

BACTERIILE IMPLICATE ÎN PROCESUL DE SOLUBILIZARE A SULFURILOR MINERALE

Deși despre influența bacteriilor în solubilizarea metalelor din sulfurile metalice Rudolfs și Helbronner au prezentat câteva rapoarte încă din anul 1922, abia în 1947 cercetătorii americani Colmer și Hinkle (1947) au izolat din apele acide de mină niște bacterii autotrofe chimiosintetizante care oxidau foarte rapid fierul și sulful, bacterii pe care Colmer, Temple și Hinkle, în 1949, le-au denumit *Thiobacillus ferrooxidans* (Beck, 1967; Torma, 1977; Berry și Murr, 1978). Mai târziu aceste bacterii au fost izolate din foarte multe bazine miniere și s-a dovedit că sunt prezente în toate apele de mină acide (Johnson, 1998; Hallberg și Johnson, 2002).

În apele de mină dar și în minereuri și în soluri au fost identificate și alte bacterii, clasificate inițial în genul *Thiobacillus* (*T.*) și reclassificate în alte genuri pe măsură ce studiul lor a fost aprofundat: *Thiobacillus caldus*, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiobacillus thiooxidans* (sin. *T. concretivorus*), *Thiobacillus thioparus* (sin. *Bacterium thioparum*, *T. thiocyanoxidans*), *Acidiphilium acidophilum* (sin. *T. acidophilus*, *T. organoparus*), *T. neapolitanus*, (sin. *T. X*), *Starkeya novella* (sin. *T. novellus*), *Thiomonas cuprina* (sin. *T. cuprinus*), *Thiomonas intermedia* (sin. *T. intermedius*), *Thiomonas prospera* (sin. *T. prosperus*), ș.a. Recent o serie de specii din genul *Thiobacillus* au fost reclassificate în genurile *Acidithiobacillus* (*T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans*, *T. caldus*), *Halothiobacillus* (*T. neapolitanus*, *T. halophilus*, *T. hydrothermalis*) și *Thermithiobacillus* (*T. tepidarius*) (Bond, Druschel și Banfield, 2000; Kelly și colab., 2000, Kelly și Wood, 2000).

În afara bacteriilor din genurile amintite, în aceleași medii de viață, sau în medii asemănătoare, trăiesc și alte bacterii care au un rol mai mult sau mai puțin important în solubilizarea metalelor și care fac parte din alte genuri: *Acidianus*; *Acidimicrobium* (Johnson, 1998; Norris și colab., 2000); *Acidisphaera* (Hiraishi și colab., 2000; Hiraishi și Shimada, 2001); *Ferromicrobium* (Johnson și Roberto, 1997); *Ferroplasma* (Golyshina și colab., 2000; Edwards și colab., 2000); *Leptospirillum* (Hippe, 2000; Coram și Rawlings, 2002); *Metallogenium* (Dubinina și Balashova, 1985); *Metallosphaera*; *Sulfobacillus* (Clark și Norris, 1996; Norris și colab., 1996; Johnson și Roberto, 1997); *Sulfolobus* (Pivovarova și Golovacheva, 1985; Johnson, 1998; Norris și colab., 2000); *Sulfurisphaera* (Kurosawa și colab., 1998; Norris și colab., 2000); *Thermothrix* (Zarnea, 1994).

Din punct de vedere morfologic speciile genului *Acidithiobacillus* (*At.*) nu se deosebesc între ele, fiind reprezentate de indivizi gram-negativi, având formă de bastonașe scurte de 1-2 μ lungime și 0,5 μ în diametru. Au un flagel polar cu ajutorul căruia se pot deplasa ușor în mediul lichid (Torma, 1971, 1977; Hutchins și colab., 1986; Devasia, 1993).

Studiile electronomicroscopice efectuate de Lundgren (1964), Shively, Decker și Greenwalt (1970), precum și de către alți cercetători, au arătat că din punct de vedere structural, tiobacilii posedă o organizare aproape, sau chiar identică cu a altor bacterii gram-negative.

