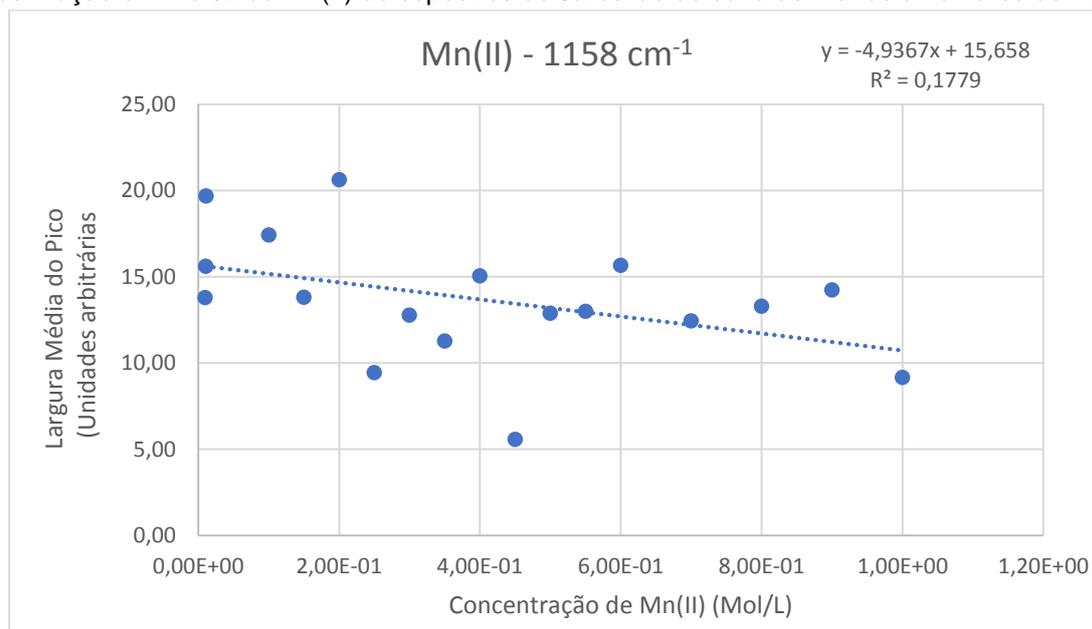
Fonte: o autor.

Figura 37: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1098  $\text{cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



Fonte: o autor.

Figura 38: Gráfico da Largura a Meia Altura da banda 1158  $\text{cm}^{-1}$  em unidades arbitrárias pela concentração em Mol /L de Mn(II) de espectros de Jarositas de culturas monoelementares de Mn(II).



Fonte: o autor.

Diferentemente dos dados de Cr(III), apresentamos mais pontos para os gráficos de LMA de Mn (II), o que nos ajuda a ver com maior clareza as tendências. Isso se deve ao fato da cepa LR, ter um MTC mais alto para Mn(II), o que nos fornece mais dados.

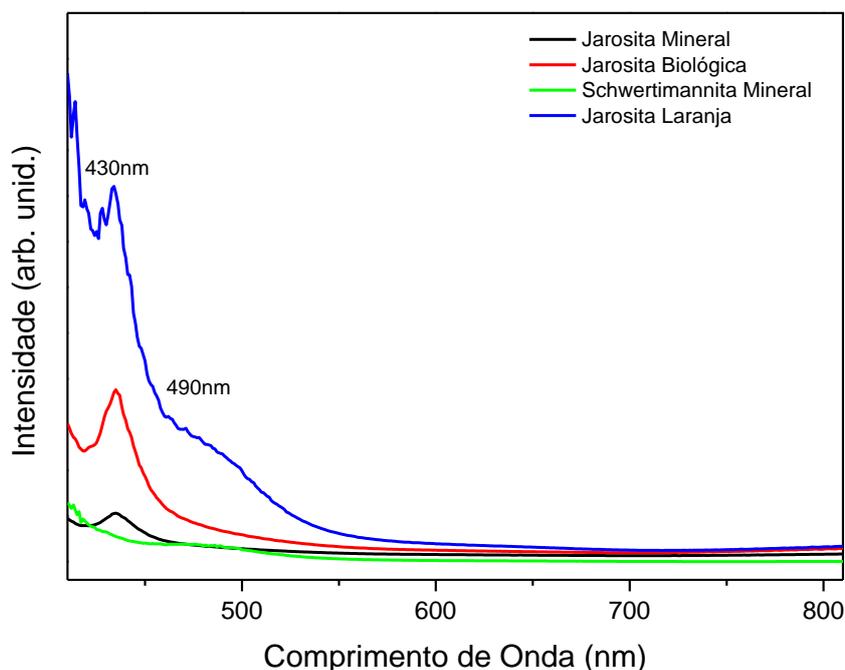
Em resumo, esses resultados indicam que um estudo mais profundo sobre o comportamento das bandas espectroscópicas da Jarosita em meio de cultura pode fornecer informações importantes sobre as características do mineral, que podem levar a identificações mais certas da composição de uma amostra ambiental. Essa composição, em um viés astrobiológico, poderia nos ajudar a dizer algo sobre processos biogênicos em outro planeta e, em um viés de exploração espacial, ajudaria a identificar locais que tem esses metais para realização de um processo de biomineração, por exemplo, visando a manutenção de postos avançados ou mesmo a obtenção de recursos para utilização no nosso próprio planeta, já que os recursos terrestres são finitos.

### **5.6) Reflectância UV-Vis do precipitado**

A técnica de reflectância foi utilizada por apresentar três aspectos importantes para a pesquisa no ramo da astrobiologia e exploração espacial: praticidade nas medidas (por exemplo, com a ausência de preparo da amostra); rapidez nas análises e portabilidade (com baixo peso) dos equipamentos. Nesse contexto de viagens interplanetárias, realizar experimentos que sejam práticos torna-se importante, uma vez que preparo de amostras é um fator crucial, já que em ambientes extraterrestres não temos a disponibilidade de tantos materiais para a realização de experimentos com um desenho experimental tradicional.

Inicialmente os resultados foram convertidos em absorbância utilizando a metodologia de Kubelka-Munk (Loyalka and Riggs 1995). A seguir se estabeleceu a comparação de absorvidade dos padrões de Jarosita de fonte mineral e biológica, além da Schwertmannita Mineral e Jarosita Biológica de coloração alaranjada 8YR, está última de coloração diferente da descrita na literatura (Jones, Bigham et al. 2014). Esse gráfico pode ser visualizado na figura 39.

Figura 39: Comparação das absorvidades das diversas amostras de Jarositas e Schwertimannita minerais.



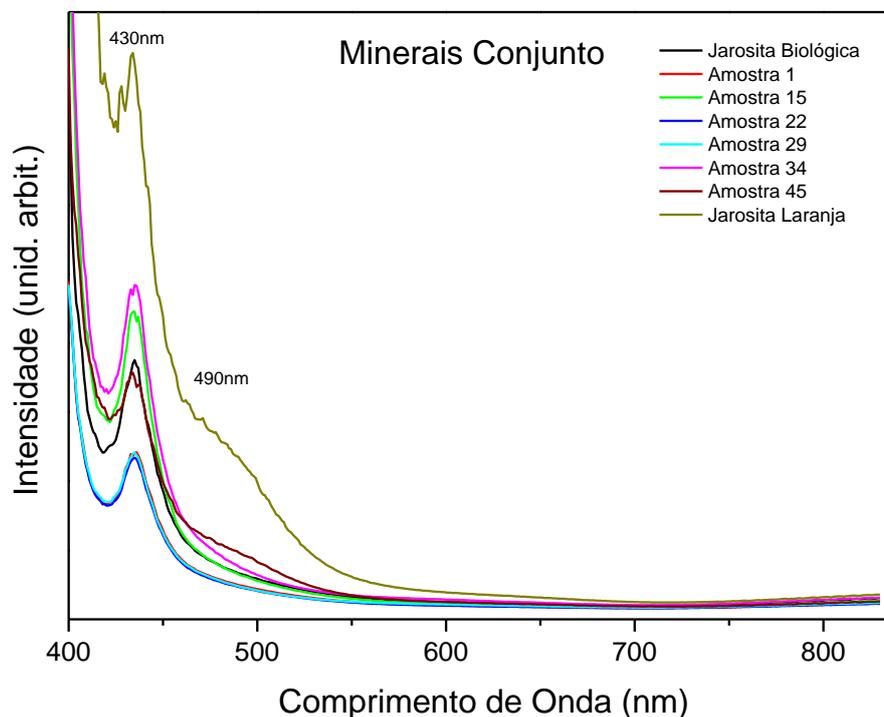
Fonte: o autor.

Podemos visualizar que as amostras de Jarosita apresentam curvas diferentes, apesar de espectros Raman semelhantes. As três amostras apresentam banda em 430 nm, porém com intensidades bem diferentes. Somente a Schwertimannita Mineral não apresenta essa banda. Não há padrão para se comparar as intensidades.

Também é possível visualizar a banda em 490nm nas amostras de Schwertimannita Mineral e Jarosita Laranja (antiga Schwetimannita biológica que por análise de espectroscopia raman foi identificada como Jarosita). Essa banda pode estar relacionada a coloração alaranjada que ambas as amostras possuem.

A seguir, foram analisadas as absortividades dos precipitados obtidos das culturas multielementares, comparados com a Jarosita laranja, com o objetivo de se verificar se os metais estudados de alguma forma alteraram a curva de absortividade da Jarosita precipitada. Para evitar mostrar todos os 47 espectros, foram escolhidos alguns pontos para mostrar os aspectos observados nos precipitados, mostrados na figura 40. As amostras com numeração maior, tem maior concentração dos 3 metais.

Figura 40: Curva de absorvidade das Jarositas retiradas de meio de cultura multielementar comparadas com as Jarositas sem os metais alvo. A amostra 1 corresponde a uma concentração de  $6,75E-04$  mol/L, amostra 15 de  $1,13E-03$  mol/L, amostra 22 de  $1,43E-03$  mol/L, amostra 29 de  $1,93E-03$  mol/L, amostra 34 de  $2,33E-03$  e amostra 45 de  $3,23E-03$  mol/L.



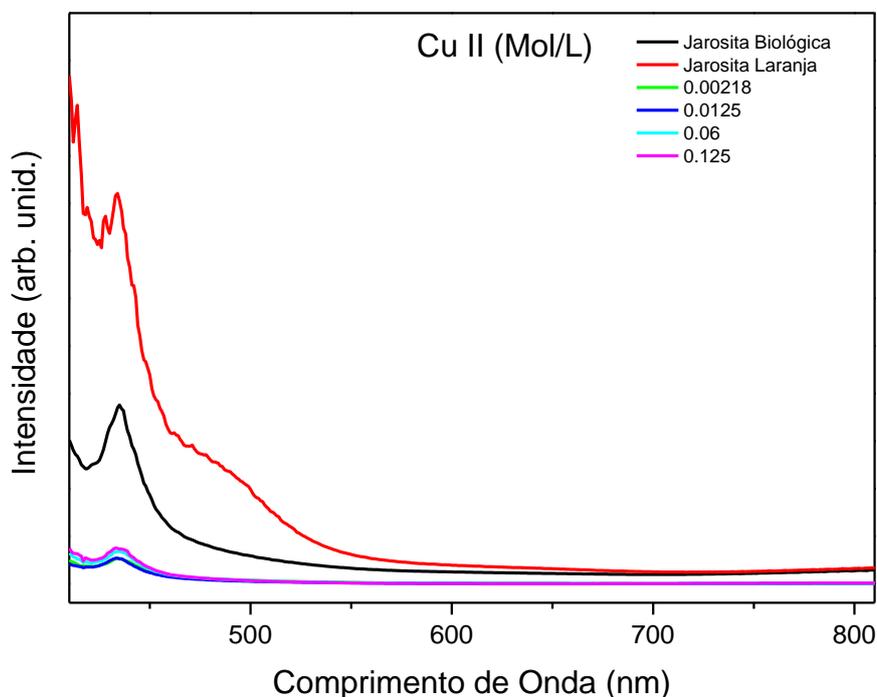
Fonte: o autor.

Podemos ver pelo gráfico que a intensidade da banda em 430 nm não apresenta uma tendência clara. Entretanto pode-se visualizar o surgimento de uma banda em 490 nm na Amostra 47, que é a amostra com maior concentração dos metais estudados, ou seja no MTC. Essa banda é semelhante ao observado na Jarosita alaranjada, levando a supor que começa a se observar uma variação na estrutura gerada pelos metais. Talvez em maiores concentrações, seja visível no espectro diferenças de bandas, entretanto, no caso dessa cepa não é possível verificar essa hipótese uma vez que a cultura multielementar já está no seu MTC. Todavia, esse fator é interessante, uma vez que em culturas contendo outras cepas ou mesmo Jarositas multielementares abióticas com altas concentrações, pode ser possível observar variação gerada pelos metais tóxicos utilizando a técnica de Reflectância UV-Vis.

Visando avaliar o possível efeito individual de cada um dos metais estudados, realizamos o experimento com os precipitados retirados de culturas

monoelementares, contendo apenas um dos metais tóxicos. Iniciaremos mostrando, na figura 41, as curvas obtidas de algumas amostras de Jarositas de culturas monoelementares de Cu(II).

Figura 41: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Cu(II), e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.