Celula bacteriană este acoperită de un perete celular rezistent, care o apără de acțiunea nefavorabilă a factorilor externi. Peretele celular este înconjurat de o capsulă formată din substanțe mucilaginoase.

Sub peretele celular se găsește membrana celulară (citoplasmatică) ce joacă un rol foarte important în viața celulei. În primul rând ea reglează permeabilitatea celulei, controlând schimbul de substanțe între mediul celular intern și mediul extern, iar în al doilea rând, conținând o serie de sisteme enzimatice, membrana celulară participă la schimburile energetice ale celulei. La acest nivel se găsește sistemul enzimatic respirator al transferului de electroni, care are un rol primordial în procesul de oxidare bacteriană a sulfurilor minerale.

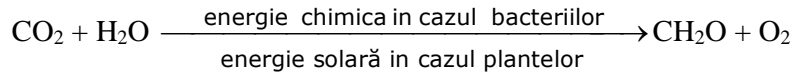
În interiorul celulei se găsește citoplasma, în care sunt incluse o serie de particule celulare care au rolul de a asigura funcțiile vitale ale celulei. Tot aici se găsește nucleoidul care conține fibrile ce constituie o moleculă dublu catenară de acid dezoxiribonucleic (AND). Nucleoidul are formă neregulată, este delimitat de citoplasmă, dar nu are membrană nucleară. El este depozitul informației genetice a bacteriei.

În citoplasmă există plasmide, care sunt elemente spațial separate de cromosomul bacterian, molecule mai mici, inelare, de ADN extracromozomial, care conțin informație genetică neesențială pentru creșterea normală a celulei, dar de care se consideră că sunt legate caracterele adaptative ale celulelor bacteriene (Zarnea, 1986; Oros, 1995).

Din punct de vedere al nutriției toate acestea sunt bacterii autotrofe, chimiosintetizante. Aceasta înseamnă că ele au capacitatea de a-și sintetiza toate substanțele proprii, atât pe cele proteice cât și pe cele glucidice și lipidice, pe seama substanțelor anorganice.

Sursa de energie pe care bacteriile chimiosintetizante o folosesc pentru sinteza substanțelor proprii este energia chimică rezultată din oxidarea diferitelor substanțe anorganice. Ele nu au capacitatea de a descompune substanțele organice, prezența acestor substanțe influențând negativ dezvoltarea lor. În foarte puține cazuri s-a reușit creșterea lui *At. ferrooxidans* pe mediu solid agarizat sau în mediu cu glucoză.

Drept sursă de carbon pentru sinteza substanțelor proprii, tiobacilii, utilizează dioxidul de carbon, ca și în cazul plantelor verzi, cu deosebirea că bacteriile folosesc dioxidul de carbon dizolvat în mediul lichid în care trăiesc:



Pe baza acestor substanțe hidrocarbonatate simple bacteriile sintetizează în continuare elementele de bază ale glucidelor și lipidelor, precum și aminoacizii, elementele constituente ale proteinelor. Oxigenul eliberat în reacția de mai sus nu este eliminat în atmosferă, ca și în cazul plantelor, ci este utilizat ca ultim acceptor de electroni în reacția de oxidare a substratului.

Azotul, fosforul, sulful, potasiul și alte elemente care intră în componența substanțelor organice proprii, sunt luate din sărurile minerale dizolvate în mediul nutritiv.

Având aceeași formă și structură, speciile genului *Acidithiobacillus* se disting între ele pe baza unor caracteristici metabolice, cum ar fi: oxidarea compușilor anorganici ai sulfului, capacitatea de oxidare a fierului, produșii finali formați, adaptarea la heterotrofie, creșterea anaerobă în prezența nitratului, domeniul de pH în care trăiesc etc.

Acidithiobacillus ferrooxidans

Sunt considerate bacterii obligat chemolitototrofe.