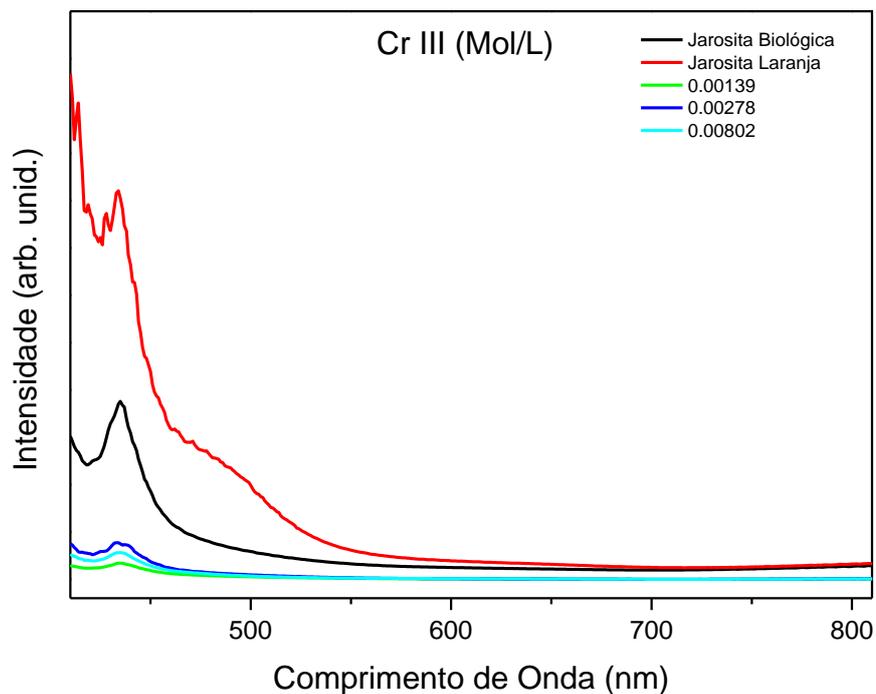


Fonte: o autor.

Podemos observar pelo gráfico que todas as amostras de Jarosita monoelementar de Cu(II), apresentam o mesmo padrão da Jarosita biológica alaranjada, com uma banda evidente no comprimento de onda 430 nm, porém sem a banda em 490nm como aparece na amostra multi-elementar no MTC. Isso pode ser efeito da posição da amostra frente ao detector.

Na figura 42 são mostrados os gráficos referentes aos precipitados de culturas monoelementares de Cr(III).

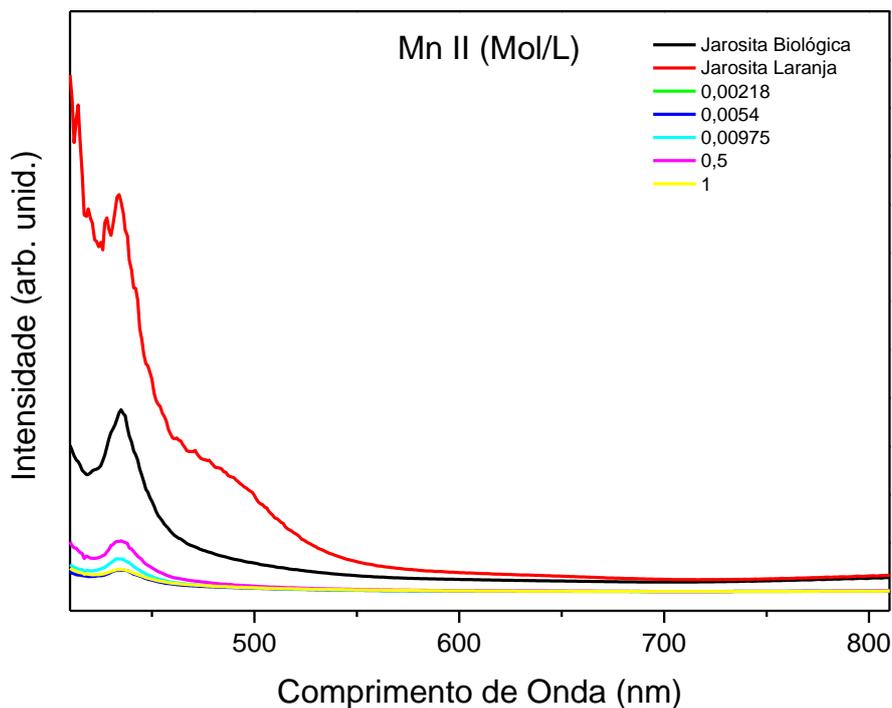
Figura 42: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Cr(III) e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.



Fonte: o autor.

Podemos observar pelo gráfico que todas as amostras de Jarositas monoelementares com Cr(III), apresentam padrão semelhante às amostras de Cu(II). Tanto no quesito intensidade da banda 430 nm quanto na ausência da banda 490 nm. Esse comportamento, também foi observado nas amostras de Jarosita monoelementares de Mn(II), que pode ser observado na figura 43.

Figura 43: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares de Mn(II) e Jarositas puras. As curvas indicadas por números, são as concentrações em Mol/L do íon.

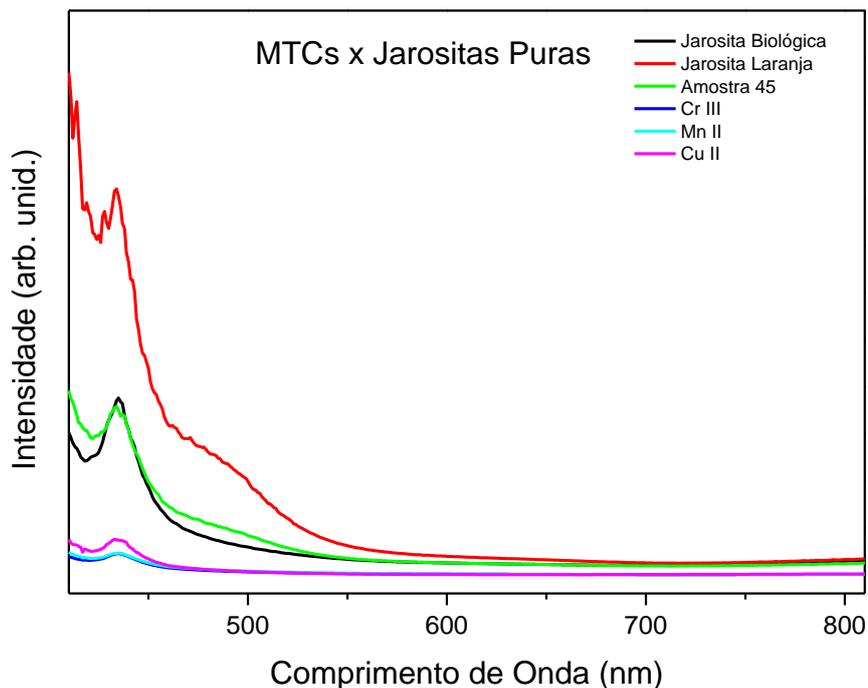


Fonte: o autor.

Esses resultados indicam que apesar dessa técnica ser interessante para a astrobiologia e para a exploração espacial, no contexto específico desse projeto, para diferenciar a natureza dos precipitados, não é a técnica mais indicada.

Para verificar essa hipótese, comparamos os precipitados das culturas monoelementares em seus respectivos MTCs com as Jarositas de culturas puras e cultura multielementar em seu MTC. Comparação pode ser verificada na figura 44.

Figura 44: Comparação das curvas de absorvidade das amostras de Jarosita monoelementares no MTC, amostra multielementar no MTC (Amostra 45) e Jarositas puras.



Fonte: o autor.

Podemos observar pelo gráfico que todas as amostras de Jarositas monoelementares em seus respectivos MTCs apresentam o mesmo padrão da Jarosita biológica laranja, com uma banda evidente no comprimento de onda 430 nm. Esse resultado é similar ao encontrado nos mostrados nas figuras 41 a 43.

Desta maneira, podemos concluir que no contexto no qual o projeto está inserido, a utilização de Reflectância UV-Vis não nos fornece informações relevantes para o desenvolvimento de diferenciações de amostras de Jarosita contendo os diferentes metais estudados em sua estrutura. Assim, em um possível contexto espacial, não se faz interessante a utilização dessa técnica frente a outras existentes e que fornecem mais informações, como a Espectroscopia Raman.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo da bactéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, cepa LR, demonstrou que possui uma taxa de crescimento semelhantes aquela descrita na literatura científica. Entretanto, quando cultivada em meios de cultura contendo os metais alvo desse estudo, sua taxa de crescimento é alterada, demonstrando ser necessário um maior tempo para que a cultura atinja o estado estacionário. Um fato interessante é que, apesar de na literatura afirmar que o Cu(II) tem maior efeito citotóxico que o Mn(II), observamos o oposto para essa cepa, sendo que o Mn(II) afeta mais a velocidade de crescimento.

No caso da tolerância aos metais, as culturas multielementares se mostraram mais danosas que as culturas monoelementares, resultado já esperado uma vez que a bactéria sofre maior estresse. Adicionalmente, em culturas multielementares verificamos que a presença de Cr(III) é mais tóxica, confirmando o que foi encontrado na literatura. Já analisando os resultados de MTC de culturas monoelementares, observamos que a cepa em questão apresenta maior resistência para Mn(II) e Cu(II) do que as cepas descritas por outros autores.

Estes resultados indicam a possibilidade de aplicação desta cepa em locais de interesse com maior concentração dos metais potencialmente tóxicos, além de delimitar melhor a atuação em ambientes com mais de um contaminante. Um desses ambientes de interesse são locais extraterrestres.

Em relação ao precipitado, os dados de recuperação dos metais no próprio mineral, identificamos que a adsorção superficial dos metais não é a principal forma de sequestro. Os resultados corroboram para a hipótese de ocorrer a formação de uma camada de passivação durante a formação da Jarosita, que imobiliza os metais estudados.

Quando analisamos a porcentagem de recuperação, identificamos que essa cepa apresenta um valor baixo de recuperação comparado com os números encontrados na literatura. Esse ponto é crucial uma vez que o rendimento para uma ação biotecnológica é de extrema importância, por uma questão monetária de receita que será gerada final. No caso da área espacial, temos mais ainda um fator importante, a necessidade de utilização de processos enxutos e eficientes na exploração espacial, que no caso não seria tão eficiente. Desta forma, essa baixa

recuperação, pode ser um fator decisivo contra o possível uso dessa cepa em aplicações biotecnológicas na exploração espacial.

Adicionalmente, verificou-se que as amostras com maior recuperação de metais são aquelas oriundas de meios multielementares, possivelmente uma maior diversidade de compostos melhora o processo de coprecipitação, mais um ponto que corrobora para a hipótese da formação de uma camada de passivação.

Pelos dados obtidos por espectroscopia Raman, foi possível confirmar que os precipitados obtidos são Jarosita, em acordo com a literatura. Os precipitados obtidos a partir de culturas multielementares dos metais estudados não demonstraram nenhuma banda nova no espectro ou alguma tendência de alargamento de banda ou deslocamento de banda. Entretanto, nas culturas monoelementares podemos ver algumas tendências de alargamento ou estreitamento de banda, indicando que cada metal pode ter uma influência isoladamente. Isto não pode ser observado em precipitados gerados em meios multielementares, possivelmente porque não existe um efeito mais predominante que outro ou ainda que os efeitos se anulam ou atuam de forma aleatória impedindo a formação de um padrão de variação.

Este resultado apresenta uma barreira para a utilização desta técnica afim de identificar se minerais estão contaminados com mais de um dos metais alvo desse estudo.. No caso da Exploração Espacial, a técnica seria indicada uma vez que os sítios de extração apresentassem apenas um dos metais, o que ainda pode ser interessante para o contexto já que a técnica não necessita de grande preparo de material e poderia fornecer informações importantes de composição, o que determinaria o interesse ou não de explorar determinada região.

Na análise utilizando reflectância, apenas no ponto final do cultivo multielementar podemos ver uma pequena diferença no espectro gerado, nos demais espectros, não foi possível identificar nenhuma diferença relevante ou tendência. Desta maneira, podemos concluir que no contexto no qual o projeto está inserido, que a utilização de Reflectância UV-Vis não nos fornece informações relevantes para o desenvolvimento de diferenciações de Jarositas contendo diferentes tipos de metais tóxicos sequestrados.

Concluindo, o estudo da cepa LR de *Acidithiobacillus* neste projeto nos levou a entender melhor sua resposta fisiológica e delimitar suas possíveis aplicações, além das aplicações de algumas técnicas experimentais em seus precipitados. Isso gera caminhos e mais possibilidades de futuros estudos que podem nos fornecer

informações interessantes tanto para o crescimento bacteriano, resistência a meios multielementares e identificação do precipitado, isso tanto para uma aplicação terrestre quanto espacial.

## **7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Identificar o MTC da cepa LR para os mais diversos metais potencialmente tóxicos e entender os mecanismos moleculares por trás da resistência;
- Simular ambientes espaciais e testar a resistência do microrganismo nessas condições;
- Estudo estrutural do precipitado gerado de forma a definir o modo de co-precipitação de metais tóxicos;
- Utilização de co-culturas com objetivo de melhorar a mobilização dos metais tóxicos;
- Utilização de moléculas relacionadas ao Quorum-sensing buscando melhorar mobilização e MTC.