Această bacterie poate oxida toate sulfurile minerale naturale (care conțin S^{2-}), sulful nativ (S^0), precum și alți compuși ai sulfului, prezenți în diferite grade de oxidare, ca tiosulfatul ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) și tetracionatul ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$), până la acid sulfuric. De asemenea își poate asigura energia prin oxidarea fierului feros (Fe^{2+}) la fier feric (Fe^{3+}) (Silverman și Lundgren, 1959; Lundgren și colab., 1964; Torma, 1971, 1977; Groudev, 1979; Polkin și colab., 1982; Karavaiko, 1985; Hutchins și colab., 1986; Zarnea, 1994; Evangelou, 1995; Oros, 1995). Este bacteria cea mai larg utilizată în biotehnologiile de biosolubilizare a minereurilor și a concentratelor de metale neferoase.

Sunt bacterii acidofile, pH-ul optim pentru creșterea lor este cuprins între 2,0-2,5 dar pot trăi și la valori mai scăzute ale pH-ului, fiind deosebit de rezistente în mediile acide (Sand și colab., 1992; Schrenk și colab., 1998; Bond și colab., 2000a, 2000b). Având o mare capacitate de adaptare pot suporta o concentrație de acid sulfuric de 18 g/l și mor numai la 22 g/l, la pH 0,3 (Polkin, 1982). În apele de mină au fost depistate la valori de pH 4,0-4,5 și chiar la 7,0, dar în aceste condiții sunt inactive. Mediul celular intern are pH-ul între 4,8-5,0.

Din punct de vedere al temperaturii, aceste bacterii sunt mezofile, având domeniul optim de dezvoltare între 25-35°C. Sunt rezistente la temperaturi scăzute, dar activitatea lor scade cu scăderea temperaturii. Rezistă în condiții de îngheț, reluându-și activitatea după ce condițiile devin favorabile. Prin creșterea temperaturii la 40°C, în mod normal, bacteriile ar trebui să moară, dar s-a constatat că aceste bacterii s-au putut adapta, în condiții experimentale de laborator, la temperaturi de 40-45°C fiind chiar deosebit de active. La temperaturi mai ridicate bacteriile mor (Rawlings și colab., 1999; Brierley, 2001).

Deși sunt considerate ca fiind bacterii strict aerobe Pronk, 1992 și Ohmura, 2002 au demonstrat că *At. ferrooxidans*, ca și *Acidianus sp.*, reduc sulful elementar în cursul oxidării anaerobe. S-a demonstrat existența speciilor din genul *Acidithiobacillus* într-un reactor anoxic proiectat să epureze apele de mină și cele provenite din prelucrarea lignitului (Alfreider și colab., 2002).

Nu s-au descris până în prezent culturi de *At. ferrooxidans* capabile să producă spori.

Rata de creștere în condiții nefavorabile este scăzută și este exprimată în timpul de generație, care la temperatura de 28°C este de 14-15 ore. Această rată de creștere este mult mai scăzută decât pentru alte bacterii comune (Beck, 1967).

În natură sunt răspândite în apele de mină acide, pe suprafața particulelor de minereuri de sulfuri minerale, în minereurile de sulf și în cele de cărbune piritos. De asemenea se pot întâlni și în alte ape, naturale sau industriale, care conțin fier.

În laborator se cultivă, în mod obișnuit, pe medii lichide minerale cum este mediul 9K, elaborat de Silverman și Lundgren (1959), sau mediul Mackintosh (1978). Aceste medii conțin sulfat feros în calitate de substrat energetic. Sulfatul feros poate fi înlocuit cu sulfuri minerale, sulf elementar, tiosulfat ori sulfid. Pentru obținerea de colonii se cultivă pe mediu solid, cu soluție 9K sau Mackintosh. Coloniile formate sunt mici, de culoare brun-roșcată datorită hidroxidului feric ce se formează prin oxidarea fierului.

Acidithiobacillus thiooxidans

Bacteriile din această specie sunt asemănătoare ca formă, dimensiuni și structură a celulei cu cele din specia *At. ferrooxidans*, astfel încât ele nu pot fi deosebite doar prin examinări microscopice, ci numai prin studiul caracterelor lor fiziologice.