## REFERÊNCIAS\*

- Achal, V., A. Mukherjee, D. Kumari and Q. Zhang (2015). "Biomining for sustainable construction—A review of processes and applications." Earth-science reviews **148**: 1-17.
- Altair, T., M. G. de Avellar, F. Rodrigues and D. Galante (2018). "Microbial habitability of Europa sustained by radioactive sources." Scientific reports **8**(1): 260.
- Amils, R., E. González-Toril, D. Fernández-Remolar, F. Gómez, Á. Aguilera, N. Rodríguez, M. Malki, A. García-Moyano, A. G. Fairén and V. de la Fuente (2007). "Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Rio Tinto case." Planetary and Space Science **55**(3): 370-381.
- Amundson, R., D. D. Richter, G. S. Humphreys, E. G. Jobbágy and J. Gaillardet (2007). "Coupling between biota and earth materials in the critical zone." Elements **3**(5): 327-332.
- Appia-Ayme, C., R. Quatrini, Y. Denis, F. Denizot, S. Silver, F. Roberto, F. Veloso, J. Valdés, J. P. Cárdenas and M. Esparza (2006). "Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*." Hydrometallurgy **83**(1-4): 273-280.
- Arnold, T., N. Baumann, E. Krawczyk-Bärsch, S. Brockmann, U. Zimmermann, U. Jenk and S. Weiß (2011). "Identification of the uranium speciation in an underground acid mine drainage environment." Geochimica et Cosmochimica Acta **75**(8): 2200-2212.
- Arshadi, M. and S. Yaghmaei (2020). "Advances in bioleaching of copper and nickel from electronic waste using *Acidithiobacillus ferrooxidans*: evaluating daily pH adjustment." Chemical Papers: 1-17.
- Baillet, F., J.-P. Magnin, A. Cheruy and P. Ozil (1998). "Chromium precipitation by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*." Biotechnology Letters **20**(1): 95-99.
- Bass, M. S., M. Finer, C. N. Jenkins, H. Kreft, D. F. Cisneros-Heredia, S. F. McCracken, N. C. Pitman, P. H. English, K. Swing and G. Villa (2010). "Global conservation significance of Ecuador's Yasuní National Park." PloS one **5**(1): e8767.
- Bergamo, R. F., M. T. M. Novo, R. V. Veríssimo, L. C. Paulino, N. C. Stoppe, M. I. Z. Sato, G. P. Manfio, P. I. Prado, O. Garcia Jr and L. M. Ottoboni (2004). "Differentiation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains based on 16S–23S rDNA spacer polymorphism analysis." Research in microbiology **155**(7): 559-567.
- Blumberg, B. S. (2003). "The NASA Astrobiology Institute: early history and organization." Astrobiology **3**(3): 463-470.
- Boyer, A., J.-P. Magnin and P. Ozil (1998). "Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass." Biotechnology Letters **20**(2): 187-190.
- Brahmaprakash, G., P. Devasia, K. Jagadish, K. Natarajan and G. R. Rao (1988). "Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strains tolerant to copper and zinc." Bulletin of Materials Science **10**(5): 461-465.
- Buckby, T., S. Black, M. L. Coleman and M. Hodson (2003). "Fe-sulphate-rich evaporative mineral precipitates from the Rio Tinto, southwest Spain." Mineralogical Magazine **67**(2): 263-278.
- Cabrera, G., J. Gomez and D. Cantero (2005). "Influence of heavy metals on growth and ferrous sulphate oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures." Process Biochemistry **40**(8): 2683-2687.
- Cabrera, G., J. Gomez and D. Cantero (2005). "Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions." Enzyme and Microbial Technology **36**(2-3): 301-306.
- Cady, S. L., J. D. Farmer, J. P. Grotzinger, J. W. Schopf and A. Steele (2003). "Morphological biosignatures and the search for life on Mars." Astrobiology **3**(2): 351-368.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

- Cano, R. J. and M. K. Borucki (1995). "Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber." Science **268**(5213): 1060-1064.
- Cavicchioli, R. (2002). "Extremophiles and the search for extraterrestrial life." Astrobiology **2**(3): 281-292.
- Chen, G.-Q. and X.-R. Jiang (2018). "Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria." Current opinion in biotechnology **50**: 94-100.
- Cockell, C. S. (2010). "Geomicrobiology beyond Earth: microbe–mineral interactions in space exploration and settlement." Trends in microbiology **18**(7): 308-314.
- Cockell, C. S. (2020). Astrobiology: understanding life in the universe, John Wiley & Sons.
- Coker, J. A. (2016). "Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects." F1000Research **5**.
- Couillard, D. and M. Chartier (1991). "Removal of metals from aerobic sludges by biological solubilization in batch reactors." Journal of biotechnology **20**(2): 163-180.
- Daoud, J. and D. Karamanev (2006). "Formation of jarosite during Fe<sup>2+</sup> oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*." Minerals Engineering **19**(9): 960-967.
- Das, A., J. Modak and K. Natarajan (1997). "Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*." Minerals Engineering **10**(7): 743-749.
- Das, S. and M. J. Hendry (2011). "Application of Raman spectroscopy to identify iron minerals commonly found in mine wastes." Chemical Geology **290**(3-4): 101-108.
- Davies, P. (1998). "Survivors from Mars." New Scientist **159**(2151): 24-29.
- de Araujo, G. G., F. Rodrigues and D. Galante (2020). "Probing the response of *Deinococcus radiodurans* exposed to simulated space conditions." International Journal of Astrobiology **19**(3): 203-209.
- Des Marais, D. J., J. A. Nuth III, L. J. Allamandola, A. P. Boss, J. D. Farmer, T. M. Hoehler, B. M. Jakosky, V. S. Meadows, A. Pohorille and B. Runnegar (2008). "The NASA astrobiology roadmap." Astrobiology **8**(4): 715-730.
- Devasia, P. and K. Natarajan (2010). "Adhesion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to mineral surfaces." International Journal of Mineral Processing **94**(3-4): 135-139.
- Dopson, M. and D. S. Holmes (2014). "Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies." Applied microbiology and biotechnology **98**(19): 8133-8144.
- Duarte, R. T., F. Nóbrega, C. R. Nakayama and V. H. Pellizari (2012). "Brazilian research on extremophiles in the context of astrobiology." International Journal of Astrobiology **11**(4): 325-333.
- Dumorne, K., D. C. Córdova, M. Astorga-Eló and P. Renganathan (2017). "Extremozymes: a potential source for industrial applications." Journal of microbiology and biotechnology **27**(4): 649-659.
- Fang, D. and L. Zhou (2006). "Effect of sludge dissolved organic matter on oxidation of ferrous iron and sulfur by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*." Water, Air, & Soil Pollution **171**(1-4): 81-94.
- Fang, D. and L.-X. Zhou (2007). "Enhanced Cr bioleaching efficiency from tannery sludge with coinoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans* TS6 and *Brettanomyces* B65 in an air-lift reactor." Chemosphere **69**(2): 303-310.
- Farinaccio, R. (2017). "Empresa privada quer procurar vida nas luas de Saturno." Retrieved 12.13.2017, 2017, from <https://www.tecmundo.com.br/ciencia/124470-empresa-privada-quer-procurar-vida-luas-saturno.htm>.
- Filippi, M., V. Machovič, P. Drahotka and V. Böhmová (2009). "Raman microspectroscopy as a valuable additional method to X-ray diffraction and electron microscope/microprobe analysis in the study of iron arsenates in environmental samples." Applied spectroscopy **63**(6): 621-626.
- Fitzgerald, W., C. Lamborg, H. D. Holland and K. K. Turekian (2014). "Treatise on geochemistry."
- Frost, R. L., R.-A. Wills, M. L. Weier, W. Martens and S. Mills (2006). "A Raman spectroscopic study of selected natural jarosites." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **63**(1): 1-8.

- Gadd, G. M. (2004). "Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation." Geoderma **122**(2-4): 109-119.
- Gadd, G. M. (2005). Microorganisms in toxic metal-polluted soils. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions, Springer: 325-356.
- Gadd, G. M. (2010). "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation." Microbiology **156**(3): 609-643.
- Gadd, G. M. (2017). "Geomicrobiology of the built environment." Nature microbiology **2**(4): 16275.
- Gadd, G. M. and J. A. Raven (2010). "Geomicrobiology of eukaryotic microorganisms." Geomicrobiology Journal **27**(6-7): 491-519.
- Galante, D., E. P. Silva, F. Rodrigues, J. E. Horvath and M. G. B. Avelar (2016). Astrobiologia : Uma Ciência Emergente.
- Gao, X.-Y., X.-J. Liu, C.-A. Fu, X.-F. Gu, J.-Q. Lin, X.-M. Liu, X. Pang, J.-Q. Lin and L.-X. Chen (2020). "Novel strategy for improvement of the bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on the Afel/R quorum sensing system." Minerals **10**(3): 222.
- Garcia Junior, O. (1991). "Isolation and characterization of *Thiobacillus thiooxidans* and *Thiobacillus ferrooxidans* from mineral mines." Rev Bras Microbiol **20**: 1-6.
- Garcia, O. and L. Da Silva (1991). "Differences in growth and iron oxidation among *Thiobacillus ferrooxidans* cultures in the presence of some toxic metals." Biotechnology Letters **13**(8): 567-570.
- Gehrke, T., R. Hallmann, K. Kinzler and W. Sand (2001). "The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology." Water Science and Technology **43**(6): 159-167.
- Genuário, D. B., M. G. Vaz, S. N. Santos, V. N. Kavamura and I. S. Melo (2019). Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments: Toward Functional Exploitation. Microbial Diversity in the Genomic Era, Elsevier: 265-284.
- Gomez, F. and R. Amils (2002). Evolution of microbial energy conservation: from chemolithotrophy to photosynthesis. The Evolving Sun and its Influence on Planetary Environments.
- González-Toril, E., J. Martínez-Frías, J. M. Gómez Gómez, F. Rull and R. Amils (2005). "Iron meteorites can support the growth of acidophilic chemolithoautotrophic microorganisms." Astrobiology **5**(3): 406-414.
- Gonçalves Silva, G., E. Yamassaki de Almeida, P. Seber, P. Henrique Settanni, A. Pereira de Oliveira, M. S. Ferreira Santos, C. Lucio do Lago, Z. Cieslarova and F. Rodrigues (2018). "Application of capillary electrophoresis combined with conductometric and UV detection to monitor meteorite simulant bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*." Electrophoresis **39**(22): 2898-2905.
- Gronstal, A., V. Pearson, A. Kappler, C. Dooris, M. Anand, F. Poitrasson, T. P. Kee and C. S. Cockell (2009). "Laboratory experiments on the weathering of iron meteorites and carbonaceous chondrites by iron-oxidizing bacteria." Meteoritics & Planetary Science **44**(2): 233-247.
- Gronstal, A., V. Pearson, A. Kappler, C. Dooris, M. Anand, F. Poitrasson, T. P. Kee, C. S. J. M. Cockell and P. Science (2009). "Laboratory experiments on the weathering of iron meteorites and carbonaceous chondrites by iron-oxidizing bacteria." **44**(2): 233-247.
- Gómez, F., A. Aguilera and R. Amils (2007). "Soluble ferric iron as an effective protective agent against UV radiation: Implications for early life." Icarus **191**(1): 352-359.
- Horneck, G., D. M. Klaus and R. L. Mancinelli (2010). "Space microbiology." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(1): 121-156.
- Horneck, G. and P. Rettberg (2007). Complete course in astrobiology, John Wiley & Sons.
- Jensen, A. B. and C. Webb (1995). "Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review." Process biochemistry **30**(3): 225-236.
- Jones, F. S., J. M. Bigham, J. P. Gramp and O. H. Tuovinen (2014). "Synthesis and properties of ternary (K, NH<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>O)-jarosites precipitated from *Acidithiobacillus ferrooxidans*

- cultures in simulated bioleaching solutions." Materials Science and Engineering: C **44**: 391-399.
- Jorge, C. D., N. Borges, I. Bagyan, A. Bilstein and H. Santos (2016). "Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare." Extremophiles **20**(3): 251-259.
- Lafuente, B., R. Downs, H. Yang, N. Stone, T. Armbruster and R. Danisi (2015). "Highlights in mineralogical crystallography." W. De Gruyter, Berlin: 1-30.
- Landa, E. R. (2005). "Microbial biogeochemistry of uranium mill tailings." Advances in applied microbiology **57**: 113-130.
- Leduc, L., G. Ferroni and J. Trevors (1997). "Resistance to heavy metals in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **13**(4): 453-455.
- Liu, H., H. Yin, Y. Dai, Z. Dai, Y. Liu, Q. Li, H. Jiang and X. Liu (2011). "The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth, iron oxidation, and CO<sub>2</sub> fixation." Archives of microbiology **193**(12): 857-866.
- Loudon, C.-M., N. Nicholson, K. Finster, N. Leys, B. Byloos, R. Van Houdt, P. Rettberg, R. Moeller, F. M. Fuchs and R. Demets (2017). "BioRock: new experiments and hardware to investigate microbe–mineral interactions in space." International Journal of Astrobiology: 1-11.
- Loyalka, S. and C. Riggs (1995). "Inverse problem in diffuse reflectance spectroscopy: Accuracy of the Kubelka-Munk equations." Applied spectroscopy **49**(8): 1107-1110.
- Lundgren, D. and M. Silver (1980). "Ore leaching by bacteria." Annual reviews in microbiology **34**(1): 263-283.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley and D. A. Stahl (2016). Microbiologia de Brock-14ª Edição, Artmed Editora.
- Mancini, M., D. C. Weindorf, M. E. C. Monteiro, Á. J. G. de Faria, A. F. dos Santos Teixeira, W. de Lima, F. R. D. de Lima, T. S. B. Dijair, F. D. A. Marques and D. Ribeiro (2020). "From sensor data to Munsell color system: Machine learning algorithm applied to tropical soil color classification via Nix™ Pro sensor." Geoderma **375**: 114471.
- Mastrapa, R., H. Glanzberg, J. Head, H. Melosh and W. Nicholson (2001). "Survival of bacteria exposed to extreme acceleration: implications for panspermia." Earth and Planetary Science Letters **189**(1-2): 1-8.
- Mazzetti, L. and P. Thistlethwaite (2002). "Raman spectra and thermal transformations of ferrihydrite and schwertmannite." Journal of Raman Spectroscopy **33**(2): 104-111.
- Mendham, J., R. C. Denney, J. D. Barnes and M. J. K. Thomas (2000). Vogel's Quantitative Chemical Analysis. Pearson Education.
- Milotta, F. L. M., G. Furnari, C. Quattrocchi, S. Pasquale, D. Allegra, A. M. Gueli, F. Stanco and D. Tanasi (2020). "Challenges in automatic Munsell color profiling for cultural heritage." Pattern Recognition Letters **131**: 135-141.
- Min, G., M.-m. Li, Z. Jian, X.-x. Liu, J.-y. Zhu, Y.-h. Hu and G.-z. Qiu (2017). "Acidithiobacillus ferrooxidans enhanced heavy metals immobilization efficiency in acidic aqueous system through bio-mediated coprecipitation." Transactions of Nonferrous Metals Society of China **27**(5): 1156-1164.
- Moissi-Eichinger, C., C. Cockell and P. Rettberg (2016). "Venturing into new realms? Microorganisms in space." FEMS microbiology reviews **40**(5): 722-737.
- Montague, M., G. H. McArthur IV, C. S. Cockell, J. Held, W. Marshall, L. A. Sherman, N. Wang, W. L. Nicholson, D. R. Tarjan and J. Cumbers (2012). The role of synthetic biology for in situ resource utilization (ISRU), Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.
- Moore, C. B. and H. Brown (1962). "The distribution of manganese and titanium in stony meteorites." Geochimica et Cosmochimica Acta **26**(4): 495-502.
- Morell, V. (1996). "Life's last domain." Science **273**(5278): 1043-1045.
- Mowll, J. and G. Gadd (1984). "Cadmium uptake by *Aureobasidium pullulans*." Microbiology **130**(2): 279-284.