Sunt chemolitoautotrofe, obligat aerobe și nesporulate.

Bacteriile din această specie nu pot oxida fierul bivalent. De asemenea, nu oxidează în mod direct sulfurile minerale, în schimb pot oxida sulful elementar, sulfidul, tiosulfatul și tetratiionatul până la acid sulfuric, considerându-se că aceste bacterii au un rol indirect în solubilizarea metalelor, prin producerea de acid (Lizama și Suzuki, 1988).

Trăiesc la pH-uri cuprinse între 1,0 și 7,0 dar sunt rezistente și la o aciditate mai mare (0,5). Domeniul optim de temperatură este cuprins între 28-30°C, dar rezistă în limite largi între 2-40°C (Karavaiko, 1985).

În natură sunt răspândite în aceleași medii cu *At. ferrooxidans*: minereuri de sulf, sulfuri minerale, cărbune piritos, ape de mină, ape sulfuroase, mai puțin în apele feruginoase lipsite de sulf. De asemenea, au fost găsite în unele soluri (Oros, 1995).

În laborator se cultivă în mediul lichid mineral Hutchinson (Hutchinson și colab., 1965), sau în mediul lichid Waksman, la pH 4,5, cu adaos de sulf, tiosulfat sau sulfit în calitate de substrat energetic. Pentru obținerea de colonii se utilizează mediul solid cu agar impregnat cu soluție nutritivă salină și tiosulfat. Coloniile sunt mici, de 1-2 mm diametru, subțiri, de culoare albicioasă.

Leptospirillum ferrooxidans

Aceste bacterii în formă de vibrioni au fost descrise ca specie și gen separat mai recent, inițial fiind considerate ca făcând parte din același gen cu *At.ferrooxidans* cu care are multe caracteristici comune și cu care împarte aceleași biotopuri.

Se deosebesc de tiobacili prin faptul că au formă spiralată și mișcări vibratorii. Ca și tiobacili au însă un flagel polar (Hutchins, 1986).

Sunt bacterii autotrofe și pot oxida numai fierul bivalent în calitate de unică sursă de energie. Se consideră că nu oxidează sulfurul și sulfurile minerale.

În cultură binară, împreună cu *Acidiphilium acidophilum* sau cu *At.thiooxidans*, pot produce oxidarea piritei și a calcopiritei (Karavaiko, 1985). În absența acestor specii pot oxida sulfurile printr-un mecanism indirect, prin intermediul fierului trivalent.

În natură trăiesc împreună cu tiobacili în zonele miniere mai calde, constituind majoritatea numerică a bacteriilor, în timp ce în zonele mai reci predomină tiobacili.

Studiile efectuate de Sand și colab. (1992) pe probe din trei mine din România: Ilba - filonul Venera (sulfuri de cupru și zinc), Baia Sprie (sulfuri de cupru) - din bazinul minier Maramureș și Roșia Poieni, jud. Alba (sulfuri de cupru), au evidențiat prezența bacteriilor *L. ferrooxidans* în aceste situsuri, în care temperaturile erau cuprinse între 14-28°C iar pH-ul între 2,5-3,3, împreună cu *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *Thiomonas intermedia*, *Starkeya novella*, *Halothiobacillus neapolitanus*, bacterii chemoorganotrofe și fungi.

Activitatea fieroxidantă a leptospirililor o depășește pe aceea a tiobacililor fieroxidanți la temperaturi mai mari de 30°C, în timp ce la 25°C activitatea lor este aceeași cu a tiobacililor.

Rezistența la aciditatea ridicată a mediului (pH 0,8) este la fel de bună cu a tiobacililor fieroxidanți.

Deși *L. ferrooxidans* și *At. ferrooxidans*, manifestă o sensibilitate comparabilă la acid, în prezența *L. ferrooxidans* dizolvarea piritei este mai rapidă și continuă la un nivel al pH-ului inhibitor pentru *At. ferrooxidans* (Hutchins, 1986).

O altă însușire care face utilă prezența lor, alături de *At. ferrooxidans*, în aplicațiile tehnologiilor de biosolubilizare este toleranța acestei specii la concentrațiile ridicate de fier în mediu (4,2 mM Fe³⁺).

În laborator se cultivă, în mod obișnuit, pe medii lichide minerale cum este mediul 9K elaborat de Silverman și Lundgren (1959) și mediul Mackintosh (1978).

Thiobacillus thioparus

Sunt bacterii asemănătoare cu cele din genul *Acidithiobacillus* din punct de vedere al formei și al structurii celulare.

Nu pot oxida fierul bivalent, pot oxida însă sulfurul, sulfitul, tiosulfatul și o serie de sulfuri minerale (PbS, Bi₂S₃, Sb₂S₃) la pH 8,0 (Karavaiko, 1985). În timp ce Khalid și Ralph (1977) susțin și oxidarea sulfurilor de zinc, după alți autori posibilitatea oxidării sulfurilor minerale de către această specie este încă nedovedită.

Trăiesc în medii neutre sau slab acide și au un pH optim între 4,5-7,0. Sunt tolerante față de acidități mari constatându-se prezența lor în soluri cu un pH 2,2, continuând să trăiască chiar și la pH mai mic de 0,6 (Müller, 1968).

În natură sunt întâlnite, uneori, în apele de mină și în minereuri, împreună cu ceilalți tiobacili descriși anterior, dar în mod normal se găsesc în soluri, unde activează în circuitul sulfurului în natură.

În laborator se cultivă pe medii asemănătoare cu cele utilizate pentru *At. thiooxidans*, dar la pH neutru. Prin activitatea lor sulfurul sau tiosulfatul din mediu este oxidat până la acid sulfuric, ducând la acidularea mediului.

Thiobacillus denitrificans

Poate trăi în prezența nitraților pe care îi descompune în mediu neutru sau slab alcalin. Această specie diferă de precedentele prin felul ei de viață, facultativ anaerob.

În aerobioză se comportă ca *T. thioparus* și *At. thiooxidans*.

În anaerobioză oxidează sulfurul sau derivații minerali ai acestuia (tiosulfat, tetrionat). Folosește nitrații ca furnizori de oxigen. Cu energia obținută pe această cale se asimilează CO₂. Din nitrați se formează azot elementar. În timpul aerobiozei nu are nevoie de nitrați.

Tulpini de *T. denitrificans*, în condiții de anaerobioză, pot oxida tiocianatul de potasiu, legat de o reducere de nitrați.

Preferă o reacție a substratului mai mult sau mai puțin neutră.

Trăiește în sol, mâl și apă (Müller, 1968).

Acidiphilium acidophilum

Seamănă cu *At. thiooxidans* dar, spre deosebire de aceasta, poate utiliza o serie de substanțe organice în calitate de sursă de energie (glucoză, fructoză), nefiind deci obligat chemolitotrofe.

Karavaiko (1985) consideră că bacteriile din această specie pot oxida numai sulfurul elementar și cresc în mediu acid cu pH-ul între 1,5 și 5,0, având însă optimul de dezvoltare la pH între 2,5 și 3,0. După alți autori însă aceste bacterii pot oxida și tiosulfatii, cu acidularea mediului (Oros, 1995).

Pentru obținerea de colonii se cultivă pe mediu solid de agar cu glucoză și impregnat cu soluție salină 9K. Se obțin colonii mici, transparente, rotunde, de culoare crem.

Thiomonas intermedia

Este un tiobacil facultativ heterotrof. În mediile exclusiv minerale creșterea autotrofă este lentă, dar un mediu cu glucoză și sulfat asigură rapiditatea creșterii. Fiind capabil să crească heterotrof, necesitând o cantitate mică de compuși ai sulfurului ca sursa de sulf. Tiosulfatul poate fi înlocuit cu extract de drojdie.