- Munsell, A. H. (1905). A color notation, 1ra, en adelante (Baltimore, Maryland: Munsell Color Company, 1946).
- MURAD, E. (1994). "Schwertmannite, a new iron oxyhydroxy-sulphate from Pyhasalmi, Finland, and other localities." Mineralogical Magazine **58**: 641-648.
- Murphy, P. J., A. M. Smith, K. A. Hudson-Edwards, W. E. Dubbin and K. Wright (2009). "Raman and IR spectroscopic studies of alunite-supergroup compounds containing Al, Cr<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> and V<sup>3+</sup> at the B site." The Canadian Mineralogist **47**(3): 663-681.
- Navarro, C. A., L. H. Orellana, C. Mauriaca and C. A. Jerez (2009). "Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper." Applied and Environmental Microbiology **75**(19): 6102-6109.
- Nemati, M., S. Harrison, G. Hansford and C. Webb (1998). "Biological oxidation of ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*: a review on the kinetic aspects." Biochemical engineering journal **1**(3): 171-190.
- Olson, W. P. (2020). Separations technology: pharmaceutical and biotechnology applications, CRC Press.
- Orell, A., C. A. Navarro, R. Arancibia, J. C. Mobarec and C. A. Jerez (2010). "Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals." Biotechnology advances **28**(6): 839-848.
- Orell, A., C. A. Navarro, M. Rivero, J. S. Aguilar and C. A. Jerez (2012). "Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions." Extremophiles **16**(4): 573-583.
- Paerl, H. W., J. L. Pinckney and T. F. Steppe (2000). "Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments." Environmental Microbiology **2**(1): 11-26.
- Parnell, J., D. Cullen, M. R. Sims, S. Bowden, C. S. Cockell, R. Court, P. Ehrenfreund, F. Gaubert, W. Grant and V. Parro (2007). "Searching for life on Mars: selection of molecular targets for ESA's Aurora ExoMars mission." Astrobiology **7**(4): 578-604.
- Pathak, A., L. Morrison and M. G. Healy (2017). "Catalytic potential of selected metal ions for bioleaching, and potential techno-economic and environmental issues: a critical review." Bioresource technology **229**: 211-221.
- Pathak, A., L. Morrison and M. G. Healy (2017). "Catalytic Potential of Selected Metal Ions for Bioleaching, and Potential Techno-Economic and Environmental Issues: A Critical Review." Bioresour. Technol. **229**: 211-221.
- Paulino-Lima, I. G., A. Azua-Bustos, R. Vicuña, C. González-Silva, L. Salas, L. Teixeira, A. Rosado, A. A. da Costa Leitao and C. Lage (2013). "Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile." Microbial ecology **65**(2): 325-335.
- Payão, F. (2017). "Donald Trump financia NASA e torna oficial a missão Marte 2033." Retrieved 12.13.2017, 2017, from <https://www.tecmundo.com.br/nasa/115189-donald-trump-financia-nasa-torna-oficial-missao-marte-2033.htm>.
- Peng, L., D. Fu, H. Chu, Z. Wang and H. Qi (2020). "Biofuel production from microalgae: a review." Environmental Chemistry Letters: 1-13.
- Piervandi, Z., A. K. Darban, S. M. Mousavi, M. Abdollahy, G. Asadollahfardi, V. Funari, E. Dinelli, R. D. Webster and M. Sillanpää (2020). "Effect of biogenic jarosite on the bio-immobilization of toxic elements from sulfide tailings." Chemosphere: 127288.
- Plein, L. C. (1991). "Popularizing biotechnology: The influence of issue definition." Science, Technology, & Human Values **16**(4): 474-490.
- Priya, A. and S. Hait (2020). "Biometallurgical recovery of metals from waste printed circuit boards using pure and mixed strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum*." Process Safety and Environmental Protection.
- Pulschen, A. A., F. Rodrigues, R. T. Duarte, G. G. Araujo, I. F. Santiago, I. G. Paulino-Lima, C. A. Rosa, M. J. Kato, V. H. Pellizari and D. Galante (2015). "UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology." MicrobiologyOpen **4**(4): 574-588.
- Purvis, O. W. and B. Pawlik-Skowrońska (2008). Lichens and metals. British Mycological Society Symposia Series, Elsevier.