Scăderea pH-ului la valoarea 4 asigură dezvoltarea numerică.

Este rezistent la concentrațiile mari de fier, plumb și aluminiu, dar nu și la nichel și zinc. Creșterea sa este inhibată de prezența cadmiului în mediul de viață.

Se cultivă pe mediul cu tiosulfat Marin și Rittenberg (1971), la pH 6,7.

Starkeya novella

Este o bacterie facultativ sulfoxidantă. Oxidează sulfurile, sulfurul elementar, sulfitul și tiosulfatul la sulfat (Yamanaka, 1996).

Se caracterizează prin creșterea în medii cu tiosulfat, dând un pH final cuprins între 5,0-6,5. Pot crește la valori ridicate de pH, apropiate de neutru. Împreună cu *Thiomonas intermedia* se cultivă pe mediul Marin și Rittenberg modificat (1971), la pH 6,7.

Acidimicrobium ferrooxidans

Sunt bacterii capabile să crească în condiții autotrofe în prezența compușilor sulfurului și ai fierului, heterotrof, cu glucoză sau extract de drojdie și mixotrof, cu toate aceste substraturi (Clark și Norris, 1996; Hiraishi și colab., 1998).

Sulfolobus acidocaldarius și *Sulfolobus brierleyi* (*Acidianus brierleyi*)

Sunt bacterii termofile, fier- și sulfoxidante, care au fost izolate din izvoare termale sulfuroase cu pH aproape neutru și din halde și zăcămintele de minereuri cu temperaturi ridicate, 55-90°C (Hutchins, 1986; Schippers, 1998).

Sunt arhebacterii de formă sferică, lobată, micoplasmatică.

Peretele celular este lipsit de mureină. Sunt gram-negative, nu au flageli și nu formează spori. Domeniul optim de temperatură pentru activitatea acestor specii este 70-80°C.

Sunt facultativ chemolitotrofe. Obțin energia prin oxidarea S^0 , Fe^{2+} sau a unor sulfuri minerale (pirită, calcopirită, arsenopirită, molibdenită etc.), iar carbonul din CO_2 sau diverși compuși organici simpli (ex.: extract de drojdie).

Pot trăi și heterotrof pe diverse medii organice, atât aerob, cât și anaerob.

Frecvent au fost observate atașate de particulele de sulf elementar prin intermediul unor fimbrii inegale (Weiss, 1973). Gradul de legare este corelat cu numărul și cu lungimea fimbriilor. Experimental s-a demonstrat că după 17 zile de contact cristalele de S^0 sunt complet acoperite cu bacterii. Paralel crește și gradul de oxidare a S^0 , deși legarea nu este o condiție obligatorie.

În urma studiilor electronomicroscopice pe care Berry și Murr (1978) le-au efectuat comparativ pentru *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* și o specie de *Sulfolobus*, reiese că lipsa flagelului și rigiditatea mai mică a peretelui celular la aceasta din urmă, determină o mai mare aderență a lor pe suprafețele sulfurilor (pirită și calcopirită). Nu există nici un dubiu că bacteria aderă la suprafața mineralelor în zone specifice (pe sulfuri) care funcționează ca surse de energie. Fixarea lor nu este însă obligatorie iar bacteria poate cataliza procesul și în lipsa aderenței la substrat.

Thermothrix thioparus

Este o bacterie filamentoasă care proliferază pe pirită.

A fost izolată din ape termale cu pH aproape neutru. Este activă la temperaturi cuprinse între 60-75°C.

Oxidează ionii sulfhidril (HS^-), sulfit (SO_3^{2-}), tiosulfat ($S_2O_3^{2-}$), precum și S^0 în aerobioză, pentru a forma ioni de sulfat (SO_4^{2-}), dar și în anaerobioză (în prezența nitratului).

Datorită capacității de producere a H_2SO_4 creează un mediu favorabil pentru bacteriile termofile acidofile implicate în solubilizarea metalelor din sulfuri (Zarnea, 1994).