- Pérez, F. R. and J. Martínez-Frías (2006). "Raman spectroscopy goes to Mars." Spectroscopy Europe **18**(1): 18-21.
- Quatrini, R., C. Appia-Ayme, Y. Denis, E. Jedlicki, D. S. Holmes and V. Bonnefoy (2009). "Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*." BMC genomics **10**(1): 394.
- Quatrini, R., C. Appia-Ayme, Y. Denis, J. Ratouchniak, F. Veloso, J. Valdes, C. Lefimil, S. Silver, F. Roberto and O. Orellana (2006). "Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling." Hydrometallurgy **83**(1-4): 263-272.
- Raafat, K., J. Burnett, T. Chapman and C. S. Cockell (2013). "The physics of mining in space." Astronomy & Geophysics **54**(5): 5.10-15.12.
- Ramos, P. V., A. V. Inda, V. Barrón, D. S. Siqueira, J. M. Júnior and D. D. B. Teixeira (2020). "Color in subtropical Brazilian soils as determined with a Munsell chart and by diffuse reflectance spectroscopy." CATENA **193**: 104609.
- Reddy, M. S. (2013). "Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review." Frontiers in microbiology **4**: 314.
- Rothschild, L. J. and R. L. Mancinelli (2001). "Life in extreme environments." Nature **409**(6823): 1092.
- Sahoo, K. and N. Dhal (2009). "Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review."
- Sayre, R., J. Bow, C. Josse, L. Sotomayor and J. Touval (2008). "Terrestrial ecosystems of south America." North America Land Cover Summit: 131-152.
- Schröder, C., C. Burkhardt and G. Antranikian (2020). "What we learn from extremophiles." ChemTexts **6**(1): 1-6.
- Seckbach, J. and J. Chela-Flores (2007). Extremophiles and chemotrophs as contributors to astrobiological signatures on Europa: a review of biomarkers of sulfate-reducers and other microorganisms. Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X, International Society for Optics and Photonics.
- Sellek, G. A. and J. B. Chaudhuri (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." Enzyme and Microbial Technology **25**(6): 471-482.
- Seyler, L., E. B. Kujawinski, A. Azua-Bustos, M. D. Lee, J. Marlow, S. M. Perl and H. J. Cleaves (2020). "Metabolomics As an Emerging Tool in the Search for Astrobiologically Relevant Biomarkers." Astrobiology.
- Shen, S., R. Tyagi, J. Blais and R. Surampalli (2003). "Bacterial leaching of metals from tannery sludge by indigenous sulphur-oxidizing bacteria—effect of sludge solids concentration." Journal of environmental engineering **129**(6): 513-519.
- Shrestha, N., G. Chilkoor, B. Vemuri, N. Rathinam, R. K. Sani and V. Gadhamshetty (2018). "Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: a critical review." Bioresourcetechnology.
- Sisti, F., P. Allegretti and E. Donati (1998). "Bioremediation of chromium (VI)-contaminated effluents using *Thiobacillus*." Appl Biol Sci **4**: 47-58.
- Soto-Ramírez, N., C. Sanchez-Porro, S. Rosas-Padilla, K. Almodovar, G. Jimenez, M. Machado-Rodríguez, M. Zapata, A. Ventosa and R. Montalvo-Rodríguez (2008). "*Halobacillus mangrovi* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the black mangrove *Avicennia germinans*." International journal of systematic and evolutionary microbiology **58**(1): 125-130.
- Sparks, D. L. (2005). "Toxic metals in the environment: the role of surfaces." Elements **1**(4): 193-197.
- Sreekrishnan, T. and R. Tyagi (1996). "A comparative study of the cost of leaching out heavy metals from sewage sludges." Process Biochemistry **31**(1): 31-41.
- Srivastava, J. and P. Srivastava (2018). Biomining Microorganisms' Molecular Aspects and Applications in Biotechnology and Bioremediation. Biostimulation Remediation Technologies for Groundwater Contaminants, IGI Global: 1-18.
- Summons, R. E., P. Albrecht, G. McDonald and J. M. Moldowan (2008). Molecular biosignatures. Strategies of Life Detection, Springer: 133-159.

- Szuplewska, A., D. Kulpińska, A. Dybko, M. Chudy, A. M. Jastrzębska, A. Olszyna and Z. Brzózka (2020). "Future applications of MXenes in biotechnology, nanomedicine, and sensors." Trends in biotechnology **38**(3): 264-279.
- Tanabe, K. and J. Hiraishi (1980). "Correction of finite slit width effects on Raman line widths." Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy **36**(4): 341-344.
- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nüsslein, T. L. Marsh and S. J. Flynn (1999). "Opening the black box of soil microbial diversity." Applied soil ecology **13**(2): 109-122.
- Tuovinen, O. H. and D. P. Kelly (1973). "Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*." Archiv für Mikrobiologie **88**(4): 285-298.
- Tyagi, R. and D. Couillard (1987). "Bacterial leaching of metals from digested sewage sludge." Process biochemistry **22**(4): 114-117.
- Uroz, S., C. Calvaruso, M.-P. Turpault and P. Frey-Klett (2009). "Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms." Trends in microbiology **17**(8): 378-387.
- Valdés, J., I. Pedroso, R. Quatrini, R. J. Dodson, H. Tettelin, R. Blake, J. A. Eisen and D. S. Holmes (2008). "Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications." BMC genomics **9**(1): 597.
- van de Vossenberg, J. L., A. J. Driessen and W. N. Konings (1998). "The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids." Extremophiles **2**(3): 163-170.
- Vazquez, P., G. Holguin, M. Puente, A. Lopez-Cortes and Y. Bashan (2000). "Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon." Biology and Fertility of Soils **30**(5-6): 460-468.
- Villar, S. E. J. and H. G. Edwards (2006). "Raman spectroscopy in astrobiology." Analytical and bioanalytical chemistry **384**(1): 100-113.
- Wang, H., J. M. Bigham and O. H. Tuovinen (2006). "Formation of schwertmannite and its transformation to jarosite in the presence of acidophilic iron-oxidizing microorganisms." Materials Science and Engineering: C **26**(4): 588-592.
- Wang, Y., J. Yin and G.-Q. Chen (2014). "Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities." Current opinion in biotechnology **30**: 59-65.
- Warren, L. A. and E. A. Haack (2001). "Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments." Earth-Science Reviews **54**(4): 261-320.
- Watling, H. (2006). "The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review." Hydrometallurgy **84**(1-2): 81-108.
- Weiss, B. P., J. L. Kirschvink, F. J. Baudenbacher, H. Vali, N. T. Peters, F. A. Macdonald and J. P. Wikswa (2000). "A low temperature transfer of ALH84001 from Mars to Earth." Science **290**(5492): 791-795.
- Weiss, E. B. (1992). "United Nations conference on environment and development." International Legal Materials **31**(4): 814-817.
- Wojdyr, M. (2010). "Fityk: a general-purpose peak fitting program." Journal of Applied Crystallography **43**(5-1): 1126-1128.
- Wong, C., M. Silver and D. J. Kushner (1982). "Effects of chromium and manganese on *Thiobacillus ferrooxidans*." Canadian Journal of Microbiology **28**(5): 536-544.
- Zeikus, J. G., C. Vieille and A. Savchenko (1998). "Thermostzymes: biotechnology and structure–function relationships." Extremophiles **2**(3): 179-183.
- Zhang, Y., X. Wu, D. Liu, H. Duan and H. Fan (2013). "Sequencing and bioinformatics analysis of the metal-related genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain DC." Folia microbiologica **58**(6): 551-560.
- Zhang, Y., S. Zhang, D. Zhao, Y. Ni, W. Wang and L. Yan (2020). "Complete genome sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans* YNTRS-40, a strain of the ferrous iron- and sulfur-oxidizing acidophile." Microorganisms **8**(1): 2.
- Zheng, G., L. Zhou and S. Wang (2009). "An acid-tolerant heterotrophic microorganism role in improving tannery sludge bioleaching conducted in successive multibatch reaction systems." Environmental science & technology **43**(11): 4151-4156.

Zhu, J., M. Gan, D. Zhang, Y. Hu and L. Chai (2013). "The nature of Schwertmannite and Jarosite mediated by two strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with different ferrous oxidation ability." Materials Science and Engineering: C **33**(5): 2679-2685.